

Rola mikroorganizmów w medycynie i przemyśle

Rola mikroorganizmów w medycynie i przemyśle

Redakcja:
Izabela Mołdoch-Mendoń
Kinga Kalbarczyk

Lublin 2022

**Wydawnictwo Naukowe TYGIEL składa serdeczne podziękowania
zespółowi Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje
oraz merytoryczne wskazówki dla Autorów.**

Recenzentami niniejszej monografii byli:

- prof. dr hab. inż. Jadwiga Wierzbowska
- dr hab. Renata Barczyńska-Felusiak, prof. UJD
- dr hab. inż. Justyna Możejko-Ciesielska, prof. UWM
- dr n. tech. kosmetolog Michalina Adaszyńska-Skwirzyńska
- dr n. farm. Anna Biernasiuk
- dr n. med. Małgorzata Koziół
- dr Dominika Olszewska

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:
Monika Maciąg

Projekt okładki:
Marcin Szklarczyk

Korekta:
Małgorzata Gabryś

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ISBN 978-83-67104-72-2

Wydawca:
Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.
ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin
www.wydawnictwo-tygiel.pl

Spis treści

Katarzyna Guz-Regner, Sofya Gritskevich, Julianna Kępowicz Stan czystości rąk przy użyciu środków myjących i myjąco-odkażających	7
Natalia Wojtas, Monika Wołoszyn, Zbigniew Bełkot Wpływ mikrobiomu jelitowego na funkcjonowanie układu nerwowego zwierząt i ludzi – przeгляд najnowszych badań	18
Sylwia Andrzejczak-Grządko, Olga Konkol Mikrobiologiczne zanieczyszczenia w produkcji piwa niepasteryzowanego	36
Roman Andrzejak, Beata Janowska <i>Trichoderma</i> spp. – biostymulator dla roślin ozdobnych	44
Anna Fajdek-Bieda, Agnieszka Wróblewska Właściwości lecznicze linalolu	55
Ewa Ciszkowicz, Anna Miłoś, Katarzyna Lecka-Szlachta, Lidia Zapała Przeciwbakteryjna aktywność kompleksów jonów Co(II), Mn(II) oraz Zn(II) z kwasem niflumowym i 1,10-fenantroliną	70
Małgorzata Gołofit-Szymczak, Angelina Wójcik-Fatla, Agata Stobnicka-Kupiec, Rafał L. Górny Występowanie grzybów w samochodowych filtrach klimatyzacyjnych	80
Michał Świątek, Piotr Nowotnik, Aleksandra Jeske, Aleksandra Kaczmarek, Izabela Krzymińska, Kamila Kaźmierczak Rola wyciągu z fermentacji bakterii <i>Lactobacillus</i> w kształtowaniu cech funkcjonalnych pasty mikroorganicznej	93
Blanka Dwojaczny Udział bakterii jelitowych w regulacji masy ciała	104
Sonia Ziemia-Domańska Rola mikrobioty jelitowej i osi mózg–jelita w patogenezie chorób cywilizacyjnych zdrowia psychicznego	113
Indeks Autorów	120

Stan czystości rąk przy użyciu środków myjących i myjąco-odkażających

1. Wprowadzenie

Codzienna higiena rąk jest bardzo istotna w życiu człowieka, a przestrzeganie jej elementarnych zasad pozwala znacznie zmniejszyć ryzyko zakażeń i szerzenia się chorób przenoszonych za pośrednictwem rąk w ludzkiej populacji. Regularne i poprawne stosowanie procedur higienicznego mycia i dezynfekcji rąk skutecznie obniżają częstość rozprzestrzeniania się chorób zakaźnych, nawet o 31-55% przypadków [1-3]. Higiena rąk jest zatem podstawową profilaktyką w ochronie zdrowia w zapobieganiu zakażeniom przenoszonym drogą kontaktową za pośrednictwem dłoni [4, 5]. Ma to zwłaszcza szczególne znaczenie w środowisku szpitalnym – w ograniczaniu transmisji i krążenia pomiędzy pacjentami a personelem medycznym patogenów, na ogół wysoce opornych na antybiotyki i chemioterapeutyki. Patogeny te są przyczyną niepowodzeń terapeutycznych i wysokich kosztów w przeciwdziałaniu ogniskom epidemicznym i zakażeniom szpitalnym [1, 6].

W obrocie handlowym na całym świecie dostępna jest szeroka gama kosmetyków i preparatów farmaceutycznych do higieny rąk. Takie produkty mogą mieć różny skład chemiczny i konsystencję – w postaci płynnej, hydrożelu lub stałej. Na ogół są one mieszaninami różnych komponentów, które ostatecznie określają charakter przeznaczenia takich produktów w codziennym użytkowaniu. Oprócz głównego aktywnego składnika mogą one zawierać dodatkowe inne komponenty nadające im charakterystyczne właściwości sensoryczne, chemiczne i biologiczne [2]. Do ogólnodostępnych produktów do higieny rąk należą naturalne mydła, syntetyczne detergenty z surfaktantami (takimi jak lauroilosarkozynian sodu, glikozyd lauryłowy, sól sodowa chloru kwasu laurynowego i aminokwasów z owsa, kokamid dietanoamidu, kokoamfodiocyan sodu, glikozyd decylowy, glutaminian kokoilu sodu, chlorek cetrymoniu), antyseptyczne środki myjące (mydła lub syntetyczne detergenty) z czynnym związkiem antymikrobiologicznym (alkoholem, jodoforem lub utleniaczem) albo środki odkażające na bazie alkoholi, głównie etanolu i izopropanolu, ABHSs (ang. *Alcohol-Based Hand Sanitizers*) oraz niealkoholowe środki odkażające, AFHSs (ang. *Alcohol-Free Hand Sanitizers*) z grup czwartorzędowych soli amoniowych w stężeniu $\leq 1\%$ (najczęściej chlorek benzalkoniowy, chlorek benzetonowy, cetrymid, chlorek cetylopirydynowy), jodoforów w stężeniu $\leq 1\%$ (powidon jodu) czy pochodnych chloranów w stężeniu 3-6% (triklosan, chlorheksydyna, chloroksylenol, podchlorynian sodu) [2, 3, 7]. Według CDC (ang. *Centres for Disease Control and Prevention*) preparaty ABHSs posiadają doskonałe

¹ katarzyna.guz-regner@uwr.edu.pl, Zakład Mikrobiologii, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, www. biologia.uni.wroc.pl.

² 331729@uwr.edu.pl, studentka I roku Biologii Człowieka, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, www. biologia.uni.wroc.pl.

³ 330568@uwr.edu.pl, studentka I roku Biologii Człowieka, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski, www. biologia.uni.wroc.pl.

właściwości antymikrobiologiczne, które w testach *in vitro* wykazują wysoką aktywność bakteriobójczą, w tym wobec wielolekoopornych patogenów, takich jak metycylinooporne szczepy *Staphylococcus aureus* i vankomycynooporne paciorkowce z rodzaju *Enterococcus*. W licznych badaniach *in vitro* potwierdzono szerokie spektrum aktywności środków ABHSs względem bakterii, grzybów i większości znanych wirusów (herpeswirusów, wirusa krowianki, grypy, koronawirusów, adenowirusów, enterowirusów czy rotawirusów) [7, 8]. W przypadku hydrożeli – ważnym komponentem wypełniającym w preparatach jest polimer syntetyczny lub naturalny (np. poliakryl, akrylat, polimer alkiloakrylowy, celuloza, hydroksyetyloceluloza, hydroksypropylometyloceluloza, gliceryna), który wpływa na określone właściwości mechaniczne, fizyczne i chemiczne takich produktów. Jedną z właściwości hydrożeli jest chłonność polimerów dla różnych związków chemicznych. Przyjmuje się, że chłonność związków przez syntetyczne polimery jest dużo wyższa niż przez naturalne polimery. Adsorpcja np. etanolu przez syntetyczne polimery może obejmować stężenia w zakresie 60-95% [v/v], gdy tymczasem przez naturalne polimery maksymalnie do 70% [v/v] etanolu [7].

Przez dermatologów polecane są środki myjące i myjąco-odkażające lub preparaty dezynfekcyjne, które zawierają substancje ochronne nawilżające i natłuszczające, takie jak glikol, gliceryna, wazelina, oleje roślinne. Takie preparaty pozwalają jednocześnie skutecznie oczyścić skórę i minimalizować ryzyko naruszenia ciągłości bariery biologiczno-fizjologicznej podstawowej warstwy rogowej naskórka [3, 4]. Niestety większość komponentów w preparatach do higieny rąk, takich jak substancje zapachowe (benzoesany), pianiące, zmiękczone (pentetoniany), surfaktanty (w tym emulgatory) odtłuszczające (alkiloarylosulfoniany, laurylosiarczany, trietanolamina), konserwanty i niektóre środki odkażające z klas czwartorzędowych soli amoniowych i pochodnych chloranów posiadają działanie alergenne lub uczulające, przez co mogą one powodować suchość, podrażnienie, a nawet poważne stany zapalne skóry, dermatidis [3, 4].

Duży wybór kosmetyków do higieny ciała i rąk na polskim rynku wymaga od konsumenta nie tylko umiejętności czytania etykiet i znajomości poprawnego ich użytkowania, ale także wiedzy specjalistycznej w zakresie chemii kosmetycznej. W Polsce konsument przy wyborze takich kosmetyków kieruje się opinią, ceną, marką czy jakością produktu. Mydła i preparaty myjąco-odkażające należą do kategorii produktów powszechnego użytku zaspokajających podstawowe potrzeby fizjologiczne w zakresie higieny osobistej, stąd też są one najczęściej nabywane i użytkowane przez konsumentów [9]. Dodatkowo – w obliczu pandemii COVID-19 (2020-2021) nastąpił wzrost zainteresowań ludzi preparatami do higieny i dezynfekcji rąk w formule hydrożeli oraz łatwymi w użytkowaniu środkami myjącymi [6-8]. Celem niniejszego badania była ocena skuteczności eliminacji mikroorganizmów z powierzchni skóry rąk po użyciu trzech powszechnie dostępnych w handlu preparatów do higieny rąk – przyjmując, że zarówno środki myjące (mydła), jak i myjąco-odkażające na bazie alkoholu posiadają aktywność antymikrobiologiczną i eliminują większość drobnoustrojów z powierzchni skóry rąk, w tym wchodzących w skład mikroflory potencjalnie patogennej. Powyższe zagadnienie badawcze realizowano w formie projektu studenckiego, stosując klasyczne techniki mikrobiologiczne w izolacji i hodowli drobnoustrojów. Projekt ten wykonano jako własną pracę badawczą podczas zajęć laboratoryjnych z przedmiotu mikrobiologia na kierunku biologia człowieka studiów I stopnia na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego w roku akademickim 2021/2022.

2. Metodologia

2.1. Materiał badawczy

W ocenie skuteczności eradykacji przejściowej i stałej mikroflory skóry rąk przetestowano trzy dostępne w handlu na polskim rynku środki myjące i myjąco-odkażające stosowane w rutynowej higienie rąk:

- antybakteryjny żel do rąk na bazie 70% etanolu (preparat nr 1) o składzie: Alcohol ethanol (denaturat), Aqua, Glycerin, sok z liści *Aloe barbadensis*, pantenol, sorbinian potasu, benzoesan sodu, acrylates/C10-30 alkyl acrylate crosspolymer, aminometylopropanol, perfum, aldehyd heksylocynamonowy, limonen, kwas cytrynowy;
- mydło antybakteryjne w kostce (preparat nr 2) o składzie: palmitynian sodu, łojan sodu, woda, sól sodowa kwasów tłuszczowych oleju palmowego, PEG-12, gliceryna, kwas stearynowy, perfum, fenoksyetanol, chlorek sodu, triklokarban, pentasodium pentetate, pentaerithryl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate, alkohol benzylowy, salicylan benzylu, cytronellol, kumaryna, eugenol, linalol, CI 77891, CI 47005, CI 15510;
- mydło kosmetyczne w płynie (preparat nr 3) o składzie: <5% anionowy środek powierzchniowo czynny, <5% niejonowe środki powierzchniowo czynne, sól sodowa siarczanowego etoksylovanego alkoholu laurylowego C12-14, dwuetanoloamina, glicerol, kompozycja zapachowa, 5-chloro-2-metylo-2H-izotiazol-3-on (WE 247-500-7) + 2-metylo-2H-izotiazol-3-on (3:1).

2.2. Procedura higieny rąk

Osiemnastu ochotników (studentów i studentek WNB UW) przydzielono losowo do trzech grup po sześć osób. Dwie grupy osób wykonały tradycyjne higieniczne mycie rąk mydłem i wodą, trzecia grupa zastosowała technikę wtarcia antyseptycznego żelu do sucha bez użycia wody – zgodnie z zaleceniami WHO (ang. *World Health Organisation*) [5]. Mycie rąk mydłem i ciepłą wodą odbywało się nie krócej niż 20 s [7].

2.3. Określenie całkowitej liczby mikroorganizmów na powierzchni skóry rąk metodą kontaktową (odciskową)

Stan czystości mikrobiologicznej skóry rąk 18 ochotników oceniano metodą kontaktową (odciskową) [10] z użyciem kontaktowych płytek agarowych TSA (agar tryptonowo-sojowy) o składzie [g/L]: pepton kazeinowy 15 g, pepton sojowy 5 g, chlorek sodu 5 g, agar-agar 15 g (BioMaxima, Polska). Metoda kontaktowa należy do standardowych technik mikrobiologicznych stosowanych m.in. w ocenie czystości mikrobiologicznej powierzchni zarówno biologicznych, jak i abiotycznych w różnych obszarach sektora medycznego i przemysłowego [10, 11]. Materiał do badań pobierano bezpośrednio, przykładając powierzchnię kontaktowych płytek agarowych do skóry ochotników w trzech etapach: przed i w dwóch odstępach czasu po myciu lub wtarcu żelu antybakteryjnego w skórę rąk: T0, zaraz po myciu rąk/ wtarcu żelu w skórę rąk i T45, po upływie 45 minut od zakończenia procedury mycia rąk/ wtarcia żelu antybakteryjnego. Wypukłym meniskiem podłoża agarowego TSA przykładano na 5 sekund do osuszonej powierzchni skóry po wewnętrznej stronie dłoni rąk, a następnie podłoża inkubowano w warunkach tlenowych, w temp. 30°C ±2°C, przez 3 dni. Po okresie inkubacji zliczano wszystkie wyrosłe kolonie drobnoustrojów w 16 polach kwadratu

o pow. 16 cm² podłoża, a następnie przeliczano na całkowitą liczbę mikroorganizmów – TCM (ang. *Total Concentration of Microorganisms*) – CFU na 10 cm² powierzchni badanej skóry. W analizie makroskopowej kolonii bakteryjnych oceniano ich wygląd, uwzględniając kształt, teksturę, powierzchnię i barwę.

2.4. Detekcja *Staphylococcus aureus*

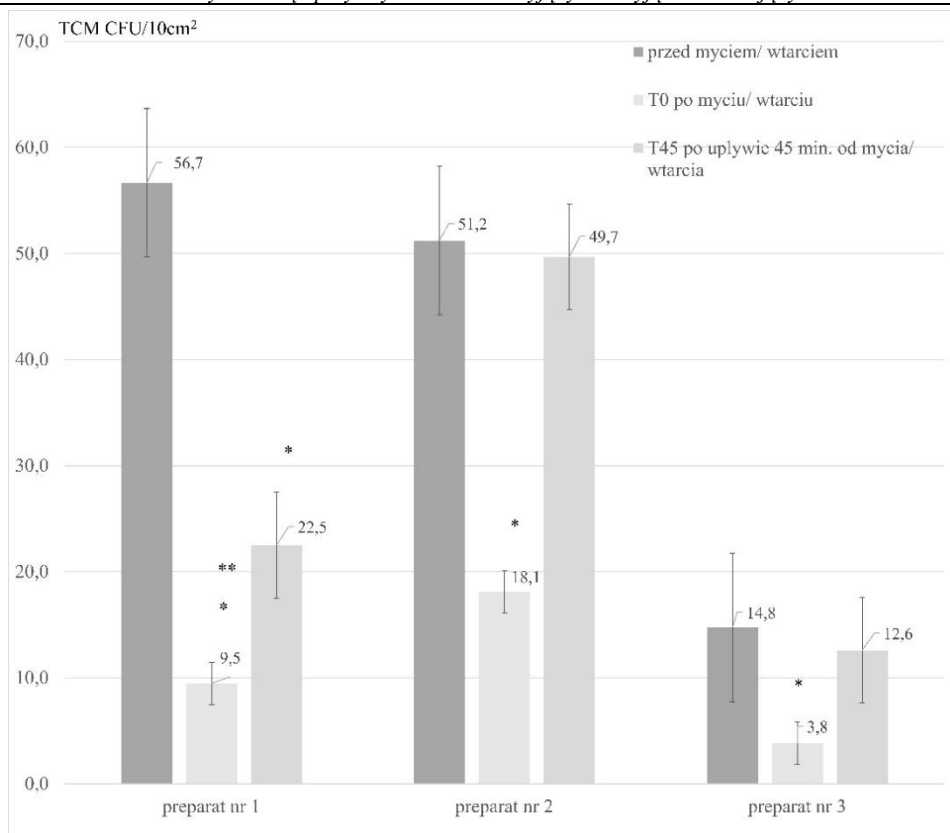
Wyrośnię na podłożu TSA (z prób przed i po myciu/wtarciu) kolonie bakteryjne makroskopowo przypominające kolonie gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) izolowano posiewem redukcyjnym na selektywno-różnicujące podłoże agarowe Mannitol Salt Agar o składzie [g/L]: pepton 10 g, wyciąg mięsny 1 g, chlorek sodu 75 g, mannitol 10 g, czerwień fenolowa 0,025 g, agar-agar 15 g, pH 7,4 ±2 (Biomaxima, Polska). Posiane płytki agarowe inkubowano w warunkach tlenowych, w temp. 35°C ±2°C przez 2 dni. Po okresie inkubacji kolonie mannitolododatnie testowano na obecność czynnika zlepnego CF (ang. *Clumping Factor*) charakterystycznego antygeny powierzchniowego w szczepach *S. aureus* przy użyciu szybkiego lateksowego testu aglutynacyjnego Slidex Staph Plus (bioMerieux, France). Szczepy mannitolododatnie z pozytywną detekcją CF (*S. aureus*) posłużyły jako bio wskaźniki w ocenie skuteczności środków higienicznych do rąk w eradykacji potencjalnie chorobotwórczej mikroflory skóry.

2.5. Testy statystyczne

W porównaniu skuteczności przeciwmikrobiologicznej trzech komercyjnych preparatów do higieny rąk – mydeł i żelu antybakteryjnego – użyto testu ANOVA/MANOVA z analizą *post hoc* (test HSD Tukeya) z powtórzeniami dla czasów T0 i T45 na poziomie istotności statystycznej ($p < 0,05$) (Statistica 13, Polska). W analizach statystycznych próbami odniesienia były wyniki TCM na 10 cm² przed myciem rąk lub wtarciem środka w skórę rąk.

3. Wyniki

W ocenie skuteczności działania przeciwdrobnoustrojowej preparatów higienicznych stosowanych w codziennej higienie rąk przetestowano trzy komercyjne, ogólnodostępne na polskim rynku produkty: antybakteryjny żel do rąk ze środkiem odkażającym – 70% etanolem (preparat nr 1) oraz dwa mydła (preparaty: nr 2 i nr 3). W określeniu stanu czystości mikrobiologicznej skóry rąk w grupie ochotników ($n = 18$) przed i po użyciu środków myjących i myjąco-odkażających zastosowano metodę kontaktową (odciskową) z pobraniem materiału bezpośrednio na uniwersalne nieselektywne podłoża hodowlane tryptonowo-sojowe (TSA) umożliwiające wzrost i rozwój bakterii i mikroskopijnych grzybów (drożdżopodobnych i strzępkowych). W badaniu ilościowym określano całkowitą liczbę mikroorganizmów TCM wzrastających w warunkach tlenowych i mezofilnych na 10 cm² powierzchni skóry rąk (CFU na 10 cm²) w trzech etapach: przed higienicznym myciem rąk lub wtarciem w skórę żelu z antyseptykiem oraz zaraz po myciu rąk lub wtarceniu środka odkażającego i po upływie 45 minut od zakończenia czynności mycia/wtarcia środka w skórę rąk. W odniesieniu do wyjściowego stanu mikrobiologicznego skóry przed wykonaniem procedury higienicznego mycia rąk lub wtarcia środka odkażającego w ręce – wszystkie testowane preparaty (mydła i żel) spowodowały znaczne obniżenie liczebności mikroorganizmów na powierzchni skóry ochotników (wyk. 1).



Wykres 1. Całkowita liczba mikroorganizmów na powierzchni skóry rąk w grupie 18 ochotników [TCM CFU/10 cm²] w teście skuteczności eradykacji mikroorganizmów trzech preparatów higienicznych: antybakteryjnego żelu – preparat nr 1 (n = 6), mydła antybakteryjnego w kostce – preparat nr 2 (n = 6) i mydła kosmetycznego w płynie – preparat nr 3 (n = 6) (ANOVA/MANOVA, wariancja z powtórzeniami, $F(4,37) = 257,41$, $p < 0,0001$), gwiazdkami oznaczono poziomy istotności statystycznej [opracowanie własne]

Preparat nr 1 (antybakteryjny żel) spowodował ponad 83% eradykację bakterii i ewentualnie mikroskopijnych grzybów na skórze rąk ochotników z utrzymaną stosunkowo wysoką aktywnością przeciwdrobnoustrojową na poziomie 60,4% jeszcze po upływie 45 minut od zakończonej czynności wtarcia środka w skórę rąk (test HSD Tukey'a przed wtarciem vs T0 po wtarceniu i przed wtarciem vs T45 po wtarceniu, $p < 0,0001$). Testowane mydła (preparaty: nr 2 i nr 3) również wykazywały wyraźną skuteczność eradykacyjną w testach mikrobiologicznych zaraz po higienicznym myciu rąk, odpowiednio na poziomie 64,6% i 74,3% (test HSD Tukey'a przed myciem vs T0 po myciu, $p < 0,0001$). Po upływie 45 minut od zakończenia czynności mycia rąk mydłem i wodą – wartości TCM na powierzchni skóry ochotników były zbliżone wyjściowym wartościom TCM przed myciem rąk, niezależnie od rodzaju i jakości użytego mydła (test HSD Tukey'a przed myciem vs T45 po myciu, $p = 0,86$ dla preparatu nr 2 i $p = 0,48$ dla preparatu nr 3). W detekcji potencjalnie patogennych szczepów *Staphylococcus aureus* – wykazano ich obecność w 11 posiewach ze skóry rąk (20%), głównie na etapie przed myciem rąk – 5 z 11 posiewów (tab. 1).

Tabela 1. Detekcja mannitolu-dodatnich *Staphylococcus aureus* w testach czystości rąk w grupie ochotników (n = 18) z użyciem środków myjących i myjąco-odkażających (- oznacza *S. aureus* nieobecny, zaś + to *S. aureus* obecny)

Preparat higieniczny	Nr testu	Przed myciem/wtarcieniem	Czas T po myciu/wtarceniu [min]	
			T0	T45
Antybakteryjny żel (preparat nr 1)	1.1	-	-	-
	1.2	-	-	-
	1.3	+	+	+
	1.4	+	+	+
	1.5	-	-	-
	1.6	+	+	+
Mydło antybakteryjne w kostce (preparat nr 2)	2.1	-	-	-
	2.2	-	-	-
	2.3	-	-	-
	2.4	-	-	-
	2.5	+	-	-
	2.6	-	-	-
Mydło kosmetyczne w płynie (preparat nr 3)	3.1	-	-	-
	3.2	+	-	-
	3.3	-	-	-
	3.4	-	-	-
	3.5	-	-	-
	3.6	-	-	-

Źródło: opracowanie własne.

W 3 na 6 posiewów ze skóry rąk (50%) wykryto szczepy *S. aureus* na etapie T0 i T45 po wtarceniu antybakteryjnego żelu w skórę rąk ochotników. Najlepszą skuteczność w eradykacji szczepów *S. aureus* ze skóry ochotników odnotowano w higienicznym myciu rąk z użyciem ciepłej wody i mydeł (preparatów: nr 2 i nr 3).

4. Dyskusja

Higiena rąk powinna być traktowana jako elementarna część podstawowej profilaktyki zdrowotnej człowieka w zapobieganiu zakażeniom przenoszonym przez ręce. W codziennej higienie rąk ważne jest przede wszystkim prawidłowe przestrzeganie podstawowych zasad mycia rąk z użyciem środków myjących (HW, ang. *handwashing*), a w szczególnych przypadkach również dezynfekcja rąk bezpiecznymi środkami antyseptycznymi (HS, ang. *Hand Sanitizer*), głównie na bazie krótkołańcuchowych alkoholi (etanolu, izopropanolu, n-propanolu). Takie zalecenia w prewencji zakażeń bakteryjnych i wirusowych rekomendują Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) i eksperci instytutów zdrowia publicznego różnych państw na całym świecie [4, 5, 12]. Obecnie na polskim rynku handlowym jest łatwy dostęp do ogromnej różnorodności artykułów i preparatów higienicznych ułatwiających działania profilaktyczne w społeczeństwie.

Większość z tych środków oprócz podstawowego aktywnego składnika przeciwdrobnoustrojowego zawiera dodatkowo inne komponenty o znaczeniu bardziej marketingowym niż zdrowotnym, takie jak substancje zapachowe, pieniące, zmiękczające i konserwujące. Substancje te mają zapewnić głównie uzyskanie pozytywnych doznań sensorycznych u użytkowników oraz zysk komercyjny poprzez wydłużenie trwałości

i czasu użytkowania tych produktów higienicznych. Testowane w naszych badaniach trzy handlowo dostępne w Polsce preparaty w swoich składach zawierały związki biologicznie czynne, takie jak anionowe i niejonowe związki powierzchniowo czynne (detergenty) lub środki antyseptyczne na bazie alkoholu (70% etanolu) oraz dodatkowe komponenty poprawiające ich wygląd i użytkowanie. W ocenie skuteczności eradykacyjnej wszystkie badane preparaty higieniczne spowodowały znamienne obniżenie liczebności populacji stałej i przejściowej mikroflory skóry u ochotników, co wskazuje na ich efektywne działanie w rutynowej higienie rąk. Sama już 20-sekundowa czynność mycia rąk w wodzie z użyciem środków myjących okazała się zabiegiem mechanicznym wystarczającym do usuwania i eliminacji z powierzchni rąk dużej liczby drobnoustrojów na poziomie 65-74%, w tym mikroflory patogennej *S. aureus*. Mikroflora przejściowa skóry, w skład której wchodzi m.in. *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* czy szczepy z rodzajów *Acinetobacter* i *Enterobacter*, kolonizuje powierzchniowe warstwy skóry i tym samym łatwiej ulega mechanicznemu usuwaniu podczas mycia rąk aniżeli zasiedlające głębsze warstwy skóry bakterie takie jak *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* czy – okazjonalnie – pałeczki z rodzajów *Propionibacterium*, *Corynebacterium* i *Acinetobacter* [6, 8]. Na ogół stała mikroflora skóry jest trudna w eradykacji, a ich częściową eliminację ze skóry można uzyskać dopiero po zastosowaniu chirurgicznego mycia rąk i dezynfekcji [6]. To tłumaczy również krótkotrwały efekt higienicznego mycia rąk z użyciem testowanych preparatów (mydeł i detergentów) z powodu ich powierzchniowej aktywności. Działanie większości środków myjących i czyszczących (mydeł i detergentów) polega na ich bezpośredniej interakcji z fosfolipidami błon biologicznych mikroorganizmów, co prowadzi do dezintegracji i zaburzenia czynnościowego błon i osłon strukturalnych, degradacji białek i kwasów nukleinowych, a nawet do lizy komórek [8]. Stąd efekt czystości mikrobiologicznej skóry rąk po ich umyciu z użyciem testowanych mydeł był stosunkowo krótkotrwały. Po upływie 45 minut od zakończenia procedury higienicznego mycia rąk stan liczebności mikroflory skóry był zbliżony do stanu wyjściowego przed myciem rąk. Co ciekawe, efekty eliminacji nośnika mikrobiologicznego z powierzchni skóry rąk u ochotników dla obu mydeł były porównywalne, mimo że preparat nr 3 handlowo traktowany jest jako mydło kosmetyczne, a preparat nr 2 jako mydło antibakteryjne. W handlu określenie mydło antibakteryjne jest zabiegiem czysto marketingowym, wskazuje jedynie na obecność w nim konserwantów, związków hamujących rozwój mikroorganizmów (bakterii i grzybów), które występują również w mydłach kosmetycznych. Wise (2015) zwraca uwagę na porównywalną skuteczność eliminacji bakterii z powierzchni skóry dla mydeł zarówno antibakteryjnych, jak i zwykłych kosmetycznych, w których obecne są związki konserwujące o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych [13].

Preparat nr 1 (antybakteryjny żel) w powiązaniu z techniką wtarcia do sucha w skórę rąk posiadał najlepsze właściwości przeciwdrobnoustrojowe w porównaniu z techniką tradycyjnego mycia rąk mydłem i wodą. Poziom eradykacji mikroflory skóry był wysoki (83%) i utrzymywał się stosunkowo długo. Nawet po upływie 45 minut od zakończenia procedury wtarcia preparatu w skórę rąk u ochotników stan czystości rąk utrzymywał się na poziomie ok. 60% eradykacji mikroflory skóry. Skuteczność eliminacji poprzez zniszczenie większości drobnoustrojów dla preparatu nr 1 była lepsza od środków myjących, choć nie zapewnił on całkowitego zniesienia z powierzchni skóry mikroflory

potencjalnie chorobotwórczej. Tłumaczyć to można bezpośrednim działaniem alkoholu, aktywnego składnika preparatu na mikroorganizmy w kontakcie z antyseptykiem, który w stężeniach 70-85% [v/v] powoduje denaturację białek strukturalnych i enzymatycznych oraz uszkodzenie błon biologicznych u bakterii, grzybów oraz wirusów osłonkowych i nielicznych bezosłonkowych [7, 8]. Z kolei mikroorganizmy, które nie mają bezpośredniego kontaktu z antyseptykiem pozostają nienaruszone i dalej zachowują swoją aktywność życiową [6]. Efekty działania alkoholu względem drobnoustrojów zależą od rodzaju i stężenia alkoholu w preparatach użytkowych oraz objętości wcieranego w skórę rąk środka odkażającego (w objętości minimum 3 ml) [6-8]. Powszechnie uważa się, że preparaty ABHR (ang. *alcohol-based hand rubs*) są bardzo skuteczne i niszczą w 99,9% większość znanych drobnoustrojów (bakterii i wirusów). Niestety takie preparaty nie są efektywne względem bakterii sporotwórczych (np. *Clostridium difficile*), pasożytów z rodzaju *Cryptosporidium* czy norowirusów, będących przyczyną biegunek [2]. Zgodnie z zaleceniami WHO i CDC codzienna higiena rąk powinna obejmować rutynowo minimum 20-30-sekundowe mycie rąk mydłem (z dodatkiem biosurfaktanów) i letnią wodą, a w sytuacjach bez dostępu do wody – alternatywne korzystanie z doraźnych środków dezynfekcyjnych na bazie alkoholu w stężeniu nie mniejszym niż 60% [v/v], preparatów typu hydrożele z szerokim spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej, ABHRs [2, 3, 7, 8, 14].

W testowanych preparatach do higieny rąk pozostałe komponenty stanowiły dodatki pielęgnacyjne, w tym: witaminy pentanol, substancje natłuszczające i nawilżające (gliceryna, glicerol, ekstrakt pochodzenia roślinnego, tj. z liści aloesu, oleje roślinne) oraz substancje uzupełniające – wpływające na wygląd, zapach, konsystencję i trwałość tych produktów – takie jak emulgatory (dietanoloamid, glikol PEG-12, kwas stearynowy), regulatory pH (2-amino-2-metylopropanol), stabilizatory (pentaerytrytyl tetra-di-t-butyl hydroxyhydrocinnamate), barwniki, substancje zapachowe (aldehyd heksylocynamonowy, citronellol, eugenol, kumaryna, limonen, linalol, salicylan benzylu) i konserwanty (alkohol benzylowy, benzoesan sodu, izotiazole, kwas cytrynowy, sorbinian potasu, triklokarban, triklosan). Obecność konserwantów w środkach myjących lub myjąco-odkażających jest powszechna, ich zadaniem jest zachowanie trwałości i utrzymanie odpowiedniego poziomu czystości mikrobiologicznej takich środków, a zwłaszcza ochrona przed kontaminacją bakteriami – pochodzącymi ze środowiska lub mikroflory człowieka – z takich grup jak *Firmicutes*, *Actinobacteria* i *Proteobacteria*. Istnieją dowody, że długo użytkowane i niewymieniane mydła (w kostce lub płynie) mogą być nośnikami do 1 tysiąca bakterii w 1 gramie/mililitrze preparatu, co z kolei niekorzystnie wpływa na ich jakość i bezpieczeństwo użytkowania. Mogą one być przez to przyczyną niepożądanych reakcji alergicznych po kontakcie zanieczyszczonych mikrobiologicznie preparatów ze skórą człowieka [4].

Obecnie narastający problem stanowi wzrost przypadków kontaktowego zapalenia skóry – CD (ang. *Contact Dermatitis*) z powodu częstszego stosowania od czasu wybuchu pandemii COVID-19 produktów i środków do higieny rąk. Problem ten na ogół dotyka pracowników służby zdrowia i opieki zdrowotnej, rzadko kiedy inne grupy zawodowe [14]. W 80% przypadków CD następuje jedynie podrażnienie skóry przez substancje uczulające obecne w mydłach, żelach lub preparatach antyseptycznych (takie jak izopropanol, n-propanol, chlorheksydyna, triklosan i inne czwartorzędowe sole amoniowe czy niektóre naturalne oleje roślinne). Częste stosowanie np. preparatów ABHRs na bazie

izopropanolu lub n-propanolu może u niektórych osób prowadzić do patofizjologicznych zmian w warstwie rogowej naskórka (denaturacji białek, modyfikacji lipidów, osłabienia keratynocytów) i stanów zapalnych wskutek wydzielania cytokin prozapalnych w miejscu kontaktu. W takiej sytuacji zaleca się stosowanie produktów i preparatów higienicznych do rąk zawierających substancje nawilżające i pozbawionych substancji podrażniających, np. zastąpienie izopropanolu nieuczulającym środkiem antyseptycznym etanolem [14]. W pozostałych 20% rozwija się jednak kontaktowe zapalenie skóry o podłożu alergicznym (ACD, ang. *Allergic Contact Dermatitis*) wskutek rozwoju syndromu nadwrażliwości typu IV związanego z aktywnością cytotoksyczną limfocytów typu T i wydzielaniem czynników zapalnych po reekspozycji z substancją uczulającą – alergenem [14]. Właściwości alergenne przypisuje się konserwantom, syntetycznym detergentom, surfaktantom i substancjom zapachowym, które można spotkać przeważnie w tanich środkach i produktach do higieny rąk [3, 14].

Zaleceniem światowych ekspertów zdrowia publicznego jest unikanie w higienie rąk tanich, syntetycznych mydeł i detergentów czy preparatów ABHSs i AFHSs z uczulającymi aktywnymi związkami antymikrobiologicznymi. W poprawie komfortu pracy pracownikom służby zdrowia, którzy mają kontakt z pacjentami rekomenduje się stosowanie zasady 10% mycia rąk i 90% dezynfekcji na bazie bezwonnych, naturalnych środków myjących i odkażających w codziennej higienie rąk [3, 4].

5. Wnioski

Testowane trzy komercyjne dostępne na rynku polskim kosmetyki do higieny rąk – mydła i antybakteryjny żel z substancją czynną (70% etanolem) posiadały aktywność antymikrobiologiczną i skutecznie wyeliminowały większość drobnoustrojów z powierzchni skóry rąk po myciu lub wtarceniu środka antyseptycznego z eradykacją mikroflory na poziomie 65-83%. Wyniki badań są obiecujące, ale wymagają dalszych badań na większej próbie ochotników, z uwzględnieniem większej liczby różnych preparatów do higieny rąk – typu środki myjące (HW, ang. *Hand-Washing*): naturalne i syntetyczne (syndety), a także środki wcierane (HR, ang. *Hand-Rubbing*). Niemniej wstępnie uzyskane wyniki są doskonałymi danymi źródłowymi, które można wykorzystać w powszechnej edukacji i promocji zdrowia w zakresie higieny rąk w społeczeństwie.

6. Podsumowanie

Poziom skuteczności eliminacji drobnoustrojów ze skóry rąk zależy od składu i właściwości komponentów w preparatach higienicznych do rąk (w kolejności: mydło antybakteryjne w kostce (preparat nr 2) < mydło kosmetyczne w płynie (preparat nr 3) < antybakteryjny żel do rąk (preparat nr 1). W handlu kosmetyki z określeniami mydło antybakteryjne czy mydło kosmetyczne mają jedynie charakter czysto marketingowy. Większość bowiem komercyjnych mydeł oraz detergentów do higieny rąk i ciała zawiera substancje konserwujące i surfaktanty o właściwościach przeciwmikrobiologicznych z aktywnością bakterio-, grzybo- i wirusobójczą. Ich obecność w takich środkach myjących i myjąco-odkażających zapewnia większą skuteczność niszczenia i eliminacji dużej liczby drobnoustrojów mikroflory przejściowej skóry oraz trwałość preparatu. W codziennej higienie rąk – w prewencji transmisji i szerzenia się chorób tzw. „brudnych rąk” i „kontaktowych” powinno się stosować poprawne procedury higienicznego mycia rąk mydłem i ciepłą wodą nie krócej niż 40 sekund oraz dezynfekcję rąk niealergizującymi środkami antyseptycznymi (HS: ABHSs lub AFHSs).

Podziękowania

Serdeczne podziękowania dla Pani Moniki Nolas i Pana Tomasza Szczęsnego – przedstawicieli firmy BioMaxima S.A. (Polska) – za przekazanie podłoża hodowlanych do działań edukacyjnych w procesie kształcenia studentów i studentek w zakresie strategii projektu na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego.

Literatura

1. Abhat L.D., Nayar K.R., Moosan H., Nair S., Shaffi M., *Handwashing and public health*, Economic and Political Weekly, 50(48), 2015, s. 19-21.
2. Chirani M.R., Kowsari E., Teymourian T., Ramakrishna S., *Environmental impact of increased soap consumption during COVID-19 pandemic: biodegradable soap production and sustainable packaging*, Science of the Total Environment, 796, 2021.
3. Rundle C.W., Presley C.L., Militello M., Barber C., Powell D.L., Jacob S.E., Atwater A.B., Watsky K.L., Yu J., Dunnick C.A., *Hand hygiene during COVID-19: recommendations from the American Contact Dermatitis Society*, Journal of American Academy of Dermatology, 83(6), 2020, s. 1730-1736.
4. Skibińska K., *Zarządzanie jakością – higiena rąk – czy praktyka podąża za teorią*, Zakażenia XXI Wieku, 1(4), 2018, s. 135-141.
5. WHO, *Who to handwash and handrub?*, 2006, <https://www.who.int/multi-media/details/how-to-handwash-and-handrub> [data dostępu: 12.05.2022].
6. Widmer A.F., *Replace hand washing with use of a waterless alcohol hand rub?*, Clinical Infectious Diseases, 31(1), 2000, s. 136-143.
7. Villa C., Russo E., *Hydrogel in hand sanitizers*, Materials, 14, 2021, s. 1577.
8. Golin A.P., Choi D.C., Ghahary A., *Hand sanitizers: a review of ingredients, mechanisms of action, modes of delivery, and efficacy against coronaviruses*, American Journal of Infection Control, 48, 2020, s. 1062-1067.
9. Osuch J., *Determinanty zachowań konsumentów produktów kosmetycznych na rynku polskim*, 2009, s. 78, 93-94, 180-181, 188-206, <https://www.wbc.poznan.pl/dlibra/publication/112468/edition/123125/content> [data dostępu: 1.07.2022].
10. Duane B., Pilling J., Saget S., Ashley P., Pinhas A.R., Lyne A., *Hand hygiene with hand sanitizer versus handwashing: what are the planetary health consequences?*, Environmental Science and Pollution Research, 2022, doi.org/10.1007/s11356-022-18918-4.
11. Długaszewska J., Muszyński Z., *Czystość biologiczna środowiska wytwarzania produktów leczniczych*, Farmacja Polska, 65(5), 2009, s. 323-326.
12. Dancer S.J., *Controlling hospita-acquired infection: focus on the role of the environment and new technologies for decontamination*, Clinical Microbiology Reviews, 27(4), 2014, s. 665-690, doi.org/10.1128/CMR.00020-14.
13. Wise J., *Ordinary soap is as effective as antibacterial soap for handwashing, study finds*, BMJ: British Medical Journal, 351, 2015, <https://doi.org/10.1136/bmj.h4944>.
14. Tan S.W., Oh C.C., *Contact dermatitis from hand hygiene practices in the COVID-19 pandemic*, Annals, Academy of Medicine, Singapore, 49, 2020, s. 674-676.

Stan czystości rąk przy użyciu środków myjących i myjąco-odkażających

Streszczenie

W profilaktyce prewencji transmisji i szerzenia się wielu chorób zakaźnych ważna jest właściwa higiena rąk. W codziennym życiu i w praktyce lekarskiej powinno się stosować prawidłowe procedury mycia i dezynfekcji rąk. Skuteczność eliminacji dużej liczby drobnoustrojów z powierzchni skóry, w tym mikroflory potencjalnie patogennej, zależy od techniki eradykacji nośnika mikrobiologicznego ze skóry i aktywności przeciwmikrobiologicznej środków i preparatów higienicznych do rąk. Na polskim rynku dostępna jest szeroka gama

środków myjących i myjąco-odkażających oraz preparatów antyseptycznych do dezynfekcji rąk. W badaniach przetestowano skuteczność eradykacyjną mikroflory skóry rąk trzech komercyjnych preparatów do higieny rąk (mydło i antybakteryjnego żelu z 70% etanolem) metodą kontaktową przy użyciu podłoży hodowlanych TSA i Mannitol Salt Agar. Testy mikrobiologiczne wykonano przed i po higienicznym myciu rąk mydłami lub wtarcia antybakteryjnego żelu w grupie 18 ochotników. Wszystkie testowane preparaty (mydła i żel antybakteryjny) posiadały aktywność antimikrobiologiczną i skutecznie wyeliminowały większość drobnoustrojów mikroflory skóry rąk, na poziomie eradykacji 65-83%. Dodatkowo antybakteryjny żel z techniką wtarcia preparatu w skórę dłoni bez użycia wody wykazywał wydłużoną aktywność przeciwbakteryjną na poziomie 60% eradykacji mikroflory skóry jeszcze po upływie 45 minut od zakończenia czynności wtarcia środka w porównaniu z testowanymi mydłami. Wyniki badań są obiecujące, ale wymagają dalszych badań na większej próbie ochotników, z uwzględnieniem większej liczby różnych preparatów do higieny rąk typu środki myjące – naturalne i syntetyczne (syndety) – oraz środki wcierane. Niemniej uzyskane wyniki są doskonałymi danymi źródłowymi, które można wykorzystać w powszechnej edukacji i promocji zdrowia w zakresie higieny rąk w społeczeństwie.

Słowa kluczowe: higiena rąk, mydła, żele antybakteryjne

Hand cleanliness with washing and disinfecting agents

Abstract

Good hand hygiene is important in preventing the transmission and the spread of many infectious diseases. Everyone, and especially those involved in medical practice, should follow the correct procedures for washing and sanitizing hands. Effectively eliminating microorganisms from the skin surface—including pathogenic microflora—depends on proper hand-washing technique and on the antimicrobial activity of the cleanser used during washing. On the Polish market there is a wide range of antiseptic agents for cleaning hands. In the current study, three commercial hand-hygiene products (soaps and antibacterial hand gel with 70% ethanol) were tested for their effectiveness in eradicating skin microflora using the imprint-culture method with TSA and Mannitol Salt Agar. The microbiological tests were performed before and after hygienically washing hands with the soaps or rubbing hands with the antibacterial gel by a group of 18 volunteers. All of the tested products – both soaps and the antibacterial hand gel – showed antimicrobial activity and eliminated most of the microorganisms from skin microflora at levels of 65% to 83% eradication. Additionally, in comparison to the tested soaps, the hand gel, applied using a hand-rubbing technique without water, showed extended antibacterial activity at a level of 60% eradication of the skin microflora 45 minutes after application. These results are promising, but further research with a larger volunteer sample and with additional hand-hygiene products, both natural and synthetic (syndets), is required. Nevertheless, the results obtained provide an excellent source of data to use in general education and hygienic health promotion.

Keywords: hand hygiene, soaps, antibacterial gels

Wpływ mikrobiomu jelitowego na funkcjonowanie układu nerwowego zwierząt i ludzi – przegląd najnowszych badań

1. Wprowadzenie

Jelita cechują się największą różnorodnością zarówno pod względem mikroorganizmów, jak i materiału genetycznego spośród wszystkich narządów ludzkiego organizmu. Mikroflorę jelita tworzą głównie bakterie oraz grzyby, pierwotniaki, wirusy i archeony. Obecnie szacuje się, iż stosunek mikrobioty jelitowej do wszystkich komórek ludzkiego organizmu wynosi 1,3 : 1 [1, 2]. W odniesieniu do jelit terminem „mikrobiota” określa się wszystkie bytujące w danym narządzie drobnoustroje, natomiast „mikrobiom” odnosi się zarówno do wszystkich organizmów, ich materiału genetycznego, jak i otaczających ich warunków środowiskowych [3]. Równowaga pomiędzy mikroorganizmami patogennymi oraz symbiotycznymi w jelitach jest niezbędna do utrzymania homeostazy ustroju.

Mikroflora zasiedlająca dany organ produkuje metabolity i kwasy nukleinowe, które są następnie transportowane do krążenia systemowego. Poprzez mechanizmy epigenetyczne są one w stanie indukować aktywację nieaktywnych genów, czego końcowym skutkiem jest ewolucja. Jednakże mogą również prowadzić do rozwoju stanu chorobowego [4, 5].

Dodatkowo mikrobiota jelitowa dwukierunkowo komunikuje się z ośrodkowym układem nerwowym (OUN) poprzez produkcję i imitowanie neuroaktywnych molekuł [6]. Bakterie pierwotnie posiadające szlaki biochemiczne odpowiedzialne za syntezę neurotransmiterów poprzez horyzontalny transfer genów przekazują je komórkom eukariotycznym, które budują ludzkie ciało. Teoria ta opiera się na założeniu, że zarówno mikroorganizmy, jak i komórki gospodarza produkują neurotransmitery dokładnie tymi samymi szlakami biochemicznymi [7]. Połączenie pomiędzy mikrobiotą jelitową a OUN ustala się jeszcze w okresie wewnątrzmacicznym i jego wpływ utrzymuje się przez resztę życia danego osobnika, a oddziałuje na nie wiele czynników, w tym szczepienia, antybiotykoterapia, zmiany w diecie czy intensywne używanie produktów czyszczących oraz środków dezynfekujących [8, 9]. Różnorodność mikroflory jelitowej może zmienić się pod wpływem np. rodzaju porodu, infekcji bakteryjnych czy wirusowych, stresu, sposobu karmienia we wczesnym okresie niemowlęcym oraz leków.

Rozwój mikrobioty jelitowej zachodzi równolegle do wzrostu oraz dojrzewania neuronów w mózgowiu [10, 11]. Geny, które są odpowiedzialne za powstawanie synaps pomiędzy neuronami znajdującymi się w mózgowiu oraz neuronami w układzie

¹ natjia@wp.pl, student, Studenckie Koło Naukowe Chorób Zwierząt Łownych i Wolno Żyjących, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

² monikawol99@wp.pl, student, Studenckie Koło Naukowe Chorób Zwierząt Łownych i Wolno Żyjących, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

³ zbigniew.belkot@lublin.up.pl, adiunkt posiadający st. nauk. dr, Studenckie Koło Naukowe Chorób Zwierząt Łownych i Wolno Żyjących, Katedra Higieny Żywności Zwierzęcego Pochodzenia, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

pokarmowym wykazują wiele podobieństw. Wiąże się to z wysokim potencjałem powstania nieprawidłowości zarówno mózgowia, jak i jelit w przypadku jakichkolwiek ich mutacji [12].

Wpływ mikrobioty jelitowej na OUN powoduje, iż odpowiedzialna jest również pośrednio lub bezpośrednio za procesy psychiczne i zachowanie. Bazując na najnowszych doniesieniach można stwierdzić, iż ma ona prawdopodobnie związek z rozwojem zaburzeń lękowych i depresyjnych, dysfunkcji ze spektrum autyzmu, jak i chorób neurodegeneracyjnych, w tym choroby Alzheimera i Parkinsona [13-15].

Skład i liczebność mikroflory jelitowej mają zatem istotne znaczenie dla zachowania ogólnego stanu zdrowia i dobrego samopoczucia [16]. Przykładem bakterii mających znaczny wpływ na zachowanie homeostazy może być rodzaj *Lactobacillus*, niezbędny do przeprowadzania prawidłowego procesu fermentacji jelitowej. Pomimo iż stanowi on mniej niż 1% autochtonicznego składu mikrobioty dystalnej części jelita człowieka, często zauważyć można, iż zmiany procentowe ilości jego szczepów skorelowane są z wieloma chorobami. Pozytywny efekt podawania probiotyków zawierających szczepy *Lactobacillus* obserwuje się między innymi w przypadku cukrzycy typu 1 oraz 2, zespołu jelita drażliwego, stwardnienia rozsianego, wirusa HIV, otyłości czy reumatoidalnego zapalenia stawów [17].

Biorąc pod uwagę, iż szereg chorób, nie tylko związanych z układem pokarmowym, wiąże się z różnicami w kompozycji mikrobioty jelitowej, wielu badaczy próbuje odpowiedzieć na pytanie, czy doprowadzenie mikroflory do pierwotnego stanu sprzed choroby mogłoby wiązać się z całkowitym lub częściowym wyleczeniem pacjenta. Postuluje się, iż mikroorganizmy mogą stać się w przyszłości odrębną grupą leków, zwaną „psychomikrobiotykami”, która mogłaby znaleźć zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny, w tym psychiatrii [18].

Poniższa praca ma na celu zestawienie najnowszych badań związanych z mikrobiotą jelitową i jej wpływem na układ nerwowy, w tym na wybrane zaburzenia psychiczne u ludzi i zwierząt.

2. Skład mikrobioty jelitowej ludzi i myszy – zasadność badań na mysich modelach

2.1. Kompozycja ludzkiej mikrobioty jelitowej

Większość organizmów mikrobioty układu pokarmowego człowieka stanowią bakterie, z których większość klasyfikowana jest do typu *Firmicutes* (m.in. rodzaje: *Clostridium* (najwięcej), *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Enterococcus* i *Ruminococcus* oraz *Bacteroidetes* (w tym rodzaje *Bacteroides* i *Prevotella*). Inne typy bakterii występujące w przewodzie pokarmowym to *Actinobacteria* (głównie reprezentowane przez rodzaj *Bifidobacterium*), *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* oraz *Fusobacteria*. Skład ludzkiej mikrobioty zmienia się wraz z wiekiem, przebytymi chorobami, odbytymi terapiami, zwłaszcza antybiotykowymi. Zależy także od rodzaju porodu, pokarmu noworodka, enterotypu, diety, częstości ćwiczeń, BMI, środowiska etnicznego [19].

2.2. Skład mysiej mikrobioty jelitowej

Mysią mikrobiotą jelitową, podobnie jak ludzką, tworzą przede wszystkim bakterie. Oprócz nich znajdują się w niej także wirusy, grzyby, archeony i protisty. Skład mikrobioty różni się w zależności od odcinka układu pokarmowego, a także gatunku myszy

[20]. Istnieje jednak niewiele badań dokładnie określających różnice międzygatunkowe w mikrobiocie [21]. Głównymi typami bakterii w jelitach myszy są *Firmicutes* i *Bacteroidetes*. W jelicie cienkim dominuje rodzaj *Lactobacillus* oraz bakterie z rzędu *Bacteroidales* (głównie rodzina *S24-7*, znana jako *Muribaculaceae* [22]). W jelicie grubym wzrasta ilość bakterii z *Bacteroidales* i innych *Bacteroidetes*, natomiast ilość *Lactobacillus* maleje. Ich miejsce zajmują przede wszystkim *Lachnospiraceae* oraz *Clostridiales*. Oprócz tego w mikrobiocie jelitowej myszy znajdują się rodzaje: *Mucispirillum*, *Alistipes*, *Oscillospira*, *Ruminococcaceae*, *Rikenellaceae* oraz *Akkermansia* [20, 23].

2.3. Porównanie ludzkiej i mysiej mikrobioty jelitowej – zasadność mysich modeli w badaniach

Myszy i ludzie mają podobną budowę anatomiczną, histologiczną oraz funkcjonowanie układu pokarmowego, jednak różnią się rozmiarem, środowiskiem życia, sposobem odżywiania i metabolizmem. W związku z tym występują między nimi znaczne różnice w składzie mikrobioty jelitowej – zarówno w rodzajach bakterii, jak i w liczebności każdego z nich. Większość drobnoustrojów zarówno w jelitach myszy, jak i ludzi należy do typów *Firmicutes* oraz *Bacteroidetes*. U myszy są dodatkowo obecne bakterie z typu *Deferribacteres* (gł. rodzaj *Mucispirillum*). Największe różnice występują w ilościach bakterii z rodzin *Lactobacillus*, *Turicibacter*, *Alistipes*, *Mucispirillum* (więcej u myszy), a także *Faecalibacterium*, *Roseburia* i *Bifidobacterium* (więcej u ludzi). Mikrobiota myszy i ludzi zawiera ok. 80 tych samych rodzajów bakterii, z czego 25 głównych rodzajów bakterii w jelitach myszy stanowi także trzon ludzkiego mikrobiomu. Prawie 80% funkcji mikrobioty jest wspólnych dla obu grup. Jednak porównując liczebność poszczególnych genów mikrobiomu mysiego z ludzkim, tylko 4% pokrywa się ilościowo [21].

Mysie modele pozwalają na badania z dokładnością niemożliwą dla badań na człowieku – mogą mieć ściśle określone genotypy oraz kontrolowane warunki diety i środowiska podczas wzrostu, rozwoju i badań, a to wszystko w nieporównywalnie krótszym czasie i przy niskich kosztach. Ze względu na podobieństwa w budowie organizmu, układu pokarmowego oraz mikrobioty do ludzi – myszy są cenionymi przykładami, które mogą dostarczać bardzo istotnych danych do przyszłych badań na ludziach. Nie można jednak zapominać o wymienionych wcześniej istotnych różnicach, a także o indywidualnych modyfikacjach w działaniu osi mózg-jelito-mikrobiota u poszczególnych osobników, z powodu których wyniki badań na mysich modelach, nawet tych z humanizowaną mikrobiotą, nie mogą być przekładane bezpośrednio na człowieka [24].

3. Oś mózg-jelita-mikrobiota – jak wygląda komunikacja pomiędzy jelitami a OUN?

Oś mózg-jelita-mikrobiota (m-j-m) to połączenie, które zapewnia komunikację dwóch pozornie odrębnych jednostek – mikroorganizmów zasiedlających jelita z OUN gospodarza. Jest to komunikacja dwukierunkowa: zarówno dysbioza, czyli zaburzenie w ilości, składzie i funkcjonowaniu mikroflory jelitowej wpływa na OUN, jak i osłabiona kondycja psychiczna (spowodowana między innymi obniżonym nastrojem, chronicznie odczuwanym lękiem czy długotrwałym stresem) ma potencjał do zainicjowania zmiany składu mikroflory i finalnie może wpłynąć na działanie układu trawiennego [25]. W jednym z pierwszych badań tego rodzaju myszy eksponowano na różnorodne czynniki stresogenne. W zależności od czynnika, na jaki były narażone zwierzęta laboratoryjne, zmieniał

się skład mikrobioty jelitowej. W przypadku głodzenia myszy posiadały w jelitach więcej bakterii *Escherichia coli*, a mniej *Lactobacillus*, natomiast myszy umieszczone w klatce z agresywnym osobnikiem tego samego gatunku posiadały więcej bakterii *Roseburia* i *Clostridium*, a mniej *Parabacteroides* i *Bacteroides* – w przeciwieństwie do myszy z grup kontrolnych [26, 27]. Dowiedziono również, iż mikroflora jelitowa wpływa zarówno na nabłonek jelitowy i unerwienie jelit, jak i na OUN poprzez produkcję neuromodulatorów i neuroprzekazników takich jak kwas gamma-aminomasłowy (GABA) czy serotonina [28].

Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (SCFA) to końcowe produkty bakteryjnej fermentacji węglowodanów i błonnika, które w niebagatelny sposób wpływają na regulację osi m-j-m. Wykazują one bowiem właściwości przeciwzapalne oraz regulują produkcję hormonów jelitowych i serotoniny [29, 30]. Dodatkowo wpływają na aktywność gleju, przyczyniając się do prawidłowej pracy mózgu [31].

Nerw błędny, będący kluczowym elementem osi m-j-m, zbudowany jest zarówno z włókien aferentnych, jak i eferentnych. Włókna aferentne przekazują informacje z narządów trzewnych (w tym jelit) do mózgu, natomiast eferentne odpowiadają za informacje zwrotne. W samym układzie pokarmowym znajduje się ponad 100 milionów neuronów, które tworzą tak zwany enteryczny układ nerwowy (ENS, ang. *enteric nervous system*) określane również mianem „drugiego mózgu” lub układem żołądkowo-jelitowym [32, 33]. Odpowiedzialny jest on za kontrolowanie funkcji trawiennych i komunikację z OUN poprzez nerw błędny, nerw miedniczny, rdzeń kręgowy oraz ścieżki współczulne [15, 34]. Postuluje się, iż konkretne gatunki bakterii odgrywają ważną rolę w rozwoju i działaniu ENS, dzięki czemu wpływają na komunikację z OUN [15]. W badaniu na myszach pozbawionych mikroorganizmów (tzw. „sterylnych myszach”) spostrzeżono mniejszą ilość neuronów w ENS oraz deficyt w sygnalizacji zmysłowej. Co więcej odbudowa mikroflory jelitowej u badanych zwierząt doprowadziła do przywrócenia fizjologicznej pracy jelit [35, 36]. Dodatkowo Gareau i wsp. w wyniku badań nad sterylnymi myszami dowiedli, iż rozwój tych gryzoni przebiega w sposób odmienny od myszy z grupy kontrolnej. Wykazywały one bowiem wyższy poziom stresu i lęku poprzez nadmierną aktywację osi podwzgórze-przysadka-nadnercza. Dodatkowo zwierzęta te miały problem z uczeniem się i zapamiętywaniem. Wyniki badań biochemicznych udowodniły, iż obniżony poziom białka c-Fos oraz neurotroficznego czynnika pochodzenia mózgowego są niezbędne do uzyskania wyżej wymienionych umiejętności [37].

Dowiedziono także, że dieta i czynniki metaboliczne mają wpływ na wrażliwość włókien aferentnych nerwu błędnego. Hormony wydzielane przez układ trawienny wywołują za ich pomocą uczucie sytości, a niezdrowa dieta zmniejsza ich wrażliwość, co przekłada się na zwiększone spożycie pokarmu przez zwierzęta laboratoryjne [38]. W doświadczeniu przeprowadzonym przez Turnbaugh i wsp. zaaplikowano sterylnym myszom mikrobiotę jelitową od myszy otyłych. Przyczyniło się to do zmiany ich zachowania i nie tylko zaczęły więcej jeść, ale również wybierały jedzenie o większej kaloryczności [39].

Przecięcie nerwu błędnego w badaniu na gryzoniach spowodowało, iż pojawiły się w grupie badanych zwierząt zachowania lękowe i zmniejszona neurogeneza w zakręcie zębatym hipokampa [15]. W warstwie komórek nabłonka jelitowego znajdują się komórki enteroendokrynowe, które pod wpływem bodźca takiego jak metabolity procesów bakte-

ryjnych czy substancje pochodzące z pożywienia generują potencjał czynnościowy. Badanie z 2018 roku wykazało, iż komórki te posiadają wypustki tworzące połączenie z nerwem błędnym i zostały one nazwane komórkami neuropodowymi [40]. Dodatkowo wykazano, iż neuroprzekaźnikiem w danym systemie jest glutaminian. Zadaniem komórek neuropodowych jest między innymi modulowanie działania przewodu pokarmowego za pomocą nerwu błędnego i przekazywanie do mózgu informacji związanych ze spożytym pokarmem. Udowodniono zatem, że istnieje bezpośrednia komunikacja między jelitami a mózgiem.

Pośrednio mikrobiota jelitowa i OUN połączone są na przykład poprzez układ endokryny, autonomiczny układ nerwowy oraz immunologiczny [28]. Nerw błędny zmienia swoją aktywność w odpowiedzi na produkty fermentacji węglowodanów takie jak krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, wydzielane hormony jelitowe oraz bezpośrednie działanie mikroflory jelitowej na układ odpornościowy [41-43].

Określone grupy mikrobioty są znacząco zależne od składników odżywczych, jakie zapewniamy im spożywając określone produkty. Dieta bogata w węglowodany wydaje się najlepsza dla wzrostu bakterii *Prevotella*, błonnik pokarmowy natomiast powoduje zwiększony przyrost *Bifidobacterium*, a konkretne tłuszcze promują wzrost *Bacteroides* [44]. Dodatkowo mikroorganizmy stale rywalizują ze sobą zarówno o składniki odżywcze, jak i siedlisko. To oznacza, że bardziej zróżnicowana grupa mikroorganizmów zasiedlająca jelita jest bardziej skłonna zużytkować energię na konkurencję pomiędzy sobą, a ta mniej zróżnicowana do przyrostu określonej grupy mikroflory jelitowej. Po osiągnięciu *quorum sensing*, czyli ilości pozwalającej na masową koordynację zachowań danej grupy mikroorganizmów, zyskują one możliwość do ekspresji genów wirulencji – między innymi odpowiedzialnej za syntezę toksyn i białek indukujących receptory bólu. Dzięki temu, gdy brakuje niezbędnych dla ich przeżycia substratów, są w stanie manipulować zachowaniem gospodarza. Manipulacja odbywa się również poprzez wywieranie wpływu na ośrodek nagrody i sytości, a nawet poprzez blokadę nerwu błędnego w celu redukcji uczucia pożądania określonych produktów spożywczych [45].

4. Zaburzenia mikrobioty a występowanie chorób psychicznych

Zaobserwowano brak jednoznacznych zależności obejmujących liczebność i różnorodność mikrobioty jelitowej pomiędzy pacjentami z chorobami psychicznymi a pacjentami zdrowymi. Znaczące różnice występowały jednak wśród konkretnych rodzajów bakterii i ich poszczególnych zawartości w składzie mikrobioty. U osób z różnymi chorobami psychicznymi (depresja, schizofrenia, choroba afektywna dwubiegunowa) wykształciła się mikrobiota, która cechuje się większym podobieństwem do mikrobioty osób również cierpiących na zaburzenia psychiczne niż do osób zdrowych, do siebie nawzajem niż do zdrowej kontroli. Mikrobiotę tę charakteryzował wzrost ilości bakterii produkujących kwas mlekowy (choć zwykle pożyteczny, jego kumulacja może prowadzić do neurotoksyczności), wzrost ilości bakterii związanych z metabolizmem GABA oraz niższa liczba bakterii produkujących SCFA [46].

4.1. Depresja

Przykładem wieloczynnikowego efektu zaburzeń działania jelit może być depresja, której patogeneza związana jest często z występowaniem dysbiozy jelitowej. Obecnie zaburzenie to jest uznawane za ściśle powiązane z dysfunkcją układów serotoninergicznych

oraz stanami zapalnymi całego ciała. Niezwykle istotne są tutaj badania udowadniające, że podczas stanu zapalnego podwyższone czynniki cytokin prozapalnych, wykrywane w jelitach oraz ogólnoustrojowym krążeniu krwi, połączone są ze zmianami na poziomie neuroprzebieżników takich jak, będąca pochodną tryptofanu, serotonina [47-52]. Wiele z tych substancji posiada zdolność przekraczania bariery krew-mózg. Może odbywać się to drogą humoralną, nerwową, komórkową lub z wykorzystaniem innych nośników informacji [53, 54].

Dla zrozumienia etiologii tego złożonego zaburzenia niezbędne jest także rozważenie znaczenia egzogenego aminokwasu – tryptofanu. Poza rolę budulcową białek, ma on również ogromne znaczenie dla zachowania homeostazy immunologicznej oraz prawidłowego przebiegu reakcji zapalnej. Z występowaniem depresji ściśle wiąże go umiejętność przekraczania bariery krew-mózg oraz uczestnictwo w syntezie serotoniny. Szlak syntezy danego neuroprzebieżnika odpowiada jednak jedynie za 3% całego jego metabolizmu. Około 90% trawionego tryptofanu jest bowiem metabolizowanych w szlakach kinureniny. Reszta, degradowana przez mikrobiotę jelit, służy do wytwarzania indolu i jego pochodnych. Stany zapalne charakteryzują się zwiększonym wytwarzaniem kinureniny na koszt serotoniny. Fakt ten może powodować liczne zmiany behawioralne zauważalne u ludzi i zwierząt, w tym na przykład przedłużający się smutek i obniżony poziom energii. Dodatkowo sugeruje się, iż stany zapalne zwiększające ilość kinureniny w jelitach prowadzą także do występowania podwyższonego poziomu jej metabolitów – kwasu kynureninowego i kwasu chinolinowego. Warto tutaj zaznaczyć, że kwas chinolinowy jest obecnie uważany za substancję neurotoksyyczną, pełni on także funkcję agonisty receptorów N-metylo-D-asparaginianowych (NMDA) [55-60]. Podczas zapalenia cytokiny prozapalne stymulują też mikroglej, co powoduje uwalnianie glutaminianu – kolejnego z agonistów receptorów NMDA, będącego jednocześnie głównym neuroprzebieżnikiem pobudzającym ośrodkowy układ nerwowy. Powoduje to efekt dodatkowego zwielokrotnienia działania podanych wyżej receptorów [61]. Interesujący jest również fakt, iż duża część neuronów jelitowych posiada receptory glutaminianowe typu NMDA, co prawdopodobnie wiąże się ze zmienioną w czasie choroby nocycępcją [62, 63].

Badania płynu mózgowo-rdzeniowego osób, które podjęły próby samobójcze wykazały około 300% wzrost stężenia kwasu chinolinowego w porównaniu z kontrolną grupą, a także zmienione jego proporcje w stosunku do kwasu kynureninowego, będącego jego naturalnym antagonistą [64]. Hamuje on bowiem hipermobilność jelitową – powiązaną z nadmierną aktywacją receptorów NMDA – oraz pobudliwość neuronów jelitowych.

Receptor N-metylo-D-asparaginianu (NMDAR) jest jonotropowym receptorem glutaminianu, który posiada unikalny kanał jonowy. Przepływ jonów jest w nim blokowany przez Mg^{2+} . Powoduje to, iż do jego aktywacji niezbędna jest depolaryzacja membrany i usunięcie jonów magnezu, a następnie wiązanie koagonistów glicyny i glutaminianu, możliwe dzięki zależnemu od napięcia dopływowi jonów Na^+ i Ca^{2+} oraz odpływie jonów K^+ [65]. NMDAR ma kluczowe znaczenie dla utrzymania homeostazy komórkowej. Zakłócenie ich funkcjonowania powoduje różnorodne neurologiczne i neuropsychiatryczne patologie, nierzadko odległe w czasie. Ma to związek z istotną rolą podanych receptorów dla zachowania neuroplastyczności mózgu. Stąd też zmniejszenie zdolności do uczenia się oraz zachowania pamięci, występujące w chorobie Alzheimera, stwardnieniu zanikowym bocznym, chorobie Huntingtona, chorobie Parkinsona, schizofrenii czy też zaburzeniach depresyjnych, są związane z nieprawidłowościami receptorów

NMDA [66, 67]. Przykładem takiej patologii może być nadaktywacja pozasynaptyczna NMDAR spowodowana nadmiarem glutaminianu, skutkująca śmiercią komórki [68]. Obecnie najczęściej używane leki przeciwdepresyjne tworzy się w celu hamowania transporterów monoamin, bazując na założeniu deficytu synaptycznego stężenia monoamin – leżącego u podstaw depresji. Istnieje jednak kilka ograniczeń tej generacji leków. Można do nich zaliczyć opóźniony efekt terapeutyczny, populacyjną oporność – w ilości około 1/3 – na tego typu leki oraz mniejszą skuteczność w porównaniu z blokerami NMDAR [69-71]. Obecnie substancje te są już zatwierdzone – z licznymi obostrzeniami w stosowaniu wydanymi przez Europejską Agencję Leków. Badanie kliniczne wykazało, iż stosowany od dawna antagonistą podanych receptorów – ketamina – wywoływał już w ciągu 2 godzin utrzymujący się do 7 dni efekt przeciwdepresyjny [72-74]. Wybrane do eksperymentu dawkowanie było porównywalne do tych stosowanych w celu wywołania objawów psychotycznych u osób zdrowych [75]. Jest to prawdopodobnie związane ze wzmacnianiem funkcji modulatoryjnej podczas stanu psychicznego – u osób z depresją powoduje ona zwiększenie stanu emocjonalnego i polepszenie nastroju.

Funkcja serotoniny w układzie pokarmowym określana jest przede wszystkim jako regulacyjna dla motoryki jelit oraz jako wpływająca na proliferację oraz sekrecję komórek nabłonka. Jelitowa serotonina powoduje też aktywację zewnętrznych neuronów czuciowych poprzez oddziaływanie na postsynaptyczne receptory 5-HT₃, przenosząc w ten sposób sygnały dotyczące motoryki jelit do mózgu [76]. Biorąc pod uwagę opisane wyżej odkrycia, badacze obecnie wskazują na silny związek między zapaleniem jelit, ich dysbiozą, zaburzeniami szlaku i sygnalizacji serotoniny oraz wynikającymi z tego powodu zaburzeniami neurologicznymi.

4.2. Choroba Alzheimera

Choroba Alzheimera (chA) to występująca najczęściej wśród populacji osób powyżej 60. roku życia forma demencji. W mózgu osób chorych m.in. odkładają się blaszki amyloidowe, składające się z beta-amyloidu (A β), dochodzi do hiperfosforylacji białka tau upośredzającej przewodzenie aksonów, tworzą się sploty neurofibrylarne i występuje przewlekły stan zapalny [77].

Wiele badań wskazuje także na udział dysbiozy jelitowej w patogenezie choroby Alzheimera (chA). Zmiany w składzie mikrobioty (spowodowane m.in. starzeniem, odpowiedzią immunologiczną na patogeny, wpływem hormonów i metabolitów tkankowych, a także nieodpowiednią dietą, stylem życia, chorobami i leczeniem), prowadzące do zwiększonej sekrecji lipopolisacharydu (LPS) i A β przez bakterie jelitowe, polegają m.in. na zmniejszeniu różnorodności mikrobioty i zwiększeniu liczebności *E. coli*, *Shigella* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., a także *Candida tropicalis* (związany z produkcją TNF- α) [77, 78]. LPS oraz A β naruszają przepuszczalność jelit i bariery krew-mózg. Następnie prowadzą do powstania stanu zapalnego (uwalnianie prozapalnych cytokin: IL-6, IL-17A, IL-1 β , IL-22, kalprotektyny) i uszkodzenia tkanki nerwowej, mogącego skutkować śmiercią z powodu chA [77, 79]. Niektóre części mózgu są bardziej podatne na metabolity mikrobioty. Są to m.in. hipokamp i ciało migdałowate – czyli obszary najczęściej uszkodzone w chA [79]. Stan zapalny nasilony jest także poprzez zmniejszenie produkcji SCFA. Ich brak, podobnie jak nadmiar A β i LPS, prowadzi do wzmożonego wytwarzania interleukin IL-1 β oraz IL-6, a także TNF- α (ogólnoustrojowy stan zapalny) oraz rozregulowania mikrogleju, którego nadmiernie

aktywowane komórki pobudzają dodatkowo astrocyty. Razem z NO i ROS wytwarzają cytokiny prozapalne w jeszcze większej ilości, a to powoduje śmierć neuronów. Obniżona produkcja SCFA w chA wiąże się ze zmniejszoną liczebnością bakterii jelitowych, które je wytwarzają, tj. *B. fragilis*, *E. rectale*, *E. hallii*, *F. prausnitzii*, *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp. [77, 79-81].

Znacznym źródłem bakteryjnego A β oraz LPS są bakterie Gram-ujemne, takie jak *E. coli* czy *Shigella* spp. [77, 79]. Badanie przeprowadzone w 2016 roku wykazało zwiększoną ilość lipopolisacharydów *E. coli* we wszystkich mózgach badanych myszy. U zwierząt kontrolnych LPS oraz K99 wykryte zostały w znacznie niższych ilościach [82]. Bakteryjny amyloid może przedostawać się do mózgu z krwią przez uszkodzoną barierę jelitową oraz krew-mózg, ale także, ze względu na swoje właściwości podobne do prionów, bezpośrednio przez tkankę nerwową – nerwem błędnym. Powoduje on agregację mózgowego A β , a także sam odkłada się w blaszkach amyloidowych u pacjentów z chA. Endotoksyny takie jak LPS, po przedostaniu przez uszkodzone bariery, pobudzają mikroglej (a on astrocyty) do aktywacji reakcji zapalnej. Przez uszkodzone bariery mogą przedostawać się także egzotoksyny – dostarczone do organizmu z żywieniem [77, 79].

Zwiększona przepuszczalność bariery jelitowej i bariery krew-mózg sprawia, że nie tylko cząsteczki, ale także całe mikroorganizmy mogą się stosunkowo łatwo przedostawać przez układ krążenia do tkanki mózgowej i ją kolonizować, co prowadzi do procesów zapalnych i neurodegeneracji [80]. Mysie modele wskazują, że infekcje mózgu znacząco przyspieszają tworzenie się blaszek amyloidowych w tkance nerwowej. Potwierdzają to wyniki sekcji mózgow pacjentów chorych na chA, w których wykrywano liczne patogeny, w tym wirusa HSV typu 1, bakterię *Borrelia burgdorferi*, pasożyty, protisty oraz grzyby. Przyczyną szybszego odkładania się A β w tych przypadkach może być fakt, że A β jest peptydem biorącym udział w niespecyficznym odpowiadzi immunologicznej – tkanka, broniąc się przed patogenami, wytwarza związek szkodliwy w późniejszym czasie dla niej samej [77].

Odkryto także związane z mikrobiotą mechanizmy neuroprotektcyjne. Przykładowo: poprzez metabolizm tryptofanu pochodzącego z diety bakterie jelitowe produkują kwas indolo-3-propionowy i aldehyd indolo-3-propionowy, które powodują supresję mechanizmów prozapalnych w astrocytach i innych komórkach glijowych, skutkując obniżeniem poziomu 4-HNE oraz wydzielaniem przeciwzapalnego IFN-1. Tym samym są uważane za antyoksydanty i substancje hamujące formowanie się blaszek amyloidowych. Największa ich produkcja jest przypisywana *Clostridium sporogenes* [79, 83].

Naukowcy próbują także określić rolę serotoniny w m-j-m w chA [84].

4.3. Choroba Parkinsona

Zmiany w kompozycji mikrobioty jelitowej odnotowuje się również w przypadku choroby Parkinsona. Choroba Parkinsona (chP) to postępujące zaburzenie neurologiczne charakteryzujące się m.in. utratą neuronów dopaminergicznych istoty czarnej w mózgu, co wiąże się z zaburzeniami motorycznymi – drżeniem spoczynkowym, spowolnieniem ruchowym, utratą odruchów, a także z demencją oraz innymi ruchowymi i niezwiązanymi z ruchem objawami [85].

Bakterie jelitowe wpływają m.in. na modulację ekspresji genów, produkcję dopaminy i ekspresję receptorów dopaminergicznych, a także plastyczność synaps w istocie czarnej.

Dysbioza jelit może skutkować aktywacją mikrogleju i astrocytów, a więc stanem zapalnym i stresem oksydacyjnym różnych rejonów mózgu [86].

W badaniach składu mikrobioty jelitowej u pacjentów hospitalizowanych stwierdzono znaczące różnice między grupą pacjentów z chP (n = 46) a grupą kontrolną (n = 31). Najistotniejszy był wzrost liczebności *Clostridium* (klaster IV), *Akkermansia*, *Bifidobacterium* i bakterii kwasu mlekowego oraz obniżenie liczebności *Firmicutes* w porównaniu z grupą kontrolną. Co ciekawe, *Akkermansia* występowała częściej u pacjentów leczonych niż nieleczonych (może to mieć związek z SCFA) [87].

W stolcu pacjentów z chP udokumentowano obniżony poziom krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (właściwości przeciwzapalne, jw.) oraz podwyższony poziom kalprotektyny (białko ostrej fazy, uwalniane przez neutrofile i inne komórki biorące udział w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej, marker stanu zapalnego jelit [88]) w stosunku do grupy kontrolnej. Zmiany te mogą być bardziej wyraźne odpowiednio w grupie mężczyzn i kobiet. W chP występują różnice w składzie mikrobioty jelitowej i jelitowej odpowiedzi immunologicznej. Także aktywność poszczególnych bakterii i charakter ich interakcji z układem odpornościowym gospodarza mogą ulec zmianie w chP. Przykładowo u pacjentów z chP zaobserwowano obniżoną liczebność *Butyricoccus* i *Roseburia* – znanych z produkowania krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych – oraz podwyższoną liczebność *Akkermansia*, których wzrost jest hamowany przez SCFA. Badania sugerują także rolę IL-1 β oraz IL-8 w rozwoju chP. Poziomy poszczególnych wskaźników stanu zapalnego nie są jednak jednoznacznie ze sobą powiązane. Wskazuje to na dużą złożoność procesów immunologicznych zarówno mikrobioty, jak i organizmu gospodarza [89, 90].

Na mysim modelu choroby Parkinsona (myszom C57BL/6, którym podawano ciągłe niskie dawki 1-metylo-4-fenyl-1,2,3,6-tetrahydropirydyny, indukowano podwyższone poziomy TNF α i IL1 β w substancji czarnej oraz zaburzenia mikrobioty jelitowej podobne do tych u pacjentów z chP. Wzrost liczebności *Actinobacteria* i *Proteobacteria* skorelowano z niestabilnością postawy i trudnościami w chodzeniu, *Tenericutes* z nasileniem stanu zapalnego. Wykazano również skuteczność przeszczepu mikrobioty jelitowej (FMT, ang. *fecal microbiota transplantation*). Przeszczep poprawił skład mikrobioty jelitowej badanych myszy – wzrosła zawartość *Blautia*, a zmalała *Anaerostipes*, *Bifidobacterium*, *ASF356* i *Ruminococcus*. Po FMT doszło do zmniejszenia stanu zapalnego (obniżenia aktywności mikrogleju i astrocytów oraz poziomu GSK3 β , IL1 β , indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS) i ufosforylowanego białka PTEN (element szlaku inicjacji apoptozy, wzrostu ilości hydroksylazy tyrozyny (TH, enzym biorący udział w syntezie lewodopy) w istocie czarnej oraz złagodzenia dysfunkcji motorycznych myszy [91].

Istnieje także teoria sugerująca prionowe pochodzenie chP. Modele zwierzęce udowodniły, że bakteryjne toksyny wzmagają produkcję α -synukleiny, białka prionopodobnego, które przedostaje się nerwem błędnym do centralnego układu nerwowego i prowadzi do α -synukleinopatii, polegającej m.in. na wytwarzaniu ciał Lewy'ego – agregatów białek w neuronach prowadzących do ich dysfunkcji [86].

4.4. Schizofrenia

W patogenezie schizofrenii dopatruje się związku pomiędzy aktywnością receptorów dla GABA i dla NMDA a mikrobiotą. Schizofrenia to choroba zaliczana do psychoz o niejednorodnym obrazie klinicznym i wciąż nierozpoznanej etiologii. U pacjentów

chorujących na schizofrenię zauważa się jednak podwyższony poziom prozapalnych cytokin, rozregulowanie układu odpornościowego i dolegliwości ze strony przewodu pokarmowego, co pozwala sądzić, że wpływ na mikrobiotę mógłby mieć znaczenie w przebiegu choroby [92]. U chorych na schizofrenię zaobserwowano zarówno wzrost ilości bakterii biorących udział w metabolizmie i ekspresji receptorów dla GABA (*Eggerthella*, *Lactobacillus*, *Shigella*), jak i spadek liczebności innych bakterii (tj. *Bacteroides*, *Streptococcus*). Względem zdrowych osób – zmiany występowały także w ilości *Prevotella*, *Escherichia*, *Veillonella*, *Megasphaera*, *Haemophilus* oraz *Roseburia* [47]. Dokładny związek między schizofrenią a mikrobiotą jelitową oraz możliwość zastosowania tej wiedzy w praktyce nie zostały dotychczas odkryte [92].

4.5. Choroba afektywna dwubiegunowa

Choroba afektywna dwubiegunowa to przewlekła choroba psychiczna charakteryzująca się występowaniem epizodów maniakalnych i depresyjnych [93]. Jej patofizjologia jest związana m.in. ze stanami zapalnymi, syntezą MAO, stresem oksydacyjnym – są to czynniki, na które wpływ mikrobioty jelitowej został udowodniony [94]. U pacjentów z chorobą afektywną dwubiegunową występuje wzrost *Oscillibacter*, *Megasphaera*, *Flavonifractor*, a także *Eggerthella*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* – biorących udział w metabolizmie GABA, czynnika hamującego aktywność układu nerwowego. Zaobserwowano także spadek *Roseburia*, *Faecalibacterium* i *Ruminococcus*, czyli bakterii produkujących SCFA [47, 94]. Dalsze badania będą się koncentrować na znalezieniu bezpośrednich zależności między składem mikrobioty jelitowej a poszczególnymi komponentami patogenezы choroby afektywnej dwubiegunowej oraz możliwym leczeniu opartym m.in. o dietę i podaż probiotyków [93].

5. Niszczenie bariery krew-mózg przez bakterie

Wyspecjalizowane mikrośrodowisko centralnego układu nerwowego oraz jego komunikacja z resztą organizmu jest możliwa dzięki istnieniu bariery krew-mózg (BBB, ang. *blood-brain barrier*). Jej dysfunkcja powiązana z nieszczelnością prowadzi do wielu chorób neurologicznych, takich jak zaburzenia ze spektrum autyzmu, demencja, choroba Alzheimerera, depresja, schizofrenia, stwardnienie rozsiane, zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych czy też choroby ogólnoustrojowe, takie jak niewydolność wątroby [95, 96]. Niektóre bakterie mogą barierę tę zaburzać, między innymi poprzez wydzielanie cytokin, chemokin oraz cząsteczek adhezyjnych. Obrazuje to mechanizm działania *Bacillus anthracis*, która atakuje komórki śródbłonna poprzez rozkład białka TJ ZO-1, tym samym przyczyniając się bezpośrednio do krwotoków w OUN [97]. Ostatnie lata pokazały jednak możliwość inwazji poprzez inne szlaki.

Listeria monocytogenes jest fakultatywną bakterią wewnątrzkomórkową, która powoduje choroby inwazyjne u ludzi i zwierząt, takie jak infekcje OUN. Badanie epidemiologiczne bakteryjnego zapalenia OUN wykazało, że *L. monocytogenes* jest około dziesięciokrotnie skuteczniejsza w naciekaniu OUN niż inne neuroinwazyjne bakterie Gram-dodatnie [98]. Umożliwia jej to transport przez BBB w obrębie zarażonych pasożytami leukocytów, bezpośrednia inwazja komórek śródbłonna przez zewnątrzkomórkowe krwiopochodne rozprzestrzenianie się lub migracja wsteczna (dośrodkowa) do mózgu w obrębie aksonów nerwów czaszkowych [99]. Internaliny (In1A i In1B) są głównymi patogennymi białkami *L. monocytogenes*, które oddziałują odpowiednio z jej receptorami komórkowymi E-kadheryną i przejściem mezenchymalno-nabłonkowym

(MET) w celu przekraczania barier jelitowych i łożyskowych. Bakteria ta może przenikać przez BBB, ponieważ receptory te są wyrażane na powierzchni komórek nabłonka spłotu naczyńniówkowego, a MET jest również wyrażany na poziomie śródbłonka mózgu. Może prowadzić do krzyżowania krwi z płynem mózgowo-rdzeniowym i BBB [100].

Haemophilus influenzae jest Gram-ujemną, fakultatywną beztlenową i patogenną bakterią należącą do rodziny *Pasteurellaceae*. Na całym świecie stanowi jeden z najczęstszych rodzajów tej bakterii, która powoduje zapalenie opon mózgowych u niemowląt i dorosłych. W latach 80. połowa przypadków zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych prowadzących do śmierci niemowląt była spowodowana tym drobnoustrojem. Sytuacja uległa jednak znacznej zmianie po wprowadzeniu odpowiednich szczepień. Od tego czasu przypadki zachorowań znacznie się zmniejszyły (78%) [101].

Głównymi miejscami przedostawania się *H. influenzae* do OUN są LR (*Laminin receptor*) i PAFR (*Platelet-activating factor receptor*). Następnie patogen może powodować zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych [102].

Jelito grube jest u organizmów stałocieplnych głównym miejscem występowania *Escherichia coli*. Większość jej szczepów jest nieszkodliwych, wytwarzają witaminę K2 oraz zapobiegają kolonizacji jelita bakteriami chorobotwórczymi, ponieważ szczepy te są uważane za część normalnej mikrobioty [103]. Jednak niektóre serotypy *E. coli* są sporadycznie odpowiedzialne za poważne zatrucia pokarmowe oraz zapalenie opon mózgowych. W badaniach stwierdzono, że cytotoksyczny czynnik martwiczy 1 (CNF-1) aktywuje rodzinę genów homologów Ras, członka A (RhoA), co prowadzi do inwazji *E. coli* K1 na BMEC *in vitro* i zwiększonej penetracji BBB *in vivo*. LR jest znany jako główny receptor internalizacji *E. coli* K1 do BMEC. Dodatkowo – innym sposobem penetracji do OUN jest wiązanie OmpA przez *E. coli* z białkiem wiążącym C4 (C4 pz), klasycznym regulatorem szlaku dopełniacza w celu zablokowania reakcji kaskady dopełniacza, dzięki czemu unika się bakteriolizy i rozpoznawania przez komórki układu odpornościowego [104].

6. Podsumowanie

Dynamiczna populacja mikrobioty jelitowej pełni niezwykle ważną funkcję w zachowaniu homeostazy organizmu. Jej oddziaływanie na układ nerwowy jest obecnie przedmiotem wielu badań. Do tej pory udało się udowodnić wpływ dysbiozy jelitowej na występowanie wielu przewlekłych zaburzeń neurodegeneracyjnych. Fundamentalną częścią patogenezy tych dysfunkcji jest chroniczny stan zapalny jelit. Kolejne szczegółowe badania osi mózg-jelita wskazują na efektywność zastosowania metod ich leczenia takich jak zmiany diety, stosowanie probiotyków czy też przeszczep mikrobioty kałowej. Przyniesione badania mogą przyczynić się do rozwinięcia nowatorskich schematów leczenia chorób do tej pory uważanych za nieuleczalne.

Literatura

1. Dinan T.G., Stanton C., Cryan J.F., *Psychobiotics: a novel class of psychotropic*, *Biological Psychiatry*, 74, 2013, s. 720-726.
2. Sende R., Fuchs S., Milo R., *Are we really vastly outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans*, *Cell*, 164, 2016, s. 337-340.
3. Khanna S., Tosh P.K., *A clinician's primer on the role of the microbiome in human health and disease*, *Mayo Clinic Proceedings*, 1, 2014, s. 107-114.

4. Rook G.A., 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders. *Darwinian medicine and the „hygiene” or „old friends” hypothesis*, *Clinical & Experimental Immunology*, 160, 2010, s. 70-79.
5. Rook G.A., Lowry C.A., Raison C.L., *Hygiene and other early childhood influences on the subsequent function of the immune system*, *Brain Research*, 1617, 2015, s. 47-62.
6. Barrett E., Ross R.P., O'Toole P.W., Fitzgerald G.F., Stanton C., *γ -Aminobutyric acid production by culturable bacteria from the human intestine*, *Journal of Applied Microbiology*, 113, 2012, s. 411-417.
7. Iyer L.M., Aravind L., Coon S.L., Klein D.C., Koonin E.V., *Evolution of cell-cell signaling in animals. Did late horizontal gene transfer from bacteria have a role?*, *Trends in Genetics*, 20, 2004, s. 292-299.
8. Borre Y.E., O'Keeffe G.W., Clarke G., Stanton C., Dinan T.G., Cryan J.F., *Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders*, *Trends in Molecular Medicine*, 20, 2014, s. 509-518.
9. Evrensel A., Ceylan M.E., *The gut-brain axis: the missing link in depression*, *Clinical Psychopharmacology and Neuroscience*, 13, 2015, s. 239.
10. Borre Y.E., O'Keeffe G.W., Clarke G., Stanton C., Dinan T.G., Cryan J.F., *Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders*, *Trends in Molecular Medicine*, 20, 2014, s. 509-518.
11. Borre Y.E., Moloney R.D., Clarke G., Dinan T.G., Cryan J.F., *The impact of microbiota on brain and behavior: mechanisms & therapeutic potential*, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 817, 2014, s. 373-403.
12. Hadhazy A., *Think twice: how the gut's „second brain” influences mood and well being*, *Scientific American*, 12, 2010, s. 2010.
13. Foster J.A., Neufeld K.A.M., *Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression*, *Trends in Neurosciences*, 36, 2013, s. 305-312.
14. Finegold S.M., Dowd S.E., Gontcharova V., Liu C., Henley K.E., Wolcott R.D., Youn E., Summanena P.H., Granpeesheh D., Dixon D., Liu M., Molitorisa D.R., Green J.A., 3rd, *Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children*, *Anaerobe*, 16, 2010, s. 444-453.
15. Cryan J.F., O'Riordan K.J., Cowan C.S., Sandhu K.V., Bastiaanssen T.F., Boehme M., Codagnone M.G., Cussotto S., Fulling C., Golubeva A.V., Guzzetta K.E., Jaggard M., Long-Smith C.M., Lyte J.M., Martin J.A., Molinero-Perez A., Moloney G., Morelli E., Morillas E., O'Connor R., Cruz-Pereira J.S., Peterson V.L., Rea K., Ritz N.L., Sherwin E., Spichak S., Teichman E.M., van de Wouw M., Ventura-Silva A.P., Wallace-Fitzsimons S.E., Hyland N., Clarke G., Dinan T.G., *The microbiota-gut-brain axis*, *Physiological Reviews*, 99, 2019, s. 1877-2013.
16. Futoma A., *Wzajemne oddziaływanie mikroflory bakteryjnej i układu immunologicznego, wpływ diety* (praca licencjacka, Uniwersytet Jagelloński), 2019.
17. Heeney D.D., Gareau M.G., Marco M.L., *Intestinal Lactobacillus in health and disease, a driver or just along for the ride?*, *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 2018, s. 140-147.
18. Gulas E., Wysiadecki G., Strzelecki D., Gawlik-Kotelnicka O., Połgaj M., *Jak mikrobiologia może wpływać na psychiatrię? Powiązania między florą bakteryjną jelit a zaburzeniami psychicznymi*, *Psychiatria Polska*, 52, 2018, s. 1023-1039.
19. Rinninella E., Raoul P., Cintoni M., Franceschi F., Miggiano G.A.D., Gasbarrini A., Mele M.C., *What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases*, *Microorganisms*, 7, 2019, s. 14.
20. Vilchez-Vargas R., Salm F., Znalesniak E.B., Haupenthal K., Schanze D., Zenker M., Link A., Hoffmann W., *Profiling of the bacterial microbiota along the murine alimentary tract*, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 2022, s. 1783.

21. Hugenholtz F., de Vos W.M., *Mouse models for human intestinal microbiota research: a critical evaluation*, Cellular and Molecular Life Sciences, 75, 2018, s. 149-160.
22. Lagkouvardos I., Lesker T.R., Hitch T.C.A., Galvez E.J.C., Smit N., Neuhaus K., Wang J., Baines J.F., Abt B., Stecher B., Overmann J., Strowig T., Clavel T., *Sequence and cultivation study of Muribaculaceae reveals novel species, host preference, and functional potential of this yet undescribed family*, Microbiome, 7, 2019, s. 28.
23. Nagpal R., Wang S., Solberg W.L.C., Seshie O., Chung S.T., Shively C.A., Register T.C., Craft S., McClain D.A., Yadav H., *Comparative microbiome signatures and short-chain fatty acids in mouse, rat, non-human primate, and human feces*, Frontiers in Microbiology, 9, 2018, s. 2897.
24. Nguyen T.L., Vieira-Silva S., Liston A., Raes J., *How informative is the mouse for human gut microbiota research?*, Disease Models & Mechanisms, 8(1), 2015, s. 1-16.
25. Foster J.A., Rinaman L., Cryan J.F., *Stress & the gut-brain axis: regulation by the microbiome*, Neurobiology of Stress, 7, 2017, s. 124-136.
26. Tannock G.W., Savage D.C., *Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract*, Infection and immunity, 9, 1974, s. 591-598.
27. Bailey M.T., Dowd S.E., Galley J.D., Hufnagle A.R., Allen R.G., Lyte M., *Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation*, Brain, Behavior and Immunity, 25, 2011, s. 397-407.
28. Dinan T.G., Stilling R.M., Stanton C., Cryan J.F., *Collective unconscious: how gut microbes shape human behavior*, Journal of Psychiatric Research, 63, 2015, s. 1-9.
29. Macfarlane S., Macfarlane G.T., *Regulation of short-chain fatty acid production*, Proceedings of the Nutrition Society, 62, 2003, s. 67-72.
30. Sarkar A., Lehto S.M., Harty S., Dinan T.G., Cryan J.F., Burnet P.W., *Psychobiotics and the manipulation of bacteria-gut-brain signals*, Trends in Neurosciences, 39, 2016, s. 763-781.
31. Erny D., Hrabě de Angelis A.L., Jaitin D., Wieghofer P., Staszewski O., David, E., Keren-Shaul H., Mhlahkoi T., Jakobshagen K., Buch T., Schwierzeck V., Utermöhlen O., Chun E., Garrett W.S., McCoy K.D., Diefenbach A., Staeheli P., Stecher B., Amit I., Prinz M., *Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS*, Nature Neuroscience, 18, 2015, s. 965-977.
32. Alcock J., Maley C.C., Aktipis C.A., *Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms*, Bioessays, 36, 2019, s. 940-949.
33. Schneider S., Wright C.M., Heuckeroth R.O., *Unexpected roles for the second brain: enteric nervous system as master regulator of bowel function*, Annual Review of Physiology, 81, 2019, s. 235-259.
34. Lyte M., Cryan J.F., *Microbial endocrinology. The microbiota-gut-brain axis in health and disease*, Advances in Experimental Medicine and Biology, New York 2014, s. 39-71.
35. Mao Y.K., Kasper D.L., Wang B., Forsythe P., Bienenstock J., Kunze W.A., *Bacteroides fragilis polysaccharide A is necessary and sufficient for acute activation of intestinal sensory neurons*, Nature Communications, 4, 2013, s. 1-10.
36. De Vadder F., Grasset E., Mannerås Holm L., Karsenty G., Macpherson A.J., Olofsson L.E., Bäckhed F., *Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 115, 2018, s. 6458-6463.
37. Sudo N., Chida Y., Aiba Y., Sonoda J., Oyama N., Yu X. N., Kubo C., Koga Y., *Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice*, The Journal of Physiology, 558, 2004, s. 263-275.

38. Suarez A.N., Noble E.E., Kanoski S.E., *Regulation of memory function by feeding-relevant biological systems: following the breadcrumbs to the hippocampus*, *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 2019, s. 101.
39. Bravo J.A., Forsythe P., Chew M.V., Escaravage E., Savignac H.M., Dinan T.G., Bienenstock J., Cryan J.F., *Ingestion of Lactobacillus strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108, 2011, s. 16050-16055.
40. Kaelberer M.M., Buchanan K.L., Klein M.E., Barth B.B., Montoya M.M., Shen X., Bohórquez D.V., *A gut-brain neural circuit for nutrient sensory transduction*, *Science*, 361, 2018, s. 5236.
41. Dantzer R., *Cytokine, sickness behavior and depression*, *Immunology and Allergy Clinics*, 29, 2009, s. 247-264.
42. Rogers G.B., Keating D.J., Young R.L., Wong M.L., Licinio J., Wesselingh S., *From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways*, *Molecular Psychiatry*, 21, 2016, s. 738-748.
43. De Lartigue G., de La Serre C.B., Raybould H.E., *Vagal afferent neurons in high fat diet-induced obesity; intestinal microflora, gut inflammation and cholecystokinin*, *Physiology & Behavior*, 105, 2011, s. 100-105.
44. Wu G.D., Chen J., Hoffmann C., Bittinger K., Chen Y.Y., Keilbaugh S.A., Bewtra M., Knights D., Walters W.A., Knight R., Sinha R., Gilroy E., Gupta K., Baldassano R., Nessel L., Li H., Bushman F.D., Lewis J.D., *Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes*, *Science*, 334, 2011, s. 105-108.
45. Alcock J., Maley C.C., Aktipis C.A., *Is eating behavior manipulated by the gastrointestinal microbiota? Evolutionary pressures and potential mechanisms*, *Bioessays*, 36, 2014, s. 940-949.
46. McGuinness A.J., Davis J.A., Dawson S.L., Loughman A., Collier F., O'Hely M., Simpson C.A., Green J., Marx W., Hair C., Guest G., Mohebbi M., Berk M., Stupart D., Watters D., Jacka F.N., *A systematic review of gut microbiota composition in observational studies of major depressive disorder, bipolar disorder and schizophrenia*, *Molecular Psychiatry*, 27, 2022, s. 1920-1935.
47. Raison C.L., Borisov A.S., Majer M., Drake D.F., Pagnoni G., Woolwine B.J., Vogt G.J., Massung B., Miller A.H., *Activation of central nervous system inflammatory pathways by interferon-alpha. Relationship to monoamines and depression*, *Biological Psychiatry*, 65, 2009, s. 296-303.
48. Thomas J., Khanam R., Vohora D., *Augmentation of effect of venlafaxine by folic acid in behavioral paradigms of depression in mice. Evidence of serotonergic and pro-inflammatory cytokine pathways*, *Pharmacological Reports*, 68, 2016, s. 396-403.
49. Lebeña A., Vegas O., Gómez-Lázaro E., Arregi A., Garmendia L., Beitia G., Azpiroz A., *Melanoma tumors alter proinflammatory cytokine production and monoamine brain function, and induce depressive-like behavior in male mice*, *Behavioural Brain Research*, 272, 2014, s. 83-92.
50. Wang J., Jia Y., Li G., Wang B., Zhou T., Zhu L., Chen T., Chen Y., *The dopamine receptor D3 regulates lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice*, *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 21, 2018, s. 448-460.
51. Coates M.D., Johnson A.C., Greenwood van Meerveld B., Mawe G.M., *Effects of serotonin transporter inhibition on gastrointestinal motility and colonic sensitivity in the mouse*, *Neurogastroenterology & Motility*, 18, 2006, s. 464-471.
52. Coates M.D., Mahoney C.R., Linden D.R., Sampson J.E., Chen J., Blaszyk H., Crowell M.D., Sharkey K.A., Gershon M.D., Mawe G.M., *Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome*, *Gastroenterology*, 126, 2004, s. 1657-1664.

53. Kiecolt-Glaser J.K., Derry H.M., Fagundes C.P., *Inflammation: depression fans the flames and feasts on the heat*, American Journal of Psychiatry, 172, 2015, s. 1075-1091.
54. Koopman M., El Aidy S., *Depressed gut? The microbiota–diet–inflammation triad in depression*, Current Opinion in Psychiatry, 30, 2017, s. 369-377.
55. Le Floc’h N., Otten W., Merlot E., *Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications*, Amino Acids, 41, 2011, s. 1195-1205.
56. Keszthelyi D., Troost F.J., Jonkers D.M., van Donkelaar E.L., Dekker J., Buurman W.A., Masclee A.A., *Does acute tryptophan depletion affect peripheral serotonin metabolism in the intestine?*, The American Journal of Clinical Nutrition, 95, 2012, s. 603-608.
57. Richard D.M., Dawes M.A., Mathias C.W., Acheson A., Hill-Kapturczak N., Dougherty D.M., *L-tryptophan: basic metabolic functions, behavioral research and therapeutic indications*, International Journal of Tryptophan Research, 2, 2009, s. 45-60.
58. Catena-Dell’Osso M., Rotella F., Dell’Osso A., Fagiolini A., Marazziti D., *Inflammation, serotonin and major depression*, Current Drug Targets, 14, 2013, s. 571-577.
59. Gál E.M., Sherman A.D., *L-kynurenine: its synthesis and possible regulatory function in brain*, Neurochemical Research, 5, 1980, s. 223-239.
60. Dantzer R., *Role of the Kynurenine Metabolism Pathway in Inflammation-Induced Depression: Preclinical Approaches*. In *Inflammation-Associated Depression: Evidence, Mechanisms and Implications*. Current Topics in Behavioral Neurosciences, Current Topics in Behavioral Neurosciences, 31, 2016, s. 117-138.
61. Husi H., *NMDA receptors, neural pathways, and protein interaction databases*, International Review of Neurobiology, 61, 2004, s. 49-77.
62. Zhou Q., Nicholas Verne G., *NMDA receptors and colitis: basic science and clinical implications*, Reviews in Analgesia, 10, 2008, s. 33-43.
63. Varga G., Érces D., Fazekas B., Fülöp M., Kovács T., Kaszaki J., Fülöp F., Vécsei L., Boros M., *N-methyl-D-aspartate receptor antagonism decreases motility and inflammatory activation in the early phase of acute experimental colitis in the rat*, Neurogastroenterology & Motility, 22, 2010, s. 217.
64. Erhardt S., Lim C.K., Linderholm K.R., Janelidze S., Lindqvist D., Samuelsson M., Lundberg K., Postolache T.T., Träskman-Bendz L., Guillemin G.J., *Connecting inflammation with glutamate agonism in suicidality*, Neuropsychopharmacology, 38, 2013, s. 743-752.
65. Pittenger C., Sanacora G., Krystal J.H., *The NMDA receptor as a therapeutic target in major depressive disorder*, CNS Neurol. Disord. Drug Targets, 6, 2007, s. 101-115.
66. Hall J., Trent S., Thomas K.L., O’Donovan M.C., Owen M.J., *Genetic risk for schizophrenia. Convergence on synaptic pathways involved in plasticity*, Biological Psychiatry, 77, 2015, s. 52-58.
67. Pittenger C., Duman R.S., *Stress, depression and neuroplasticity. A convergence of mechanisms*, Neuropsychopharmacology, 33, 2008, s. 88-109.
68. Hardingham G.E., Fukunaga Y., Bading H., *Extrasynaptic NMDARs oppose synaptic NMDARs by triggering CREB shut-off and cell death pathways*, Nature Neuroscience, 5, 2002, s. 405-414.
69. Fava M., *Diagnosis and definition of treatment-resistant depression*, Biological Psychiatry, 53, 2003, s. 649-659.
70. Ionescu D.F., Rosenbaum J.F., Alpert J.E., *Pharmacological approaches to the challenge of treatment-resistant depression*, Dialogues in Clinical Neuroscience, 17, 2015, s. 111-126.
71. Randolph C., Bann C., Gaynes B.N., Lux L., Gartlehner G., Asher G., Forman-Hoffman V., Green J., Boland E., Weber R.P., Randolph C., Bann C., Coker-Schwimmer E., Viswanathan M., Lohr K.N., *Defining treatment-resistant depression*, Depression and Anxiety, 37, 2020, s. 134-145.

72. Berman R.M., Cappiello A., Anand A., Oren D.A., Heninger G.R., Charney D.S., Krystal J.H., *Antidepressant effects of ketamine in depressed patients*, Biological Psychiatry, 47, 2000, s. 351-354.
73. Zarate C.A.J., Singh J.B., Carlson P.J., Brutsche N.E., Ameli R., Luckenbaugh D.A., Charney D.S., Manji H.K., *A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression*, Archives of General Psychiatry, 63, 2006, s. 856-864.
74. Diaz Granados N., Ibrahim L.A., Brutsche N.E., Ameli R., Henter I.D., Luckenbaugh D.A., Machado-Vieira R., Zarate C.A. jr., *Rapid resolution of suicidal ideation after a single infusion of an N-methyl-D-aspartate antagonist in patients with treatment-resistant major depressive disorder*, The Journal of Clinical Psychiatry, 71, 2010, s. 1605-1611.
75. Krystal J.H., Karper L.P., Seibyl J.P., Freeman G.K., Delaney R., Bremner J.D., Heninger G.R., Bowers M.B.J., Charney D.S., *Subanesthetic effects of the noncompetitive NMDA antagonist, ketamine, in humans. Psychotomimetic, perceptual, cognitive and neuroendocrine responses*, Archives of General Psychiatry, 51, 1994, s. 199-214.
76. Gershon M.D., *Nerves, reflexes and the enteric nervous system*, Journal of Clinical Gastroenterology, 39, 2005, s. 184-193.
77. Kesika P., Suganthy N., Sivamaruthi B.S., Chaiyasut C., *Role of gut-brain axis, gut microbial composition, and probiotic intervention in Alzheimer's disease*, Life Sciences, 264, 2021, s. 118627.
78. Wu S., Liu X., Jiang R., Yan X., Ling Z., *Roles and mechanisms of gut microbiota in patients with Alzheimer's disease*, Frontiers in Aging Neuroscience, 13, 2021, s. 650047.
79. Giovannini M.G., Lana D., Traini C., Vannucchi M.G., *The microbiota-gut-brain axis and Alzheimer disease. from dysbiosis to neurodegeneration. Focus on the central nervous system glial cells*, Journal of Clinical Medicine, 10, 2021, s. 2358.
80. Doifode T., Giridharan V.V., Generoso J.S., Bhatti G., Collodel A., Schulz P.E., Forlenza O.V., Barichello T., *The impact of the microbiota-gut-brain axis on Alzheimer's disease pathophysiology*, Pharmacological Research, 164, 2021, s. 105314.
81. Narengaowa, Kong W., Lan F., Awan U.F., Qing H., Ni J., *The oral-gut-brain AXIS. The influence of microbes in Alzheimer's disease*, Frontiers in Cellular Neuroscience, 15, 2021, s. 633735.
82. Zhan X., Stamova B., Jin L.W., DeCarli C., Phinney B., Sharp F.R., *Gram-negative bacterial molecules associate with Alzheimer disease pathology*, Neurology, 87, 2016, s. 2324-2332.
83. Pappolla M.A., Perry G., Fang X., Zagorski M., Sambamurti K., Poeggeler B., *Indoles as essential mediators in the gut-brain axis, Their role in Alzheimer's disease*, Neurobiology of Disease, 156, 2021, s. 10540.
84. Aaldijk E., Vermeiren Y., *The role of serotonin within the microbiota-gut-brain axis in the development of Alzheimer's disease. A narrative review*, Ageing Research Reviews, 75, 2022, s. 101556.
85. Jankovic J., *Parkinson's disease: clinical features and diagnosis*, Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 79, 2008, s. 368-376.
86. Dogra N., Mani R.J., Katare D.P., *The gut-brain axis: two ways signaling in Parkinson's disease*, Cellular and Molecular Neurobiology, 42, 2022, s. 315-332.
87. Khedr E.M., Ali A.M., Deaf E., Hassan H.M., Alaa A., Gamea A., *Gut microbiota in Parkinson's disease patients: hospital-based study*, The Egyptian Journal of Neurology, Psychiatry and Neurosurgery, 57, 2021, s. 153.
88. Jukic A., Bakiri L., Wagner E.F., Tilg H., Adolph T.E., *Calprotectin: from biomarker to biological function*, Gut, 70, 2021, s. 1978-1988.
89. Aho V.T.E., Houser M.C., Pereira P.A.B. Chang J., Rudi K., Paulin L., Hertzberg V., Auvinen P., Tansey M.G., Scheperjans F., *Relationships of gut microbiota, short-chain fatty acids, inflammation, and the gut barrier in Parkinson's disease*, Molecular Neurodegeneration, 16, 2021, s. 6.

90. Eidson L.N., Kannarkat G.T., Barnum C.J., Chang J., Chung J., Caspell-Garcia C., Taylor P., Mollenhauer B., Schlossmacher M.G., Ereshefsky L., Yen M., Kopil C., Frasier M., Marek K., Hertzberg V.S., Tansey M.G., *Candidate inflammatory biomarkers display unique relationships with alpha-synuclein and correlate with measures of disease severity in subjects with Parkinson's disease*, Journal of Neuroinflammation, 14, 2017, s. 164.
91. Zhang T., Wang T., Chen X., Zhao Z., Chen Z., *Gut microbiota relieves inflammation in the substantia nigra of chronic Parkinson's disease by protecting the function of dopamine neurons*, Experimental and Therapeutic Medicine, 23, 2022, s. 52.
92. Patrono E., Svoboda J., Stuchlík A., *Schizophrenia, the gut microbiota and new opportunities from optogenetic manipulations of the gut-brain axis*, Behavioral and Brain Functions, 17, 2021, s. 7.
93. Gondalia S., Parkinson L., Stough C., Scholey A., *Gut microbiota and bipolar disorder: a review of mechanisms and potential targets for adjunctive therapy*, Psychopharmacology, 236, 2019, s. 1433-1443.
94. McIntyre R.S., Subramaniapillai M., Shekotikhina M., Carmona N.E., Lee Y., Mansur R.B., Brietzke E., Fus D., Coles A.S., Iacobucci M., Park C., Potts R., Amer M., Gillard J., James C., Anglin R., Surette M.G., *Characterizing the gut microbiota in adults with bipolar disorder: a pilot study*, Nutritional Neuroscience, 24, 2021, s. 173-180.
95. Ortiz G.G., Pacheco-Moisés F.P., Macías-Islas M.Á., Flores-Alvarado L.J., Mireles-Ramírez M.A., González-Renovato E.D., Hernández-Navarro V.E., Sánchez-López A.L., Alatorre-Jiménez M.A., *Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis*, Archives of Medical Research, 45, 2014, s. 687-697.
96. Zipser B.D., Johanson C.E., Gonzalez L., Berzin T.M., Tavares R., Hulette C.M., Vitek M.P., Hovanesian V., Stopa E.G., *Microvascular injury and blood-brain barrier leakage in Alzheimer's disease*, Neurobiology of Aging, 28, 2007, s. 977-986.
97. Ebrahimi C.M., Kern J.W., Sheen T.R., Ebrahimi-Fardooee M.A., van Sorge N.M., Schneewind O., Doran K. S., *Penetration of the blood-brain barrier by Bacillus anthracis requires the pXO1-encoded BslA protein*, Journal of Bacteriology, 191, 2009, s. 7165-7173.
98. Schuchat A., Robinson K., Wenger J.D., Harrison L.H., Farley M., Reingold A.L., Perkins B.A., *Bacterial meningitis in the United States in 1995*, New England Journal of Medicine, 337, 1997, s. 970-976.
99. Drevets D.A., Leenen P.J., Greenfield R.A., *Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria*, Clinical Microbiology Reviews, 17, 2004, s. 323-347.
100. Gründler T., Quednau N., Stump C., Orian-Rousseau V., Ishikawa H., Wolburg H., Schwerk C., *The surface proteins InlA and InlB are interdependently required for polar basolateral invasion by Listeria monocytogenes in a human model of the blood-cerebrospinal fluid barrier*, Microbes and Infection, 15, 2013, s. 291-301.
101. Peltola H., *Worldwide Haemophilus influenzae type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates*, Clinical Microbiology Reviews, 13, 2000, s. 302-317.
102. Swords W.E., Ketterer M.R., Shao J., Campbell C.A., Weiser J.N., Apicella M.A., *Binding of the non-typeable Haemophilus influenzae lipooligosaccharide to the PAF receptor initiates host cell signalling*, Cellular Microbiology, 3, 2001, s. 525-536.
103. Hudault S., Guignot J., Servin A.L., *Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection*, Gut, 49, 2001, s. 47-55.
104. Prasadarao N.V., Blom A.M., Villoutreix B.O., Linsangan L.C., *A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein mediates serum resistance of Escherichia coli K1*, Journal of Immunology, 169, 2002, s. 6352-6360.

Wpływ mikrobiomu jelitowego na funkcjonowanie układu nerwowego zwierząt i ludzi – przegląd najnowszych badań

Streszczenie

Oś mózgowo-jelitowa to szlak sygnalizacyjny złożony z sieci neuronów, łączący układ pokarmowy z centralnym układem nerwowym. Jeden z kluczowych elementów osi stanowi mikrobiota jelitowa, która wpływa na regulację bólu, lęku, zaburzeń funkcji poznawczych oraz nastroju poprzez stymulację odpowiednich obszarów systemu nerwowego. Dzięki temu może pośrednio lub bezpośrednio wiązać się z rozwojem zaburzeń lękowych i depresyjnych, jak również z dysfunkcjami ze spektrum autyzmu, chorobą Parkinsona i Alzheimera. Skład mikrobioty jelitowej u osób ze zdiagnozowanymi zaburzeniami psychicznymi znacznie różni się od składu mikrobioty jelitowej osób zdrowych i związany jest przeważnie z występowaniem dysbiozy jelitowej oraz zespołu nieszczelnego jelita. Poniższa praca ma na celu zestawienie najnowszych badań skupiających się na zmianach mikrobioty jelitowej wraz z występowaniem chorób psychicznych zarówno u ludzi, jak i zwierząt, a także wskazanie możliwych dróg terapii chorób neurodegeneracyjnych z zastosowaniem innowacyjnych metod takich jak przeszczep mikrobioty jelitowej.

Słowa kluczowe: mikrobiom, oś microbiota–jelito–mózg

Influence of the gut microbiome on the function of the nervous system of animals and humans – a review of the latest research

Abstract

The gut-brain axis is a signaling pathway made of networks of neurons that connects the digestive system to the central nervous system. One of the key elements of the gut-brain axis is the gut microbiota, which regulates pain, anxiety, cognitive dysfunction, and mood by stimulating specific areas of the nervous system. It is associated with the development of anxiety and depressive disorders as well as with autism spectrum disorders, Parkinson and Alzheimer disease. The composition of the gut microbiota in people with diagnosed mental disorders differs significantly from the healthy ones and is usually associated with the occurrence of intestinal dysbiosis and leaky gut syndrome. The following paper aims to summarize the latest research focusing on changes in the gut microbiota and the occurrence of mental illness in both humans and animals and to show possible innovative methods of their treatment like faecal microbiota transplant.

Keywords: microbiom, gut-brain axis

Mikrobiologiczne zanieczyszczenia w produkcji piwa niepasteryzowanego

1. Wprowadzenie

Piwo to niskoalkoholowy napój powstający na skutek przemian metabolicznych komórek drożdży. Od wieków jest cenione za trwałość i stabilność biologiczną – wynikające z faktu, że jest niekorzystnym środowiskiem dla rozwoju wielu mikroorganizmów. Powodem tego jest przede wszystkim obecność alkoholu etylowego (0,5-10% wag.) i wysokiego stężenia dwutlenku węgla (około 0,5%) będących produktem fermentacji drożdży, ale także izo- α -kwasów pochodzących z chmielu, niskiego pH (3,8-4,7) oraz niskiego poziomu tlenu [1-3]. Pomimo tego są drobnoustroje zdolne nie tylko w piwie przeżyć, ale także się w nim namnożyć. Większość mikroorganizmów ginie niedługo po dostaniu się do piwa, część może przetrwać kilka dni lub namnażać się do pewnego krytycznego momentu. Jest także grupa mikroorganizmów, która namnaża się w piwie aż do momentu widocznych zmian w samym napoju. Większość drobnoustrojów namnaża się w przeciągu 10 dni, jednak czas ten jest zależny od temperatury otoczenia [4].

Rozwój niepożądanych mikroorganizmów w piwie może skutkować pojawieniem się licznych wad produktu (zmiany barwy piwa czy zmętnienie), ale też zmian smakowych i zapachowych [1, 5]. Ryzyko infekcji wzrasta w przypadku piw rzemieślniczych, a przyczyną kontaminacji są błędy wynikające z defektów technicznych lub procesowych w browarze, a także ogólnej higieny personelu i zakładu [4].

Celem tej pracy jest omówienie zagadnień związanych z zanieczyszczeniami mikrobiologicznymi powstającymi podczas produkcji piw niepasteryzowanych, z uwzględnieniem drobnoustrojów – będących najczęściej przyczyną psucia się piwa – oraz metod ich wykrywania.

2. Zanieczyszczenia mikrobiologiczne w produkcji piw

Mikroorganizmy pełnią kluczową rolę na każdym etapie produkcji piwa, poczynając od upraw jęczmienia, skończywszy na leżakowaniu produktu końcowego. Większość reakcji, wynikających z ich aktywności, jest pożądana. Niektóre zaś stanowią zagrożenie dla jakości produktu końcowego i muszą być ściśle kontrolowane. W zależności od etapu produkcji, piwo może ulec zakażeniu przez odmienne szczepy bakterii bądź grzybów z uwagi na różnorodność warunków środowiskowych i dodawanych komponentów [6].

W przemyśle piwowarskim mikroorganizmy odpowiadające za psucie piwa definiuje się jako te, które nie zostały wprowadzone celowo, a które są w stanie przetrwać i namnażać się w brzeczce piwnej, brzeczce fermentującej, piwie po filtracji lub w piwie pakowanym. Wykazano, że wiele szczepów bakterii zachowuje żywotność w piwie przez dłuższy czas, a zawartość tlenu jest głównym czynnikiem kontrolującym ich wzrost [7, 8].

¹ s.andrzejczak-grzadko@wnb.uz.zgora.pl, Katedra Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski, www.wnb.uz.zgora.pl.

² Katedra Biotechnologii, Instytut Nauk Biologicznych, Uniwersytet Zielonogórski, www.wnb.uz.zgora.pl.

2.1. Bakterie Gram-ujemne

Bakterie Gram-ujemne posiadają hydrofobową błonę komórkową, która czyni je odpornymi na związki goryczkowe obecne w piwie. Jednak tylko nieliczne bakterie Gram-ujemne są odpowiedzialne za psucie piwa i dzieli się je na dwie grupy. Pierwszą z nich stanowią beztlenowe bakterie z rodzaju *Pectinatus*, *Megasphaera*, *Propionispira* oraz *Selenomonas*. Do drugiej kategorii należą Gram-ujemne bakterie tlenowe i względnie beztlenowe, takie jak rodzina *Enterobacteriaceae*, *Zymomonas* spp., oraz bakterie kwasu octowego (AAB), między innymi *Acetobacter* spp. i *Gluconobacter* spp. [9].

Bakterie kwasu octowego metabolizują etanol do kwasu etanowego (octowego), co nadaje piwu winny posmak. Z uwagi na to, optimum ich aktywności waha się pomiędzy pH wynoszącym 5 a 6,5, ale ich wzrost może zachodzić również przy pH równym od 3 do 4. Wzrost bakterii *Gluconobacter* spp. prowadzi również do powstawania na powierzchni piwa otoczki, która w produkcie zawierającym tlen powoduje zmętnienie. Niektóre szczepy *Gluconobacter* spp. wytwarzają duże ilości dekstranu i lewanu, co skutkuje wysoką lepkością zanieczyszczonego piwa, a w efekcie prowadzi do jego zbrylenia. *Gluconobacter oxydans* produkują dehydrogenazy przekształcające cukry i kwasy cukrowe w szybkim tempie, co wpływa na obniżenie słodczy w produkcji. Rozmnażanie bakterii kwasu octowego, wraz z drożdżami, dodatkowo zapewnia mikroaerofilne i częściowo beztlenowe środowisko, a zatem podstawy do wzrostu Gram-ujemnych bakterii beztlenowych, takich jak *Pectinatus* spp. i *Megasphaera* spp. [10-12].

Kilka rodzajów należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, takich jak *Obesumbacterium*, *Hafnia*, *Klebsiella* i *Citrobacter* jest związanych z psuciem się niesfermentowanej i fermentującej brzeczki. Bakterie te nie są zwykle zdolne do wzrostu w gotowym piwie, ale czasami znajdują się w początkowych etapach procesu warzenia piwa, powodując niepożądane zmiany smaku w produkcie końcowym. W piwach typu *ale* lub w młodych piwach, do których został dodany cukier, mogą bytować *Zymomonas* spp. Te fakultatywne beztlenowce, zdolne do wzrostu w kwaśnym środowisku i w stężeniu alkoholu poniżej 10%, wytwarzają stosunkowo duże ilości siarkowodoru i aldehydu octowego [13-14].

Do najbardziej niebezpieczniejszych drobnoustrojów, odpowiadających za psucie piwa (głównie niepasteryzowanego), należą beztlenowe z rodzaju *Pectinatus*. Ich obecność w produkcie odznacza się nieprzyjemnym zapachem wynikającym z wytwarzania siarkowodoru, merkaptanu metylu oraz szeregu kwasów tłuszczowych. *Pectinatus* spp. wydalają również kwasy organiczne takie jak: octowy, mlekowy, propionowy i bursztynowy. Z tego względu są zdolne do wzrostu i rozwoju w pH wynoszącym od 3,5 do 6 [2, 3].

Innym rodzajem bakterii beztlenowych i kwasolubnych są ziarniaki *Megasphaera* spp. Nie są one zdolne do wzrostu w środowisku zawierającym alkohol powyżej 2,8%, ale ich obecność w produkcie obrazuje zmętnienie piwa oraz charakterystyczny zapach wytwarzanego przez nie siarkowodoru. Do ich reprezentatywnych metabolitów należą również acetoina i kwasy organiczne, między innymi masłowy. Zaś bakterie z rodzaju *Selenomonas* to pałeczki, które metabolizują glukozę do kwasu octowego, mlekowego i propionowego. Bezwzględnie beztlenowe pałeczki *Propionispira* spp. natomiast swoją nazwę zawdzięczają wytwarzaniu, obok kwasu octowego, kwasu propionowego [15].

2.2. Bakterie Gram-dodatnie

Ze względu na niedobór substancji odżywczych, takich jak aminokwasy i cukry, piwo jest środowiskiem nieprzyjawnym dla większości mikroorganizmów, a szczególnie dla bakterii Gram-dodatnich. Bakterie kwasu mlekowego (LAB) – obejmujące te z rodzaju *Lactobacillus* i *Pediococcus* – stanowią większość bakterii Gram-dodatnich, którym udaje się wzrastać i namnażać w takich warunkach [2, 3].

Bakterie z grupy *Lactobacillus* są najbardziej rozpowszechnionymi bakteriami powodującymi zakażenie piwa, niezależnie od jego gatunku. Różnią się jednak w obrębie rodzaju pod względem zdolności do wzrostu w piwie oraz tolerancją na goryczkowe związki chmielu. Aktywność powodująca psucie się piwa różni się znacznie w zależności od szczepu i pochodzenia. Niektóre szczepy rozwijają się spontanicznie we wszystkich rodzajach piwa, inne mogą wzrastać tylko w piwach słabo chmielonych. *Lactobacillus brevis* to bakterie najczęściej występujące w piwie – do 50% wszystkich przypadków. Te heterofermentatywne bakterie są wysoce tolerancyjne wobec izo- α -kwasów i rosną optymalnie w temperaturze 30°C i pH wynoszącym 4-5. *Lactobacillus lindneri* są fizjologicznie podobne do *Lactobacillus brevis*, jednak odznaczają się wysoką aktywnością fermentowania dekstryn i skrobi, co powoduje nadmierne odfermentowanie produktu. *Lactobacillus buchneri* wyróżniają się możliwością do fermentowania melecytozy, natomiast *Lactobacillus casei* mogą produkować diacetyl, co nadaje piwu maślany posmak [16, 17].

Wysoka kwasowość piwa oraz maślany aromat mogą być też wynikiem metabolicznej aktywności *Pediococcus* spp. Te homofermentatywne ziarniaki mogą zanieczyszczać piwo na każdym etapie jego produkcji. Za maślany aromat odpowiada diacetyl, a jego stężenie jest zależne od występującego w produkcji gatunku *Pediococcus* – największą aktywnością w tej materii wyróżnia się *P. damnosus*. Niektóre szczepy *Pediococcus* spp. są zdolne do syntezy egzopolisacharydów (EPS), czyli biopolimerów pozakomórkowych, które mogą być wydzielane przez bakterie, np. w postaci śluzu [18].

Jednym z nielicznych gatunków bakterii Gram-dodatnich – występujących w piwie – nienależących do bakterii kwasu mlekowego jest rodzaj *Kocuria*. W produktach o niskim stężeniu etanolu i związków goryczowych chmielu namnażają się *Kocuria kristinae*, nadając piwu owocowy aromat. Są to mezofilne bakterie metabolizujące cukry do kwasów organicznych, co odróżnia je od reszty bakterii z tego rodzaju [19].

2.3. Dzikie drożdże i grzyby strzępkowe

Drożdże stanowią najistotniejszą grupę mikroorganizmów uczestniczących w produkcji piwa. Dzieli się je na drożdże fermentacji dolnej (*Saccharomyces pastorianus*) oraz drożdże fermentacji górnej (*Saccharomyces cerevisiae*). Różnią się one głównie optymalną temperaturą wzrostu, ale także odpornością na warunki środowiskowe, zapotrzebowaniem na substraty niezbędne do wzrostu i rozwoju, zdolnością do flokulacji oraz wytwarzaniem produktów ubocznych [1, 3, 20]. Wszystkie szczepy nienależące do wymienionych powyżej uznawane są za drożdże dzikie, czyli niepożądane w produkcji piwa. Ich różnorodność w kontekście psucia piwa sprawia, że nie można podać ich ogólnego opisu, jednak dzielą się na drożdże z rodzaju *Saccharomyces* oraz pozostałe rodzaje drożdży. Wyróżniamy takie, które nie stanowią same w sobie zagrożenia, jednak mogą konkurować ze szczepami piwowarskimi, co skutkuje obniżeniem ich aktywności metabolicznej, a w rezultacie zaburzeniem flokulacji i utrudnionym klarowaniem piwa [5].

Drożdże produkują szereg metabolitów, co w przypadku tych dzikich ma niekorzystny wpływ na właściwości organoleptyczne produktu. Nadmierna ilość drożdży podczas dojrzewania piwa może prowadzić do nadprodukcji diacetylu, co skutkuje niekorzystnym, maślanym aromatem. Dzikie szczepy drożdży są skłonne do większej aktywności pektynoesteraz aniżeli szczepy drożdży piwowarskich, co poza zmianą konsystencji piwa, może mieć silne skutki zdrowotne. Jak podaje literatura, gatunki drożdży takie jak *Candida versatilis*, *Hansenula anomala*, *Rhodotorula glutinis* i *Brettanomyces anomalus* wykazują aktywność metaboliczną prowadzącą np. do obecności azotynów w piwie [1, 8].

Obecność grzybów strzępkowych, takich jak *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp. w produkcji jest najprawdopodobniej przyczyną źle przechowywanego słodu. Może to skutkować nie tylko charakterystycznym nieprzyjemnym, zapachem piwa, ale może także mieć negatywne skutki zdrowotne z racji produkowanych mykotoksyn. Inne metabolity wtórne (polipeptydy i peptydoglukany), syntetyzowane podczas słodowania, są przyczyną nadmiernego wypieniania piwa [21].

3. Metody wykrywania zanieczyszczeń mikrobiologicznych w produkcji piw

W celu zminimalizowania ryzyka zanieczyszczenia mikrobiologicznego konieczne jest zastosowanie odpowiednich metod monitorowania produkcji piwa, co pozwala precyzyjnie kontrolować i oceniać potencjalne zakażenia. Metody te można podzielić na jakościowe i ilościowe. Te pierwsze pozwalają na wykrycie i identyfikację konkretnych szczepów oraz ich metabolitów, to zaś prowadzi do potwierdzenia lub wykluczenia ich obecności w produkcji. Ilościowe oznaczanie drobnoustrojów wskazuje na skalę zanieczyszczenia oraz pozwala stwierdzić, czy jest ono na dopuszczalnym poziomie względem obowiązujących norm. Metody te mogą być tradycyjne lub wykorzystywać szybsze, nowoczesne techniki [22, 23].

3.1. Tradycyjne metody detekcji

Do konwencjonalnych metod badania piwa zalicza się posiewy na adekwatne podłoża oraz ich mikroskopowe analizy. Wymaga to stosowania długotrwałych i wieloetapowych procedur. W zależności od tego, w kierunku których bakterii wykonywane są badania, próbę należy posiać na odpowiednie, dedykowane podłoża mikrobiologiczne. W przypadku drobnoustrojów chorobotwórczych stosuje się podłoża różnicujące oraz analizuje się ich cechy fizjologiczne i morfologiczne. W tym celu wykonuje się – na podstawie wymagań pokarmowych – testy biochemiczne. Tradycyjna, rzetelna identyfikacja trwa kilka dni, co w sytuacji zagrożenia mikrobiologicznego może opóźnić wdrożenie odpowiednich procedur. Konwencjonalne metody detekcji uznawane są za czułe, przy jednoczesnych niskich kosztach analizy. Natomiast są one pracochłonne i czasochłonne oraz wymagają dysponowania pełnym wyposażeniem laboratoryjnym [24].

3.2. Nowoczesne metody detekcji

Nowoczesne metody wykrywania mikrobiologicznych zanieczyszczeń w produkcji piwa wykorzystują przede wszystkim techniki biologii molekularnej, ale także inżynierii genetycznej. Są przeznaczone do szybkiego wykrywania bakterii i obejmują metody mikroskopii fluorescencyjnej, wykrywanie określonych metabolitów, metody serologiczne i metody oparte na analizie DNA.

Jedną z najszerzej wykorzystywanych metod wykrywania i identyfikacji drobnoustrojów jest technika PCR (ang. *polymerase chain reaction* – reakcja łańcuchowa

polimerazy), a niepodważalną jej zaletą jest uzyskanie wyniku w stosunkowo krótkim czasie. Pozwala ona odróżniać od siebie gatunki mikroorganizmów, a także szczepy tego samego gatunku różniące się np. opornością na związki chmielu. Klasyczna metoda PCR wymaga przeprowadzenia elektroforezy żelowej w celu analizy uzyskanych fragmentów DNA. Natomiast w przypadku metody PCR w czasie rzeczywistym (qPCR – *quantitative* PCR lub *real-time* PCR) nie ma konieczności wykonywania elektroforezy, ponieważ ilość uzyskanych fragmentów DNA jest wprost proporcjonalna do intensywności fluorescencji obserwowanej w czasie reakcji, co wynika z zastosowania barwników, np. SYBR Green. Pozwala to na szybszą analizę próbki i otrzymanie wyniku w ciągu kilku godzin [25, 26].

Do identyfikacji konkretnych gatunków czy też szczepów mikroorganizmów związanych z psuciem piwa wykorzystuje się również technikę RFLP (ang. *restriction fragment length polymorphism* – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych). Zastosowanie odpowiednich enzymów restrykcyjnych pozwala otrzymać tzw. DNA *fingerprint* i na jego podstawie zidentyfikować nieporządane drobnoustroje [27]. Metodą wysoce specyficzną i wykorzystującą specjalnie stworzone sondy do wykrywania bakterii psujących piwo, czyli *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus damnosus*, a także dzikich szczepów *Saccharomyces cerevisiae*, jest hybrydyzacja DNA. Odpowiednio zaprojektowane sondy DNA pozwalają zidentyfikować konkretną i poszukiwaną sekwencję DNA w próbce i na jej podstawie zidentyfikować mikroorganizmy. Metoda ta jest niestety czasochłonna i zbyt skomplikowana do bezpośredniego wykorzystania w browarze, jednak istnieje możliwość stworzenia zestawów komercyjnych do wykrywania konkretnych drobnoustrojów psujących piwo, tak jak ma to miejsce w przypadku testów do wykrywania np. *Listeria monocytogenes* w próbkach żywności [28].

Do pozostałych metod wykorzystywanych w analizie mikrobiologicznej zanieczyszczeń w produkcji piwa należą np. testy biochemiczne. Charakteryzują się one 95% czułością i krótkim czasem analizy, a sprowadzają się do wykorzystania substratów chromogennych. Do metod immunologicznych zalicza się wiązanie antygenów powierzchniowych, zewnątrzkomórkowych toksyn oraz całych komórek z przeciwciałami, które mogą być rekombinowane, monoklonalne oraz poliklonalne. Techniki wykorzystujące zjawisko fluorescencji pozwalają na ustalenie liczebności komórek na skutek wiązania DNA z barwnikiem, który selektywnie absorbuje i emituje światło o określonej długości fali. Pomiar impedancji to z kolei metoda polegająca na obserwacji zmian przewodności prądu, które zachodzą w środowisku z racji namnażania się drobnoustrojów [29, 30].

4. Podsumowanie

Piwa niepasteryzowane i niefiltrowane można uznać za „produkt trudny” ze względu na jego charakter. Pomimo składu w napojach tych mogą przetrwać i namnażać się liczne gatunki mikroorganizmów. Do zanieczyszczenia może dojść na różnych etapach zarówno produkcji, jak i konfekcjonowania. Duży wpływ na to ma również styl piwa, warunki prowadzonej fermentacji i zastosowane składniki. Wyraźne zanieczyszczenia, mające wpływ na cechy produktu, są wykrywane w piwie dopiero po kilku tygodniach. Jednocześnie w tym czasie pojawiają się zmiany widoczne gołym okiem, tj. zmętnienie, wypienianie, czuć też zmianę zapachu. Warunki przechowywania piwa są zatem również bardzo istotnym czynnikiem, który znacząco przyczynia się do stopnia zanieczyszczenia mikrobiologicznego piwa.

Literatura

1. Tuszyński T., Makarewicz M., *Drożdże dzikie w przemyśle piwowarskim – zagrożenia i wybrane metody wykrywania*, Żywność. Technologia. Jakość, 3(16), 1998, s. 43-57.
2. Sakamoto K., Konings W.N., *Beer spoilage bacteria and hop resistance*, International Journal of Food Microbiology, 89(2-3), 2003, s. 105-124.
3. Satora P., Tuszyński T., *Zakażenia mikrobiologiczne piwa*, Laboratorium – przegląd ogólnopolski, 4, 2004, s. 13-18.
4. Żyrek E., *Zagrożenia mikrobiologiczne przy „aseptycznym” rozlewie piwa – przyczyny infekcji na rynku, zapobieganie*, Agro Przemysł, 6, 2008, s. 23-28.
5. Esmaeili S., Mogharrabi M., Safi F., Sohrabvandi S., Mortazavian A., Bagheripoor-Fallah N., *The common spoilage microorganisms of beer: occurrence, defects and determination – a review*, Carpathian Journal of Food Science and Technology, 7(4), 2015, s. 68-73.
6. Bokulich N.A., Bamforth C.W., *The microbiology of malting and brewing*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, 77(2), 2013, s. 157-172.
7. Jespersen L., Jakobsen M., *Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection*, International Journal of Food Microbiology, 33(1), 1996, s. 139-155.
8. Hutzler M., Müller-Auffermann K., Koob J., Riedl R., Jacob F., *Beer spoilage microorganisms. A current overview*, Brauwelt International, 2013, s. 23-25.
9. Paradh A.D., *Gram-negative spoilage bacteria in brewing*, [w:] Hill A.E. (red.), *Brewing microbiology. Managing microbes, ensuring quality and valorising waste*, Woodhead publishing series in food science, technology and nutrition, 2015, s. 175-194.
10. Ingledew W.M., *Effect of bacterial contamination on beer. A review*, J Am Soc Brew Chem, 37, 1979, s. 145-150.
11. Storgårds E., *Process hygiene control in beer production and dispensing*, VTT, Technical Research Centre of Finland, Espoo 2000, s. 15-84.
12. Michalak M., Ostanek P., Polak-Berecka M., *Zanieczyszczenia mikrobiologiczne piwa*, [w:] Nyckowski J., Leśny J. (red.), *Żywnienie i żywność*, Młodzi Naukowcy, Poznań 2019, s. 86-91.
13. Priest A.G., Hammond J.R.M., Steward G.S.A.B., *Biochemical and molecular characterization of *Obesumbacterium proteus*, a common contaminant of brewing yeasts*, Appl Environ Microbiol, 60, 1994, s. 1635-1640.
14. Van Vuuren H.J.J., Priest F.G., *Gram-negative brewery bacteria*, [w:] Priest F.G., Campbell I. (red.), *Brewing microbiology*, third edition, Springer, New York 2003, s. 219-242.
15. Priest F.G., *Gram-positive brewery bacteria*, [w:] Priest F.G., Campbell I. (red.), *Brewing microbiology*, third edition, Springer, New York 2003, s. 181-212.
16. Suzuki K., *Gram-positive spoilage bacteria in brewing*, [w:] Hill A.E. (red.), *Brewing microbiology. Managing microbes, ensuring quality and valorising waste*, Elsevier, 2015, s. 141-173.
17. Priest F.G., *Gram-positive brewery bacteria*, [w:] Priest F.G., Campbell I. (red.), *Brewing microbiology*, second edition, Chapman & Hall, New York 1999, s. 127-161.
18. Moretti E., *Lactic acid bacteria*, [w:] Fantozzi P., *Development of guidelines for microbiological control in microbrewery*, Department of Economical and Food Science, University of Perugia, 2013, s. 15-18.
19. Kubizniaková P., Brožová M., Matoulková D., *Brewing microbiology – *Kocuria* (*Micrococcus*) and cultivation methods for their detection*, part 2, Kvasny Průmysl, 64(4), 2018, s. 156-160.
20. Vaughan A., O’Sullivan T., van Sinderen D., *Enhancing the microbiological stability of malt and beer. A review*, Journal of the Institute of Brewing, 111(4), 2005, s. 355-371.
21. Bell C., Neaves P., Williams A.P., *Food microbiology and laboratory practice*, Blackwell Publishing, Iowa 2005, s. 131-191.

22. Gwiazdowska D., *Wykrywanie drobnoustrojów chorobotwórczych w żywności za pomocą klasycznych i szybkich metod mikrobiologicznych*, Zeszyty Naukowe, Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, 183, 2011, s. 137-153.
23. Vasavada P.C., *Rapid methods and automation in dairy microbiology*, Journal Dairy Science, 76, 1992, s. 3101-3113.
24. Hill A.E., *Traditional methods of detection and identification of brewery spoilage organisms*, The International Centre for Brewing & Distilling, Heriot-Watt University, Edinburgh 2015, s. 271-285.
25. Hill A.E., *Microbiological stability of beer*, [w:] Bamforth C.W. (red.), *Beer. A quality perspective*, Elsevier, 2009, s. 163-183.
26. Trojanowska K., Baumgart J., Libudysz Z., Czaczyk K., Ołtuszek E., Polak J., Szczęsna M., Tomczak E., Wiewiórowska M., Sip A., Walkowiak-Tomczak D., *Zastosowanie szybkich metod mikrobiologicznych i sond genetycznych w analizie żywności*, [w:] Jankiewicz M., Kędzior J. (red.), *Metody pomiarów i kontroli jakości w przemyśle spożywczym i biotechnologii*, Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu, Poznań 2003, s. 325-407.
27. Siegrist J., Kohlsrock M., Merx K., Vetter K., *Rapid detection and identification of spoilage bacteria in beer*, [w:] Hill A.E. (red.), *Brewing microbiology. Managing microbes, ensuring quality and valorising waste*, Elsevier, 2015, s. 287-318.
28. Ben Amor K., Vaughan E.E., de Vos W.M., *Advanced molecular tools for the identification of lactic acid bacteria*, The Journal of Nutrition, 137, 2007, s. 741-750.
29. Jasson V., Jacxsens L., Luning P., Rajkovic A., Uyttendaele M., *Alternative microbial methods. An overview and selection criteria*, Food Microbiology, 27, 2010, s. 710-730.
30. Wawerla M., Stolle A., Schalch B., Eisgruber H., *Impedance microbiology. Application in food hygiene*, Journal of Food Protection, 12, 1999, s. 1488-1496.

Mikrobiologiczne zanieczyszczenia w produkcji piwa niepasteryzowanego

Streszczenie

Piwo to produkt przemian metabolicznych drożdży w chmielonej brzeczce słodowej lub w chmielonej brzeczce otrzymanej ze słodu i surowców niesłodowanych. Od wieków jest cenione za trwałość i stabilność biologiczną – wynikające z faktu, że piwo jest niekorzystnym środowiskiem dla rozwoju wielu mikroorganizmów. Powodem tego jest przede wszystkim obecność alkoholu etylowego i wysokiego stężenia dwutlenku węgla (będących produktem fermentacji drożdży), ale także izo- α -kwasów pochodzących z chmielu, niskiego pH oraz niskiego poziomu tlenu. Pomimo wyjątkowo niekorzystnych warunków części mikroorganizmów udaje się w piwie przetrwać. Mikroorganizmy po dostaniu się do piwa mogą przetrwać kilka dni, namnażać się do pewnego, krytycznego momentu lub namnażać się, aż widoczne będzie zmętnienie, co jest typowym obrazem dla bakterii i grzybów będących zanieczyszczeniem piwnym. Większość drobnoustrojów namnaża się w przeciągu 10 dni, jednak czas ten jest zależny od temperatury otoczenia. Rozwój niepożądanych mikroorganizmów w piwie może skutkować pojawieniem się licznych wad produktu, takich jak zmiany w wyglądzie, np. zmiana barwy piwa, lepkość, zmętnienie, wady smakowe i zapachowe, zaburzenia w procesie fermentacji, utrata stabilności koloidalnej czy nadmierne odfermentowanie. Ryzyko infekcji wzrasta w przypadku piw rzemieślniczych, a przyczyną kontaminacji są błędy wynikające z defektów technicznych lub procesowych w browarze, a także ogólnej higieny personelu i zakładu.

W celu zminimalizowania ryzyka zanieczyszczenia mikrobiologicznego konieczne jest zastosowanie odpowiednich metod monitorowania produkcji piwa, co pozwala precyzyjnie kontrolować i oceniać potencjalne zakażenia. Metody zarówno jakościowe, jak i ilościowe, wykorzystujące tradycyjne i nowoczesne techniki, pozwalają na wykrycie i identyfikację niepożądanych w piwie drobnoustrojów.

Słowa kluczowe: piwo niepasteryzowane, zanieczyszczenia mikrobiologiczne

Microbiological contaminants in the production of unpasteurized beer

Abstract

Beer is the product of yeast metabolism, in hopped malt wort or in hopped wort obtained from malt and unmalted raw materials. It has been valued for centuries for its shelf life and biological stability, resulting from the fact that beer is an unfavorable environment for the growth of many microorganisms. This is primarily due to the presence of ethanol and high concentrations of carbon dioxide which are products of yeast fermentation, but also iso- α -acids derived from hops, low pH and low oxygen levels. Despite extremely un-favorable conditions, some microorganisms manage to survive in beer. Once in beer, microorganisms can survive for several days, multiply to a certain critical point, or multiply until turbidity is visible, which is the typical picture for beer contaminating bacteria and fungi. Most microorganisms multiply within 10 days, but this time is dependent on ambient temperature. The development of undesirable microorganisms in beer may result in numerous product defects, such as appearance changes, e.g. beer color change, viscosity, turbidity, taste and aroma defects, fermentation disorders, loss of colloidal stability or excessive attenuation. The risk of infection increases for craft beers, and contamination is caused by errors due to technical or process defects in the brewery, as well as general staff and brewery hygiene. To minimize the risk of microbial contamination, it is necessary to use appropriate methods of beer production monitoring, which allows for precise control and assessment of potential contamination. Both qualitative and quantitative methods, using traditional and modern techniques, make it possible to detect and identify messy microorganisms in beer.

Keywords: unpasteurized beer, microbiological contaminants

***Trichoderma* spp. – biostymulator dla roślin ozdobnych**

1. Wprowadzenie

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* są organizmami szeroko rozpowszechnionymi w środowisku. Występują we wszystkich strefach klimatycznych i zasiedlają różne nisze ekologiczne. Najczęstszym siedliskiem *Trichoderma* spp. jest próchniejące drewno, gleba, a szczególnie ryzosfera. Grzyby z tego rodzaju produkują liczne metabolity, które wspomagają interakcję tych grzybów z roślinami i innymi mikroorganizmami. *Trichoderma* spp. poprzez nadpasożytnictwo i antybiozę oddziałują na bakterie, wirusy i patogeniczne grzyby [1]. Grzyby te mają zdolność do redukcji toksyn produkowanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* [2, 3]. Ostatnio wykazano, że mogą one również posiadać komplementarne właściwości, które wzmacniają bariery obronne roślin przed owadami [4]. Wykorzystanie tych grzybów jest jednak w pewnym stopniu ograniczone przez ich zmienny poziom aktywności biokontrolnej, na który wpływają warunki środowiskowe. *Trichoderma* spp. wywołują indukowaną odporność systemiczną (ISR, ang. *induced systemic resistance*) – zarówno u roślin jednoliściennych, jak i dwuliściennych – w wyniku stresów biotycznych i abiotycznych. Dzięki tym właściwościom zalicza się je do czynników kontroli biologicznej (BCA, ang. *biological control agents*), wykorzystywanych komercyjnie do produkcji środków ochrony roślin jako biopestycydy czy biostymulatory. *Trichoderma* spp. produkują wiele związków biologicznie czynnych, takich jak: enzymy (celulazy, proteazy, fosfatazy, lipazy, ksylanazy oraz amylazy) [5], antybiotyki, związki lotne [2, 6-8], a także regulatory wzrostu [2, 9]. *Trichoderma* spp. dzięki swoim właściwościom wchodzi w skład preparatów mikrobiologicznych stosowanych w celu optymalizacji kompostowania materiałów różnego pochodzenia [5].

Trichoderma spp. są szeroko opisywane jako stymulatory wzrostu roślin. Cecha ta jest raczej specyficzna dla izolatów niż dla gatunków, a poszczególne izolaty wykazują różne stopnie specyficzności dla roślin. Zwiększona biomasa korzeni i/lub pędów jest najczęstszym przejawem stymulacji wzrostu, ale opisywane są również zmiany w morfologii i rozwoju roślin. Stymulacja wzrostu może być bardzo zmienna ze względu na kilka czynników ograniczających, takich jak: rodzaj i warunki uprawy, dawka inokulum oraz rodzaj preparatu [9]. Według Nieto-Jacob i in. [10] komunikacja pomiędzy roślinami a *Trichoderma* spp. obejmuje rozpoznawanie molekuł pochodzących od grzybów, takich jak auksyny i mikrobiologiczne lotne związki organiczne (VOCs, ang. *Volatile Organic Compounds*), jednakże komunikacja ta jest mocno uzależniona od środowiska. Natomiast Contreras-Cornejo i in. [11] sugerują, że *Trichoderma* spp. Indukują wzrost przez mechanizm zależny od auksyny. Na podstawie testów biologicznych *in vitro* wykazali, że *Trichoderma virens* Gv29.8 i *T. atroviride* IMI206040 mogą syntetyzować kwas indolilo-3-octowy (IAA) i niektóre jego pochodne, dzięki czemu system

¹ roman.andrzejak@up.poznan.pl, Katedra Fitopatologii i Nasiennictwa, Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, www.puls.edu.pl.

² beata.janowska@up.poznan.pl, Katedra Roślin Ozdobnych, Dendrologii i Sadownictwa, Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, www.puls.edu.pl.

korzeniowy rozwija się intensywnie. Według tych autorów wiele szczepów *Trichoderma* jest zdolnych do syntezy IAA, ale tylko kilka z nich może stymulować wzrost roślin. Niektórzy badacze wskazują, że *Trichoderma* spp. stymulują wzrost roślin, ponieważ umożliwiają one roślinom wchłanianie większej ilości składników odżywczych oraz wspomagają produkcję witamin i regulatorów wzrostu [12-14]. Obecnie w handlu dostępnych jest wiele bioinokulantów *Trichoderma*, a mieszanki szczepów stają się coraz bardziej powszechne ze względu na większą spójność działania [9].

Na całym świecie prowadzone są badania mające na celu określenie wpływu *Trichoderma* spp. na rośliny z różnych grup. Dominują badania na roślinach użytkowych – jadalnych [15-17]. Mało natomiast jest informacji na temat wpływu tych grzybów na rośliny ozdobne, stąd w niniejszej pracy prześledzono badania oceniające wpływ *Trichoderma* spp. na wzrost, kwitnienie, jakość i stan odżywienia roślin ozdobnych.

2. Formy stosowania *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. obecnie są sprzedawane jako biopestycydy, bionawozy oraz stymulatory wzrostu i naturalnej odporności. Skuteczność działania tych grzybów można przypisać ich zdolności do ochrony roślin, stymulacji wzrostu wegetatywnego i ograniczania populacji patogenów, a także pełnienia funkcji dodatków do podłoża (inokulantów) w celu poprawy zdolności pobierania składników pokarmowych. Żywe zarodniki grzybów (substancja czynna) są włączane do różnych preparatów, zarówno tradycyjnych, jak i innowacyjnych, stosowanych w formie roztworów do opryskiwania liści, na nasiona lub młode rośliny, w zabiegach po przycinaniu, w podłożu do wysiewu nasion lub w podłożu do przesadzania, do podlewania lub moczenia, np. organów przetrwalnikowych, takich jak: bulwy, cebule, kłącza. Preparaty na bazie *Trichoderma* spp. są sprzedawane na całym świecie i stosowane do ochrony upraw przed różnymi patogenami roślin lub do stymulacji wzrostu i produktywności roślin w różnych środowiskach uprawnych, takich jak pola, szklarnie, szkółki, w produkcji różnych roślin ogrodniczych – owocowych, drzew i roślin ozdobnych. Najwięcej bioproduktów *Trichoderma* spp. wytwarza się w Azji, następnie w Europie, Ameryce Południowo-Centralnej i Ameryce Północnej. Większość etykiet wskazuje na właściwości grzybobójcze tych preparatów, ale tylko 38% wprowadzonych na rynek produktów jest zarejestrowanych. Dziesięć gatunków *Trichoderma* zostało specjalnie wskazanych do stosowania u roślin z różnych grup, ale wiele etykiet wskazuje na to, że *Trichoderma* spp. oferowane są w formie mieszanki różnych grzybów w obrębie tego rodzaju. Najbardziej powszechną formą preparatów jest zwilżalny proszek z określonego stężenia wysuszonych zarodników konidialnych grzyba w postaci drobnego pyłu, który należy połączyć z wodą. Kolejnymi powszechnie stosowanymi są preparaty granulowane, płynne oraz stałe [18].

3. Zasiedlenie korzeni przez grzyby z rodzaju *Trichoderma*

Trichoderma spp. to grzyby powszechnie występujące w ekosystemach glebowych i korzeniowych. Niektóre szczepy silnie i długotrwale kolonizują korzenie poprzez wnikanie do wierzchnich warstw epidermy [19]. Badania wskazują, że intensywność zasiedlenia korzeni przez grzyby z rodzaju *Trichoderma* jest różna u poszczególnych gatunków. Andrzejak i Janowska [20] informują, że u mieczyka ogrodowego (*Gladiolus hybridus*) *Advance Red*, w obu latach badań, w kombinacjach, w których zastosowano *Trichoderma* spp. – odpowiednio 46,6% i 48,2% korzeni roślin było zasiedlonych przez

te grzyby. Mniejszy procent zasiedlenia korzeni przez *Trichoderma* spp. Janowska i in. [21] uzyskali u frezji (*Freesia refracta*) *Argentea* (32,0% i 33,0% u niedoświetlanych i doświetlanych roślin), zaś Andrzejak i in. [22] u begonii bulwiastej (*Begonia* × *tuberhybrida*) *Picotee Sunburst* (odpowiednio 30,5%, 29,5% i 30,0% u roślin nawożonych pogłównie wieloskładnikowym nawozem Peters Professional Allrounder). Natomiast Prisa i in. [19] wskazują, że zasiedlenie korzeni roślin grzybami z rodzaju *Trichoderma* może być bardzo wysokie, co wykazali u zatrwanu wrębnego (*Limonium sinuatum*) – 100,0%. Według Błaszczyk i in. [23] w ryzosferze *Trichoderma* spp. zasiedlają zewnętrzne warstwy korzeni roślin zielnych i drzew, mają ponadto zdolność do wnikania i kolonizacji wewnątrz korzeni lub występują w formie endofitów. Na przykładzie pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*) autorzy dowodzą, że wstępna analiza zmian morfologicznych, anatomicznych, fizjologicznych i metabolicznych wskazuje na brak jednoznacznej reakcji roślin na grzyby z rodzaju *Trichoderma*. Może to świadczyć, że zachodzące w roślinach zmiany zależą zarówno od gatunku/szczepu *Trichoderma* sp., jak i od odmiany badanego gatunku. Według Souza i in. [24] interakcje roślina–mikrobiota w ryzosferze są kluczowymi czynnikami warunkującymi zdrowotność roślin, produktywność i żyzność gleby. Korzenie roślin syntetyzują metabolity, które są rozpoznawane przez mikroorganizmy, a te w odpowiedzi wytwarzają sygnały inicjujące kolonizację mikrobiologiczną [25]. Korzenie roślin wydzielają również sacharozę będącą źródłem energii, aby wspierać kolonizację przez mikroorganizmy [26, 27].

4. Wpływ *Trichoderma* spp. na jakość roślin

4.1. Wysokość roślin, liczba pędów i liści

Według Harman i in. [13] grzyby z rodzaju *Trichoderma* stymulują wzrost korzeni, a także wzrost długości i grubości pędów oraz powierzchni liści. Jednak – jak wskazują Lorito i in. [14] – mechanizmy wspierające korzystne efekty stymulacji wzrostu roślin nie są w pełni wyjaśnione i opierają się na sugestii, iż stymulacja ta związana jest ze zwiększoną dostępnością składników pokarmowych. Andrzejak i in. [22] wykazali, że grzyby z rodzaju *Trichoderma* nie wpływają na wysokość roślin i liczbę pędów begonii bulwiastej *Picotee Sunburst*, jednak stymulują rozwój liści. Natomiast u tulipana (*Tulipa gesneriana*) *Golden Parade* – *Trichoderma* spp. nie wpływają na liczbę liści, ale w zależności od wykorzystanego gatunku grzyba, stymulują lub hamują wydłużanie się blaszki liściowej oraz wpływają na jej szerokość [28]. Natomiast u lantany (*Lantana camara*) zastosowanie *T. harzianum* T-22 stymuluje wydłużanie i grubienie pędów oraz rozwój liści [29]. Prisa [30] informuje natomiast, że *T. viride* stymuluje wydłużanie i tworzenie pędów oraz liści, a także wzrost masy vegetatywnej roślin trzech gatunków z rodzaju kalanchoe (*Kalanchoe*): *K. pinnata*, *K. tubiflora* i *K. gastonis-bonnierei*. Ponadto rośliny, u których zastosowano *T. viride* wykazują zwiększoną zawartość witaminy C w liściach, które mają większą suchą masę.

5. Kwitnienie roślin po zastosowaniu *Trichoderma* spp.

5.1. Wczesność kwitnienia

Wczesność kwitnienia roślin ozdobnych jest bardzo ważnym parametrem, dzięki któremu można zaplanować zbiory na określony termin. Z tego względu znajomość reakcji poszczególnych gatunków i ich odmian na stosowane zabiegi jest niezbędna.

Z prowadzonych badań wynika, że wiele gatunków roślin ozdobnych po zastosowaniu *Trichoderma* spp. zakwita wcześniej. *Trichoderma* spp. przyspieszają o około tydzień kwitnienie frezji *Argentea* w okresie zimowym, bez doświetlania asymilacyjnego [21]. Taki efekt jest najprawdopodobniej skutkiem prawidłowo przeprowadzonej inokulacji grzybów, których zawiesiną podlano podłoże umieszczone bezpośrednio nad bulwami, gdyż *Trichoderma* są organizmami tlenowymi, stąd najlepiej rozwijają się one w powierzchniowych warstwach podłoża [5]. Ponadto, jak wskazują Benitez i in. [2], szybsze zarodnikowanie grzybów z rodzaju *Trichoderma* ma miejsce przy zwiększonym dostępie światła widzialnego. Natomiast Andrzejak i in. [22] informują, że zastosowanie *Trichoderma* spp. nieznacznie przyspiesza kwitnienie begonii bulwiastej *Picotee Sunburst*, gdy rośliny dokarmiane są wieloskładnikowym nawozem Peters Professional Allroundero stężeniu 0,2%. Jednak zastosowanie większego stężenia nawozu sprawia, iż rośliny zakwitają aż o 8,7 dnia wcześniej. Natomiast Andrzejak i Janowska [20] informują, że wczesność kwitnienia mieczyka ogrodowego *Advances Red* zależy jedynie od tego, czy w trakcie uprawy stosowane są *Trichoderma* spp., czy też nie. Autorzy wykazali, że niezależnie od roku badań, kwitnienie roślin uprawianych z grzybami z rodzaju *Trichoderma* rozpoczyna się średnio o 10 dni wcześniej. W obu latach badań rośliny uprawiane z *Trichoderma* spp. zakwitły odpowiednio o 10 i 14 dni wcześniej niż rośliny kontrolne, uprawiane bez *Trichoderma* spp. O wcześniejszym kwitnieniu tulipana *Golden Parade* po zastosowaniu grzybów z rodzaju *Trichoderma* donoszą także Cig i Aydion [28]. Autorzy wykazali, że kwitnienie roślin kontrolnych rozpoczyna się z dwu- i czterodniowym opóźnieniem w porównaniu z roślinami, u których zastosowano *T. gamsii* VG47 i *T. harzianum* LO52.

5.2. Jakość kwiatów i kwiatostanów

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* u niektórych gatunków roślin ozdobnych wpływają na cechy jakościowe kwiatów – długość szypuły/pędu oraz wielkość kwiatów. Andrzejak i Janowska [20] informują, że u mieczyka ogrodowego *Advances Red* po zastosowaniu *Trichoderma* spp. z bulw wyrastały istotnie dłuższe pędy kwiatostanowe (o 9,8%), zakończone dłuższymi kwiatostanami (o 10,0%), w których rozwijało się więcej kwiatów (o 12,6%). Średnica kwiatów (w obu latach badań) u roślin, u których stosowano lub nie *Trichoderma* spp., była jednak podobna. Częściowo podobne wyniki uzyskali wcześniej Sisodia i in. [31]. Autorzy wykazali, że zastosowanie *Trichoderma* spp. u ośmiu odmian mieczyka (*Gladiolus* sp.) korzystnie wpłynęło na długość kwiatostanu i czas trwania kwitnienia, ale nie miało wpływu na liczbę kwiatów. Natomiast da Cruz i in. [32] informują, że *Trichoderma* spp. zastosowane w uprawie mieczyka *Peter's Pear* nie miały wpływu na jakość kwiatostanów wyrażoną długością pędu kwiatostanowego, długością kwiatostanu i liczbą kwiatów. Z badań Andrzejaka i in. [22] wynika, że *Trichoderma* spp. stymulują natomiast rozwój pąków i kwiatów oraz mają wpływ na ich wielkość u begonii bulwiastej *Picotee Sunburst*. Uzyskane wyniki potwierdzają także badania Janowskiej i in. [21]. Autorzy informują, iż *Trichoderma* spp. stymulują rozwój bocznych pędów kwiatostanowych i rozwój kwiatów u frezji *Argentea*, szczególnie u roślin, które w czasie uprawy są doświetlane asymilacyjnie. Według Prisa [33] grzyby z rodzaju *Trichoderma* stymulują także kwitnienie *Pachyphytum oviferum* i grubosza szablatego (*Crassula falcata*).

6. Zawartość barwników chloroplastowych w liściach po zastosowaniu *Trichoderma* spp.

Chlorofile są szeroko rozpowszechnioną grupą barwników fotosyntetycznych występujących w roślinach wyższych, glonach oraz cyjanobakteriach. Chlorofil jest barwnikiem pełniącym kluczową rolę w prawidłowym przebiegu fotosyntezy, w której zamiana energii światła na energię wiązań chemicznych jest możliwa dzięki absorpcji kwantów światła w reakcjach redoks [34]. Dlatego też stężenie chlorofilu w liściach może bezpośrednio wpływać na przebieg fotosyntezy w roślinie [35]. Według Harman i in. [36] poprawa zdolności fotosyntetycznych roślin, indukowana przez różne endofityczne *Trichoderma* spp., następuje w wyniku zwiększenia ilości barwników fotosyntetycznych lub ekspresji genów regulujących biosyntezę chlorofilu, białek kompleksu zbierającego światło lub składników cyklu Calvina. Kolonizacja korzeni roślin uprawnych przez grzyby *Trichoderma* spp. powoduje wzrost regulacji genów i pigmentów, które poprawiają fotosyntezę roślin. Rośliny w warunkach stresu fizjologicznego lub środowiskowego tracą zdolność do fotosyntezy, gdyż uszkodzeniu ulegają fotosystemy, a liczne procesy komórkowe są zaburzane przez reaktywne formy tlenu – RFT (ROS, ang. *reactive oxygen species*). Jednak niektóre szczepy *Trichoderma* spp. aktywują biochemiczne szlaki, które redukują RFT do mniej szkodliwych cząsteczek. Ten i inne mechanizmy sprawiają, że rośliny są bardziej odporne na stropy biotyczne i abiotyczne. Ponadto, jeśli wskaźniki fotosyntezy są zwiększone, więcej dwutlenku węgla (CO₂) jest pobierane z atmosfery. Natomiast karotenoidy odpowiadają za stabilność błon lipidowych, biorą udział w gromadzeniu światła w procesie fotosyntezy, jak również ochronie przed fotooksydacją wywołaną przez RFT powstające w trakcie wzbudzenia chlorofilu podczas fotosyntezy [37, 38]. Działanie przeciwutleniające karotenoidów na błony lipidowe zależy od ich orientacji, lokalizacji oraz organizacji w błonach. Polarne i niepolarne karotenoidy w różny sposób oddziałują na strukturę i fizjologię tkanek. Na przykład astaksantyna, będąca substancją polarną, ogranicza peroksydację lipidów poprzez utrzymywanie sztywnej struktury błony [39]. Karotenoidy charakteryzują się wysoką aktywnością wobec RFT i wolnych rodników [37].

Większość prac poruszających tematykę wpływu *Trichoderma* spp. na zawartość barwników chloroplastowych w liściach dotyczy gatunków użytkowych – jadalnych [15-17]. Jak wskazują jednak nieliczne badania, stymulacja tworzenia barwników fotosyntetycznych (chlorofil, karotenoidy) przez *Trichoderma* spp. odnosi się także do roślin ozdobnych. Andrzejak i Janowska [20] informują, że u mietczyka ogrodowego *Advances Red* zawartości chlorofilu a+b i karotenoidów w liściach istotnie zwiększyła się po zastosowaniu *Trichoderma* spp. (o 66,7% chlorofil a+b i 33,3% karotenoidy). Uzyskane wyniki wskazują na to, iż u odmiany *Advances Red* poprawiła się zdolność fotosyntetyczna. Andrzejak i in. [22] informują natomiast, że *Trichoderma* spp. stymulują produkcję chlorofilu, którego zawartość odzwierciedla indeks zazielenienia liści u begonii bulwiastej *Picotee Sunburst*.

7. *Trichoderma* spp. a odżywienie roślin

7.1. Zawartość makroelementów w liściach

Według Yedidia i in. [12] po zastosowaniu *Trichoderma* spp. system korzeniowy roślin jest lepiej rozbudowany, co umożliwia roślinom dostęp do większej objętości podłoża i sprzyja lepszemu pobieraniu składników pokarmowych. Dzięki temu rośliny

te wygrywają konkurencję o składniki pokarmowe z roślinami o mniej rozbudowanym systemie korzeniowym, a także w sytuacji, kiedy związki mineralne występują w małych ilościach.

Według Altomare i in. [40] związki fosforu (P) mogą być rozpuszczane i przetrzymywane w biomacie grzybów z rodzaju *Trichoderma*, a następnie po lizie mycelium uwalniane w dostępnej formie w pobliżu korzeni. Z badań prowadzonych przez Andrzejaka i Janowską [20] wynika, że w przypadku mieczyka ogrodowego *Advances Red* grzyby z rodzaju *Trichoderma* mają znaczący wpływ na pobieranie fosforu, potasu (K) i wapnia (Ca) przez te rośliny. W obu latach badań w liściach roślin, u których stosowano *Trichoderma* spp., odnotowano istotnie więcej P, K i Ca w porównaniu z zawartością tych pierwiastków w liściach roślin kontrolnych. Zbliżone wyniki uzyskali Janowska i in. [21] w uprawie frezji *Argentea*. Autorzy informują, że *Trichoderma* spp. u niedoświetlanych i doświetlanych roślin tej odmiany stymulują pobieranie P i Ca, a u doświetlanych – dodatkowo K. Korzyści płynące z zastosowania mikroorganizmów w celu poprawy pobierania składników pokarmowych stanowią szansę dla najnowszych praktyk ogrodniczych, gdyż pozwalają ograniczyć zużycie nawozów. Stosowanie nawozów biologicznych na bazie mikroorganizmów jest alternatywą dla utrzymania wysokiej produkcji przy małym wpływie na środowisko naturalne [41–43]. Nawozy biologiczne mogą być stosowane jako uzupełnienie lub alternatywa dla nawozów mineralnych w zrównoważonej produkcji roślinnej [43]. Metwally [42] wykazał, że zarówno grzyby mikoryzowe (AM), jak i *T. viride* są ze sobą kompatybilne, a ich łączne zastosowanie jest skuteczne nie tylko w poprawie parametrów biochemicznych roślin, takich jak zawartość rozpuszczalnych węglowodanów, białka, wolnych aminokwasów, fosfatów kwaśnych i zasadowych, ale także w zwiększaniu zawartości składników mineralnych i pokarmowych (N, P, K, Ca, Mg i Zn).

7.2. Zawartość mikroelementów w liściach

Mikroskładniki odgrywają kluczową rolę w procesach metabolicznych i fizjologicznych roślin. Przy czym warto zaznaczyć, iż w większym stopniu wpływają na jakość [44] niż na wielkość plonu [45]. Mikroskładniki wchodzi w skład białek, np. żelazo (Fe) jest składnikiem białek uczestniczących w transporcie elektronów (ferredoksyny), a także pełnią funkcje katalityczne [45].

Trichoderma spp. wpływają na pobieranie cynku (Zn), żelaza (Fe) i boru (B) przez rośliny mieczyka ogrodowego *Advances Red* [20]. Według Andrzejaka i in. [22] w przypadku begonii bulwiastej *Picotee Sunburst* – *Trichoderma* spp. również stymulowały pobieranie Zn, Fe i B. Natomiast Janowska i in. [21] informują, że u frezji *Argentea* *Trichoderma* spp. stymulują pobieranie żelaza (Fe), manganu (Mn) i cynku (Zn) u doświetlanych i niedoświetlanych roślin, a połączenie doświetlania i *Trichoderma* spp. – miedzi (Cu).

8. Podsumowanie

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* są organizmami szeroko rozpowszechnionymi w środowisku. Występują we wszystkich strefach klimatycznych i zasiedlają różne nisze ekologiczne. Najczęstszym siedliskiem *Trichoderma* spp. jest próchniejące drewno, gleba, a szczególnie ryzosfera. Grzyby z tego rodzaju produkują liczne metabolity, które wspomagają interakcję tych grzybów z roślinami i innymi mikroorganizmami. *Trichoderma* spp. poprzez nadpasożytnictwo i antybiozę oddziałują na bakterie, wirusy i pato-

geniczne grzyby. Grzyby *Trichoderma* mają zdolności do redukcji toksyn produkowanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Ostatnio wykazano, że mają komplementarne właściwości, które wzmacniają bariery obronne roślin przed owadami. Wykorzystanie tych grzybów jest jednak w pewnym stopniu ograniczone przez ich zmienny poziom aktywności biokontrolnej, na który wpływają warunki środowiskowe. *Trichoderma* spp. produkują wiele związków biologicznie czynnych, takich jak: enzymy (celulazy, proteazy, fosfatazy, lipazy, ksylanazy oraz amylazy), antybiotyki, związki lotne, a także regulatory wzrostu. *Trichoderma* spp. dzięki swoim właściwościom wchodzi w skład preparatów mikrobiologicznych stosowanych w celu optymalizacji kompostowania surowców różnego pochodzenia.

Trichoderma spp. są szeroko opisywane jako stymulatory wzrostu roślin. Cecha ta jest raczej specyficzna dla izolatów niż dla gatunków, a poszczególne izolaty wykazują różne stopnie specyficzności w stosunku do roślin. Zwiększona biomasa korzeni i/lub pędów jest najczęstszym przejawem stymulacji wzrostu, ale opisywane są również zmiany w morfologii i rozwoju roślin. U begonii bulwiastej *Picotee Sunburst* – *Trichoderma* spp. stymulują rozwój liści, nie mając jednocześnie wpływu na wysokość roślin i liczbę pędów. Natomiast u tulipana *Golden Parade* – *Trichoderma* spp. nie wpływają na liczbę liści, ale stymulują lub hamują wydłużanie się blaszki liściowej oraz wpływają na jej szerokość. U lantany zastosowanie *T. harzianum* T-22 stymuluje wydłużanie i grubienie pędów oraz rozwój liści, a u kalanchoe *T. viride* stymuluje wydłużanie i tworzenie pędów oraz liści, a także wzrost masy wegetatywnej roślin.

Wiele gatunków roślin ozdobnych po zastosowaniu *Trichoderma* spp. zakwita wcześniej, co stwierdzono w uprawie frezji *Argentea*, begonii bulwiastej *Picotee Sunburst*, mieczyka ogrodowego *Advances Red* i u tulipana *Golden Parade*. Grzyby z rodzaju *Trichoderma* wpływają także na cechy jakościowe kwiatów wyrażone długością szypuły/pędu oraz wielkością kwiatów. Po zastosowaniu *Trichoderma* spp. z bulw mieczyka ogrodowego *Advances Red* wyrastają o 9,8% dłuższe pędy kwiatostanowe, zakończone o 10,0% dłuższymi kwiatostanami, w których rozwija się o 12,6% więcej kwiatów. *Trichoderma* spp. stymulują także rozwój pąków i kwiatów oraz mają wpływ na ich wielkość, co wykazano u begonii bulwiastej *Picotee Sunburst*. Ponadto *Trichoderma* spp. stymulują rozwój bocznych pędów kwiatostanowych i rozwój kwiatów u frezji *Argentea*, stymulują także kwitnienie *Pachyphytum oviferum* i grubosza szablatego. *Trichoderma* spp. stymulują również tworzenia barwników fotosyntetycznych (chlorofil, karotenoidy) u roślin ozdobnych, co wykazano w przypadku mieczyka ogrodowego *Advances Red* (o 66,7% chlorofil a+b i 33,3% karotenoidy) i u begonii bulwiastej *Picotee Sunburst*. *Trichoderma* spp. odgrywają także ważną rolę w żywieniu roślin, mając wpływ na pobieranie makro- i mikroskładników. Przykładowo u mieczyka ogrodowego *Advances Red* stymulują pobieranie P, K, Ca, Zn, Fe i B, u frezji *Argentea* – P, K, Ca, Fe, Mn, Zn i Cu, a u begonii bulwiastej *Picotee Sunburst* – Zn, Fe i B. Zastosowanie *Trichoderma* spp. w celu poprawy pobierania składników pokarmowych pozwala ograniczyć zużycie nawozów mineralnych, co znacząco przekłada się na ochronę środowiska.

Literatura

1. Wojtkowiak-Gebarowska E., *Mechanizmy zwalczania fitopatogenów glebowych przez grzyby z rodzaju Trichoderma*, Postępy Mikrobiologii, 45(4), 2006, s. 261-273.
2. Benitez T., Rincón A.M., Limón M.C., Codón A.C., *Biocontrol mechanisms of Trichoderma strains*, International Microbiology, 7, 2004, s. 249-260.
3. Świerczyńska I., Korbas M., Horoszkiewicz-Janka J., Danielewicz J., *Antagonistyczne oddziaływanie Trichoderma viride na patogeny z rodzaju Fusarium w obecności biopreparatów*, Journal of Research and Applications in Agricultural Engineering, 56(4), 2011, s. 157-160.
4. Poveda J., *Trichoderma as biocontrol agent against pests. New uses for a mycoparasite*, Biological Control, 159, 2021, s. 104634.
5. Kosicka D., Wolna-Maruwka A., Trzeciak M., *Aspekty stosowania Trichoderma sp. w ochronie roślin i rozkładzie materii organicznej*, Kosmos, 63(4), 2014, s. 635-642.
6. Vey A., Hoagland R.E., Butt T.M., *Toxic metabolites of fungal biocontrol agents*, [w:] Butt T.M., Jackson C., Magan N. (red.), *Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential*, Wallingford CABI, UK 2001, s. 311-346.
7. Howell C.R., *Understanding the mechanisms employed by Trichoderma virens to effect biological control of cotton diseases*, Phytopathology, 96, 2006, s. 178-180.
8. Reino J.L., Guerrero R.F., Hernández-Galán R., Collado I.G., *Secondary metabolites from species of the biocontrol agent Trichoderma*, Phytochemistry Reviews, 7, 2008, s. 89-123.
9. Stewart A., Hill R., *Applications of Trichoderma in plant growth promotion*, [w:] Gupta V.K., Schmoll M., Herrera-Estrella A., Upadhyay R.S., Druzhinina I., Tuohy M.G. (red.), *Biotechnology and biology of Trichoderma*, Elsevier, Holandia 2014, s. 415-428.
10. Nieto-Jacobo M.F., Steyaert J.M., Salazar-Badillo F.B., Nguyen D.V., Rostás M., Braithwaite M., de Souza J.T., Jimenez-Bremont J.F., Ohkura M., Stewart A., Mendoza-Mendoza A., *Environmental growth conditions of Trichoderma spp. affects indole acetic acid derivatives, volatile organic compounds, and plant growth promotion*, Frontiers in Plant Science, 8, 2017, s. 102.
11. Contreras-Cornejo H.A., Macías-Rodríguez L., Cortés-Penagos C., López-Bucio J., *Trichoderma virens, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in Arabidopsis*, Plant Physiology, 149, 2009, s. 1579-1592.
12. Yedidia I., Srivastava A.K., Kupalnik Y., Chet I., *Effect of Trichoderma harzianum on microelement concentrations and increased growth of Cucumber plants*, Plant Soil, 235, 2001, s. 235-242.
13. Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M., *Trichoderma species – opportunistic, avirulent plant symbionts*, Nature Reviews Microbiology, 2, 2004, s. 43-56.
14. Lorito M., Woo S., Harman G., Monte E., *Translational research on Trichoderma. From „omics to the field”*, Annual Review of Phytopathology, 48, 2010, s. 395-417.
15. Simkin A.J., Gaffe J., Alcaraz J.P., Carde J.P., Bramley P.M., Fraser P.D., Kuntz M., *Fibrillin influence on plastid ultrastructure and pigment content in tomato fruit*, Phytochemistry, 68, 2007, s. 1545-1556.
16. Langi P., Kiokias S., Varzakas T., Proestos C., *Carotenoids. From plants to food and feed industries*, Methods in Molecular Biology, 1852, 2018, s. 57-71.
17. Meléndez-Martínez A.J., Mandić A.I., Bantis F., Böhm V., Borge G.I.A., Brnčić M., Bysted A., Cano M.P., Dias M.G., Elgersma A., Fikselová M., García-Alonso J., Giuffrida D., Gonçalves V.S.S., Hornero-Méndez D., Kljak K., Lavelli V., Manganaris G.A., Mapelli-Brahm P., Marounek M., Olmedilla-Alonso B., Periago-Castón B.J., Pintea A., Sheehan J.J., Šaponjac V.T., Valšková-Frey M., Van Meulebroek L., O'Brien N., *A comprehensive*

- review on carotenoids in foods and feeds: status quo, applications, patents, and research needs, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(8), 2022, s. 1999-2049.
18. Woo S.L, Ruocco M., Vinale F., Nigro M., Marra R., Lombardi N., Pascale A., Lanzuise S., Manganiello G., Lorito M., *Trichoderma-based products and their widespread use in agriculture*, *The Open Mycology Journal*, 8, 2014, s. 71-126.
 19. Prisa D., Sarrocco S., Forti M., Burchi G., Vannacci G., *Endophytic ability of Trichoderma spp. as inoculants for ornamental plants innovative substrates*, *Journal of Plant Pathology*, 86, 2013, s. 169-174.
 20. Andrzejak R., Janowska B., *Flowering, nutritional status, and content of chloroplast pigments in leaves of Gladiolus hybridus L. 'Advances Red' after application of Trichoderma spp.*, *Sustainability*, 14(8), 2022, s. 4576.
 21. Janowska B., Andrzejak R., Kosiada T., *The influence of fungi of the Trichoderma genus on the flowering of Freesia refracta Klatt 'Argentea' in winter*, *Horticultural Science (Prague)*, 47(4), 2020, s. 203-210.
 22. Andrzejak R., Janowska B., Reńska B, Kosiada T., *Effect of Trichoderma spp. and fertilisation on the flowering of Begonia × tuberhybrida Voss. 'Picotee Sunburst'*, *Agronomy*, 11(7), 2021, s. 1278.
 23. Błaszczyk L., Witaszak N., Basinska-Barczak A., Marczak L., Sawikowska A., Perlikowski D., Kosmala A., *Reakcja roślin pszenicy zwyczajnej (Triticum aestivum L.) na kolonizację korzeni przez grzyby Trichoderma*, *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 285, 2019, s. 129-130.
 24. Souza R., Ambrosini A., Passaglia L.M., *Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils*, *Genetics and Molecular Biology*, 38, 2015, s. 401-419.
 25. Berg G., *Plant-microbe interactions promoting plant growth and health. Perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84, 2009, s. 11-18.
 26. Druzhinina I.S., Seidl-Seiboth V., Herrera-Estrella A., Horwitz B.A., Kenerley C.M., Monte E., Mukherjee P., Zeilinger S., Grigoriew I.V., Kubicek C.P., *Trichoderma: the genomics of opportunistic success*, *Nature Reviews Microbiology*, 9, 2011, s. 896-896.
 27. Vargas W.A., Crutcher F.K., Kenerley C.M., *Functional characterisation of a plant-like sucrose transporter from the beneficial fungus Trichoderma virens. Regulation of the symbiotic association with plants by sucrose metabolism inside the fungal cells*, *New Phytologist*, 189, 2011, s. 777-789.
 28. Cig A., Aydin M.H., *The effects of Trichoderma species on some parameters of the tulip (Tulipa gesneriana cv. „Golden Parade”)*, *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(2A), 2019, s. 1522-1530.
 29. Yahya A.B., Al-Sawaf M.D., Al-Morad N.Y., *Effect of biofertilizer Trichoderma harzianum t-22 application, growing medium and training methods on some chararctrestics for Lantana camara plants*, *Mesopotamia Journal of Agriculture*, 49(1), 2021, s. 95-103.
 30. Prisa D., *Trichoderma viride inoculated in the growing medium for the vitamin C increase in the leaves of Kalanchoe spp. and defense against Pithyium sp.*, *Advanced Research and Reviews*, 5(02), 2020, s. 89-96.
 31. Sisodia A., Pal A., Singh A.K., *Varietal response and effect of Trichoderma on flowering in gladiolus*, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(3), 2018, s. 3658-3660.
 32. da Cruz L., Ludwig F., Steffen G., Joseila Maldaner J., *Development and quality of gladiolus stems with the use of vermicompost and Trichoderma sp. in substrate*, *Ornamental Horticulture*, 24(1), 2018, s. 70-77.
 33. Prisa D., *Trichoderma harzianum: biocontrol to Rhizoctonia solani and biostimulation in Pachyphytum oviferum and Crassula falcata*, *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 3(3), 2019, s. 11-18.

34. Baker N.R., *Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo*, Annual Review of Plant Biology, 59, 2008, s. 89-113.
35. Croft H., Chen J.M., Luo X., Bartlett P., Chen B., Staebler R.M., *Leaf chlorophyll content as a proxy for leaf photosynthetic capacity*, Global Change Biology, 23(9), 2017, s. 3513-3524.
36. Harman G.E., Doni F., Khadka R.B., Uphoff N., *Endophytic strains of Trichoderma increase plants' photosynthetic capability*, Journal of Applied Microbiology, 130, 2021, s. 529-546.
37. Andersson S.C., *Carotenoids, tocochromanols and chlorophylls in Sea buckthorn berries (Hippophae rhamnoides) and Rose hips (Rosa sp.)*, doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Alnarp 2009, s. 15-20.
38. Simkin A.J., *Carotenoids and apocarotenoids in planta. Their role in plant development, contribution to the flavour and aroma of fruits and flowers, and their nutraceutical benefits*, Plants, 10, 2021, s. 2321.
39. Widomska J., Kostecka-Gugała A., Latowski D., Gruszecki W.I., Strzałka K., *Calorimetric studies of the effect of cis-carotenoids on the thermotropic phase behavior of phosphatidylcholine bilayers*, Biophysical Chemistry, 140(1-3), 2008, s. 108-114.
40. Altomare C., Norvell W.A., Biorkman T., Harman G.E., *Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus Trichoderma harzianum rifai 1295-22*, Applied and Environmental Microbiology, 65, 1999, s. 2926-2933.
41. Metwally R.A., Al-Amri S.M., *Individual and interactive role of Trichoderma viride and arbuscular mycorrhizal fungi on growth and pigment content of onion plants*, Letters in Applied Microbiology, 70(2), 2020, s. 79-86.
42. Metwally R.A., *Arbuscular mycorrhizal fungi and Trichoderma viride cooperative effect on biochemical, mineral content, and protein pattern of onion plants*, Journal of Basic Microbiology, 60(8), 2020, s. 712-721.
43. Hosseinzeynali A., Abbaszadeh Dahaji P., Alaei H., Hosseinifard J., Akhgar A., *Effect of Trichoderma on growth and nutrition of pistachio trees under common garden condition*, Journal of Soil Biology, 8(2), 2021, s. 115-129.
44. Khosa S.S., Younis A., Rayit A., Yasmeen S., Riaz A., *Effect of foliar application of macro and micro nutrients on growth and flowering of Gerbera jamesonii L.*, American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Sciences, 11, 2011, s. 736-757.
45. Lahijie M.F., *Application of micronutrients FeSO₄ and ZnSO₄ on the growth and development of Gladiolus variety „Oscar”*, International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 4, 2012, s. 718-720.

Trichoderma spp. – biostymulator dla roślin ozdobnych

Streszczenie

Na całym świecie prowadzone są badania mające na celu określenie wpływu *Trichoderma* spp. na rośliny z różnych grup. Dominują badania na roślinach użytkowych – jadalnych. Mało natomiast jest informacji na temat wpływu tych grzybów na rośliny ozdobne, stąd w niniejszej pracy prześledzono badania oceniające wpływ *Trichoderma* spp. na wzrost, kwitnienie, jakość i stan odżywienia roślin ozdobnych. Stwierdzono, że zasiedlenie korzeni roślin ozdobnych *Trichoderma* spp. uzależnione jest od gatunku i wynosi od 30% do 100%. *Trichoderma* spp. stymulują wydłużanie (lantana, kalanchoe) i grubienie pędów (lantana), tworzenie liści (begonia bulwiasta *Picotee Sunburst*, kalanchoe, lantana), stymulują ponadto lub hamują wydłużanie liści (tulipan *Golden Parade*). Wpływają także na wcześniejsze kwitnienie roślin (begonia bulwiasta *Picotee Sunburst*, mieczyk, tulipan *Golden Parade*). Stymulują wydłużanie pędów kwiatostanowych (mieczyk) i kwiatostanów (mieczyk, frezja *Argentea*) oraz rozwój kwiatów (begonia bulwiasta *Picotee Sunburst*, frezja *Argentea*, mieczyk ogrodowy *Advances Red*). Ponadto *Trichoderma* spp. korzystnie wpływają na zawartość chlorofilu (begonia bulwiasta *Picotee Sunburst*, mieczyk ogrodowy *Advances Red*) i karotenoidów w liściach (mieczyk ogrodowy *Advances Red*) oraz stymulują pobieranie P, K, Ca (frezja *Argentea*, mieczyk ogrodowy *Advances Red*), Zn i Fe (begonia bulwiasta *Picotee Sunburst*, frezja *Argentea*, mieczyk ogrodowy *Advances Red*), B (begonia bulwiasta *Picotee Sunburst*, mieczyk ogrodowy *Advances Red*) oraz Cu i Zn (frezja *Argentea*). Słowa kluczowe: rośliny ozdobne, *Trichoderma* spp., kwitnienie, jakość, mikro- i makroelementy

***Trichoderma* spp. – a biostimulant for ornamental plants**

Abstract

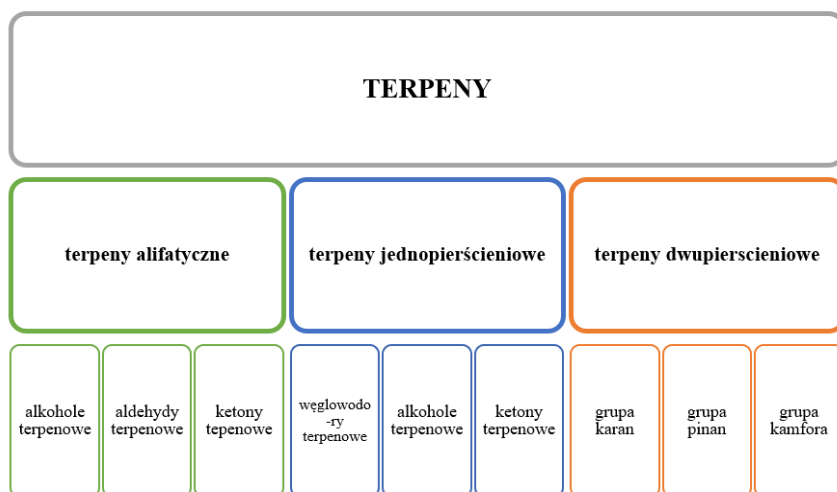
Scientists all over the world conduct research to determine the influence of *Trichoderma* spp. on various groups of plants, mostly crops. However, there is little information on the influence of these fungi on ornamental plants. Therefore, of this study analysed the influence of *Trichoderma* spp. on the growth, flowering, quality, and nutritional status of ornamental plants. The research showed that the colonisation of the roots of ornamental plants by *Trichoderma* spp. was species-dependent and ranged from 30% to 100%. *Trichoderma* spp. stimulated the elongation (*Lantana camara*, *Kalanchoe* sp.) and thickening of shoots (*Lantana camara*), and the formation of leaves (*Begonia* × *tuberhybrida* ‘Picotee Sunburst’, *Kalanchoe* sp., *Lantana camara*). The fungi also stimulated or inhibited leaf elongation (*Tulipa gesneriana* ‘Golden Parade’). They also accelerated the flowering of plants (*Begonia* × *tuberhybrida* ‘Picotee Sunburst’, *Gladiolus* sp., *Tulipa gesneriana* ‘Golden Parade’), stimulated the elongation of inflorescence shoots (*Gladiolus* sp.) and inflorescences (*Gladiolus* sp., *Freesia refracta* ‘Argentea’) and the development of flowers (*Begonia* × *tuberhybrida* ‘Picotee Sunburst’, *Freesia refracta* ‘Argentea’, *Gladiolus hybridus* ‘Advances Red’). Apart from that, *Trichoderma* spp. positively influenced the content of chlorophyll (*Begonia* × *tuberhybrida* ‘Picotee Sunburst’, *Gladiolus hybridus* ‘Advances Red’) and the content of carotenoids in leaves (*Gladiolus hybridus* ‘Advances Red’). The fungi stimulated the uptake of P, K, Ca (*Freesia refracta* ‘Argentea’, *Gladiolus hybridus* ‘Advances Red’), Zn, Fe (*Begonia* × *tuberhybrida* ‘Picotee Sunburst’, *Freesia refracta* ‘Argentea’, *Gladiolus hybridus* ‘Advances Red’), B (*Begonia* × *tuberhybrida* ‘Picotee Sunburst’, *Gladiolus hybridus* ‘Advances Red’), Cu and Zn (*Freesia refracta* ‘Argentea’).

Keywords: ornamental plants, *Trichoderma* spp., flowering, quality, micro- and macroelements

Właściwości lecznicze linalolu

1. Wprowadzenie

Terpeny [(C₅H₈)_n, izoprenoidy] to organiczne związki chemiczne, do których zaliczane są terpeny alifatyczne, jednopierscieniowe oraz dwupierscieniowe (rys. 1). Ich główny szkielet powstał w wyniku połączenia pięciowęglowych jednostek izoprenowych. Przez bardzo długi czas zarówno terpeny, jak i terpenoidy uważano za tzw. nieistotne związki, które odpowiedzialne są jedynie za zapach. Wraz z upływem czasu oraz coraz to nowszymi badaniami zauważono, że terpeny dodatkowo wykazują wiele właściwości zdrowotnych [1].



Rysunek 1. Klasyfikacja terpenów [opracowanie własne]

Na szczególną uwagę zasługują monoterpeny, które wykazują najsilniejsze właściwości zdrowotne. Olejki eteryczne o wysokiej zawartości terpenów znajdują liczne zastosowania w leczeniu wielu schorzeń, takich jak schorzenia górnych dróg oddechowych oraz układu pokarmowego. Dodatkowo wykazują one działanie antybakteryjne i przeciwwirusowe. Wiele z nich działa dezynfekująco, jak również aseptycznie na skórę. Olejki eteryczne o wysokiej zawartości terpenów pobudzają krążenie w skórze, przez co poprawiają jej ukrwienie. Inne badania wykazały, że skutecznie poprawiają samopoczucie i łagodzą dolegliwości bólowe, głównie w obrębie mięśni. W zależności od zastosowania i pochodzenia – terpeny mogą działać pobudzająco lub uspokajająco. Inne zastosowania terpenów to przede wszystkim działanie przeciwnowotworowe, działanie

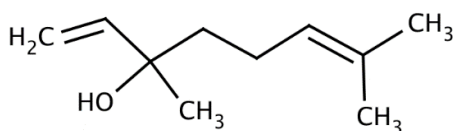
¹ abieda@ajp.edu.pl, Zakład Energetyki i Bezpieczeństwa Technicznego, Wydział Techniczny, Akademia im. Jakuba z Paradyża w Gorzowie Wielkopolskim, www.ajp.edu.pl.

² awroblewska@zut.edu.pl, Katedra Inżynierii Materiałów Katalitycznych i Sorpcyjnych, Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej, Zachodniopomorski Uniwersytet Techniczny w Szczecinie, www.zut.edu.pl.

przeciwgrzybiczne i immunologiczne, jak również zdolność rozpuszczania kamieni cholesterolowych i żółciowych. W ostatnim czasie bardzo dużym zainteresowaniem cieszy się temat związany z wykorzystaniem terpenów w leczeniu nowotworów, w szczególności skóry, sutka, wątroby oraz płuc [2].

Dodatkowo terpeny są stosowane w roli rozpuszczalników oraz substancji zapachowych. Udowodniono, iż wraz ze zwiększaniem wielkości cząsteczki terpenu zmniejsza się intensywność jego zapachu. Wyższe terpeny stosuje się m.in. jako składniki leków oraz kosmetyków wykazujących działanie przeciwalergiczne, antyoksydacyjne oraz przeciwzapalne. Niezwykle duża ilość terpenów, ze względu na intensywny i przyjemny zapach, wykorzystywana jest w przemyśle perfumeryjnym oraz w kosmetyce [3, 4].

Linalol (3,7-dimetylooktadi-1,6-en-3-ol, $C_{10}H_{18}O$, LO) to naturalny terpen o zapachu podobnym do olejku lawendowego oraz bergamotowego. Inna nazwa, z którą można się spotkać w przypadku linalolu to alkohol linalilowy. Jego masa molowa wynosi 154,25 g/mol, natomiast temperatura wrzenia – około 198°C (rys. 2).



Rysunek 2. Wzór strukturalny linalolu [opracowanie własne]

LO stanowi mieszaninę dwóch stereoisomerów: likareolu i koriandrolu. Czysty LO można otrzymać w wyniku frakcjonowanej destylacji olejków, głównie z olejku kolenkowego, pomarańczowego oraz linalowego, jak również z takich roślin jak: cynamon, bazylija, mięta, cytrusy oraz brzoza brodawkowata (rys. 3).



Rysunek 3. Surowce roślinne linalolu [opracowanie własne]

Na poziomie przemysłowym produkcję syntetycznego LO szacuje się na około 12 000 ton/rok, z czego ponad 95% jest wykorzystywanych w przemyśle perfumeryjnym oraz jako substancje zapachowe w kosmetykach, mydłach, perfumach, środkach czystości itd. W sektorze perfumeryjnym stosuje się LO głównie pochodzenia syntetycznego.

Występuje on w 60-90% produktów kosmetycznych (balsamy do ciała, szampony, żele, mydła, lakiery do włosów, kremy, dezodoranty). Jest również dodawany do domowych środków czystości, środków do pielęgnacji mebli, wosków itp., a także do przetworzonej żywności i napojów oraz jako zapach i środek aromatyzujący [5, 6].

Wśród producentów LO, zarówno naturalnego jak i syntetycznego, należy wymienić takie firmy jak:

- DSM Nutritional (Dania) i Takasago (Japonia);
- Renessenz Prinova (Stany Zjednoczone);
- BASF (Niemcy) [7].

Celem niniejszej pracy było przedstawienie najnowszych badań dotyczących aktywności biologicznej linalolu, przy czym skupiono się głównie na zastosowaniach medycznych tego związku.

2. Właściwości biologiczne linalolu

2.1. Właściwości przeciwbólowe oraz antynocyceptywne

Dotychczas wiele z przeprowadzonych badań potwierdziło działanie przeciwbólowe oraz antynocyceptywne LO. Nocycepcja to reakcja czuciowego układu nerwowego na potencjalny szkodliwy bodziec. Olejek eteryczny z *Citrus bergamia*, znany jako olejek bergamotowy, wykazuje właściwości antynocyceptywne, w których pośredniczy poprzez obwodowe receptory opioidowe [8]. Utlenione monoterpeny, w tym linalol i octan linalylu, są głównymi składnikami olejku eterycznego z bergamotki, którego działanie antynocyceptywne jest ściśle związane z ilością linalolu obecnego w kompozycji olejowej [9]. Kuwahata i in. [9] wykazują, iż miejscowe wstrzyknięcie linalolu w pułpkę lędźwiową w modelach myszy poddanych neuropatycznej nadwrażliwości, wywołanej częściowym podwiązaniem nerwu kulszowego (PSNL), powoduje zmniejszenie objawów bólowych. Co więcej, w tym samym badaniu Kuwahata i in. [9] opisali, że skojarzone miejscowe podanie linalolu (5,0 µg/łapę) w porównaniu do różnych dawek morfiny (4, 16 i 64 µg/łapę) – przeciwko indukowanej nadwrażliwości neuropatycznej – ma bardziej przedłużone działanie przeciw allodynii.

W terapii przeciwnowotworowej jednym z powszechnie stosowanych chemioterapeutyków i środkiem przeciwmiotycznym jest paklitaksel, który może wywołać neuropatię obwodową uzupełnioną ostrymi objawami bólowymi. Katsuyama i in. [10] donieśli, że w mysim modelu ostrego bólu wywołanego paklitakselem podskórne wstrzyknięcie LO w tylną łapę myszy wywarło działanie przeciw allodynii i działało miejscowo przeciw przeczulicy bólowej. Stało się to po części dzięki aktywacji obwodowych mechanizmów opioidowych (interakcja z receptorami muskarynowymi lub receptorami adenyzykowymi). Batista i in. [11] podawali aminokwas (glutaminę) do tylnej łapy myszy w celu wywołania nocycepcji, która nastąpiła poprzez aktywację receptorów glutaminianergicznych w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. LO podawano przed lub w tym samym czasie co glutaminian. Okazało się, że LO zmniejsza bodziec bólowy m.in. dzięki interakcji z jonotropowymi receptorami glutaminianergicznymi.

Dodatkowo LO może zostać zastosowany w leczeniu zespołu cieśni nadgarstka (ZCN, ang. CTS – *carpal tunnel syndrome*) [12]. CTS to przewlekła idiopatyczna neuropatia wywodząca się z ucisku nerwu pośrodkowego. Inhalacja linalolem okazała się korzystna. LO spowodował obniżenie ciśnienia krwi u pacjentów z ZCN, tym samym poprawiała

się ich stabilność emocjonalną. Badania wskazują, że linalol może przynieść korzyści pacjentom z CTS.

Inne badania pokazują aktywność antynocyceptywną LO w dwóch różnych modelach bólu u myszy: wywołanego kwasem octowym i bólu zapalnego. Ponadto oceniano wpływ LO na spontaniczną aktywność lokomotoryczną. Wyniki pokazują, że związek ten powodował znaczące zmniejszenie bólu wywołanego kwasem przy dawkach w zakresie od 25 do 75 mg/kg. LO indukował zależny od dawki wzrost zdolności motorycznych, wykluczając w ten sposób zakłócający wpływ możliwego działania uspokajającego [13].

Batista i in. [14] wykorzystali wiele modeli bólu, aby zbadać wpływ LO na przewlekłą nadwrażliwość zapalną i neuropatyczną u dorosłych szwajcarskich myszy. Nadwrażliwość zapalną lub neuropatyczną indukowano odpowiednio przez dopodeszwowe wstrzyknięcie kompletnego adiuwantu Freund'a (CFA, ang. *complete Freund's adjuvant*) lub częściowe podwiązanie nerwu kulszowego (PSNL, ang. *partial sciatic nerve ligation*). Dwadzieścia cztery godziny po wstrzyknięciu CFA zastosowano włókna von Freya i chłodzenie acetonem, aby ocenić odpowiednio nadwrażliwość dotykową i termiczną. Zastrzyk (-)-linalolu (50 lub 200 mg/kg) podany 30 minut przed badaniem zmniejszył nadwrażliwość mechaniczną indukowaną przez CFA. Podobnie LO zmniejszał nadwrażliwość wywołaną acetonem do 4 godzin po leczeniu. LO powodował znaczne zmniejszenie obrzęku łapy wywołanego przez CFA. LO zmniejszał również nadwrażliwość mechaniczną indukowaną przez PSNL 7 dni po urazie. Wielokrotne leczenie LO podawanym w długim okresie czasu (dwa razy dziennie przez 10 dni; 50 mg/kg) znacząco zmniejszało nadwrażliwość mechaniczną indukowaną przez CFA i PSNL. Ta strategia wielodawkowa nie powodowała tolerancji. Dodatkowo LO może zmniejszać zachowania nocyceptywne w odpowiedzi na bezpośrednie podanie mediatorów stanu zapalnego. LO znacząco hamował odpowiedź na gryzienie indukowaną przez IL-1 β i TNF- α .

2.2. Właściwości przeciwzapalne

Pasteurella multocida jest bakterią Gram-ujemną, która może powodować poważne infekcje, zwłaszcza w płucach ssaków. Wu i in. [15] donoszą, że linalol moduluje szlak stresu oksydacyjnego w zapaleniu płuc wywołanym przez *P. multocida*. Linalol aktywuje czynnik związany z erytroidem 2 (Nrf-2). Aktywowany Nrf-2 wytwarza enzymy antyoksydacyjne, które mogą zapewnić odporność na rozwój zapalenia płuc, infiltracji neutrofilii, uwalnianie prozapalnych cytokin i obciążenie bakteriami. Wu i in. [15] potwierdzili, że linalol aktywuje Nrf-2 i działa poprzez szlak stresu oksydacyjnego w płucach, w których pośredniczą patogeny zapalne mające powiązane działanie przeciwzapalne i przeciwdrobnoustrojowe. Linalol okazał się aktywny w przypadku bakteryjnego zapalenia płuc. Reakcje zapalne wywołane chorobami, takimi jak cukrzyca i choroby układu krążenia, można złagodzić poprzez zastosowanie linalolu, który oddziałuje z białkami, takimi jak: COX-2, NF- κ B i Nrf-2 [16]. Ponadto linalol może wchodzić w interakcje z enzymami syntazy tlenu azotu (NOS), hamując produkcję tlenu azotu (NO) bez zmniejszania syntezy enzymu [17]. Działanie linalolu na NO może być związane z jego przeciwzapalnymi właściwościami.

Linalol i octan linalylu są głównymi składnikami wielu olejków eterycznych. Peana i in. [18] ocenili właściwości przeciwzapalne linalolu i jego racematu. Ponieważ w olejkach eterycznych zawierających linalol często występuje octan linalilu, dlatego zdecydowano się na jego przebadanie. Obrzęk wywołany karageniną u szczurów wykorzystano

jako model zapalenia. Dane doświadczalne wskazują, że zarówno czysty enancjomer, jak i jego racemat po podaniu ogólnoustrojowym powodowały zmniejszenie obrzęku. Ponadto czysty enancjomer w dawce 25 mg/kg wywoływał opóźnione i dłuższe działanie, podczas gdy postać racematu powodowała znaczne zmniejszenie obrzęku tylko godzinę po podaniu karageniny. Przy wyższych dawkach nie zaobserwowano różnic między enancjomerem a racematem. Dalszy wzrost dawki obu form nie powodował zwiększenia efektu w żadnym momencie obserwacji. Wpływ równomolowych dawek octanu linalilu na obrzęk miejscowy był mniej istotny i bardziej opóźniony niż wpływ odpowiedniego alkoholu. Otrzymane wyniki wskazują, że linalol i odpowiedni octan odgrywają główną rolę w aktywności przeciwzapalnej, wykazywanej przez zawierające je olejki eteryczne, i dostarczają dalszych dowodów sugerujących, że linalol i octan linalilu są potencjalnie środkami przeciwzapalnymi.

Linalol jest jednym z głównych składników olejku kadzidłowego, który poprzez hamowanie cyklooksygenazy-2 (COX-2) odpowiada za działanie przeciwzapalne i przeciwbólowe. Aby zbadać przeciwzapalne działanie linalolu, Huo i in. [19] wywołali ostre zapalenie płuc z wykorzystaniem lipopolisacharydu, prototypowej endotoksyny, która może bezpośrednio aktywować makrofagi indukujące produkcję cytokin zapalnych – czynnika martwicy nowotworu- α (TNF- α) i interleukina-6 (IL-6) – poprzez stymulację czynnika jądrowego kappa B (NF- κ B). Następnie, stosując test immunoenzymatyczny i western blot, autorzy stwierdzili, że linalol osłabił produkcję indukowanego przez LPS TNF- α i IL-6 zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Ponadto w komórkach RAW 264,6 linalol blokował aktywację nie tylko szlaku NF- κ B, ale także szlaku kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK). W związku z tym linalol wykazuje działanie przeciwzapalne w stymulowanych LPS komórkach RAW 264,6 i w modelach zwierzęcych ostrego zapalenia płuc wywołanego przez LPS, co wskazuje, że linalol może być potencjalnym nowym środkiem terapeutycznym w leczeniu chorób zapalnych.

Spożywanie papierosów jest jedną z przyczyn przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP) [20]. Toksyczna mieszanina chemikaliów, w tym dym papierosowy, powoduje uporczywy stan zapalny w płucach. Podczas tego procesu, zapalne cytokiny i chemokiny TNF- α , IL-6, interleukina-1-beta (IL-1 β), interleukina-8 (IL-8) i białko – traktujące chemoat monocytów-1 (MCP-1) – są rekrutowane do płuc i w ten sposób hamowana jest ich produkcja. Ma i in. [20] wykazali, że linalol osłabia chorobę płuc wywołaną dymem papierosowym, ponieważ hamuje on zarówno infiltrację komórek zapalnych, jak i wytwarzanie TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8 i MCP-1. W rzeczywistości oba te badania – Huo i in. [19] oraz Ma i in. [20] – podają, że hamowanie produkcji cytokin jest spowodowane hamującym działaniem linalolu w stosunku do komórek NF- κ B. Ponadto Li i in. [21] zasugerowali, że linalol hamuje indukowany LPS stan zapalny w komórkach mikrogleju BV2, nie tylko na NF- κ B, ale także przez aktywację czynnika/hem związanego z czynnikiem erytroidalnym oksygenazy-1 (Nrf2/HO-1).

2.3. Właściwości przeciwhiperlipidemiczne

Zarówno w krajach rozwiniętych, jak i nierozwiniętych występuje problem otyłości, głównie ze względu na nowoczesny styl życia związany ze zmniejszonym dobowym wydatkiem energetycznym i wzrostem spożycia niezdrowej żywności [22]. Hiperlipidemia jest ściśle związana ze wzrostem poziomu cholesterolu całkowitego, glukozy we krwi i trójglicerydów, które są głównymi czynnikami predysponującymi do cukrzycy

i chorób układu krążenia [23]. Cheng i in. [22] zbadali skutki wywołane przez spożycie olejku eterycznego z *Cinnamomum osmophloeum* i linalolu w różnicowaniu adipocytów przy użyciu komórek 3T3-L1. Linalol powodował utrzymanie optymalnych wartości glukozy i cholesterolu u myszy. Wywarł również wpływ na całkowite wartości triglicerydów, powodując ich spadek o 25%. Te odkrycia wskazują, że linalol może mieć działanie ochronne na układ krążenia. Zarówno olejek eteryczny, jak i linalol w dużych dawkach (100 µg/ml), może znacząco hamować produkcję lipidów. Przeprowadzone badania udowodniły, że (3S)-(+)-linalol wykazuje potencjał do stosowania w przypadku kontroli masy ciała bez szkodliwych skutków ubocznych.

Hipercholesterolemia jest kluczowym czynnikiem ryzyka miażdżycy ze względu na powstawanie miażdżycy po nagromadzeniu cholesterolu w tętnicy wieńcowej tętnic i późniejszy rozwój choroby wieńcowej [24]. Fitochemikalia z ziół i herbat mogą obniżać poziom cholesterolu w osoczu, co może być ważne w zwalczaniu chorób sercowo-naczyniowych, zwłaszcza u osób z łagodną hipercholesterolemią. Cho i in. [24] zbadali hipocholesterolemiczny wpływ linalolu na myszy C57BL/6 J i komórki HepG2. U myszy oba – niskie (0,57 mg/mysz/dzień) i wysokie (120 mg/mysz/dzień) – stężenia linalolu wykazywały podobne działanie hipocholesterolemiczne, tj. niskie stężenie linalolu wystarczyło do obniżenia poziomu cholesterolu w osoczu u myszy. Działanie hipocholesterolemiczne linalolu zostało osiągnięte głównie dzięki zmniejszonej ekspresji reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylo-CoA (HMGCR). Spadek HMGCR wynikał częściowo z wywołanej przez linalol redukcji białka wiążącego element regulatorowy sterolu 2 (SREBP-2). Przeprowadzone badania potwierdzają, iż linalol wykazuje korzystne działanie w leczeniu hipercholesterolemii.

2.4. Właściwości przeciwdrobnoustrojowe

Linalol to skuteczny związek przeciwbakteryjny, wykazujący również właściwości przeciwgrzybicze. Herman i in. [25] udowodnili, że linalol wykazuje potencjał w kierunku znacznego zwiększenia skuteczności przeciwdrobnoustrojowej. Dostępne w handlu olejki eteryczne z *Thymus vulgaris* (tymianek), *Juniperus communis* (jałowiec), *Pelargonium graveolens* (geranium), *Citrus bergamium* (bergamotka), *Citrus paradisi* (grejpfrut), *Lavandula angustifolia* (lawenda), *Cinnamomum zeylanicum* (cynamon), *Melaleuca alternifolia* (drzewo herbaciane) oraz *Syzygium aromaticum* (olejek goździkowy) były wzbogacane o linalol i *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 12924, *Escherichia coli* NCTC 12923, *Staphylococcus aureus* NCTC 10788, *Candida albicans* NCPF 3179 i *Aspergillus brasiliensis* NCPF 2275. Okazało się, że linalol wykazał wysoką aktywność przeciwdrobnoustrojową przeciwko *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans*. Zaobserwowano również, że linalol wykazywał silniejsze działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko *E. coli* niż *J. communis*, *C. bergamium* i *P. graveolens* aniżeli same olejki eteryczne. Dodatek linalolu do olejku eterycznego wzmocnił jego skuteczność przeciwdrobnoustrojową przeciwko *P. aeruginosa* i *A. brasiliensis*. Stwierdzono również, że linalol zwiększył skuteczność przeciwdrobnoustrojową olejku *T. vulgaris* wobec *P. aeruginosa*. Tak więc dodatek linalolu synergistycznie zwiększa działanie przeciwdrobnoustrojowe olejków eterycznych.

Choroby przyzębia i próchnica stanowią infekcje jamy ustnej spowodowane przez bakterie. Park i in. [26] przetestowali linalol na różnych szczepach bakterii, takich jak: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium*

nucleatum, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Streptococcus mutans* i *Streptococcus sobrinus*. Wrażliwość szczepów *P. gingivalis* i *P. intermedia* na linalol była zróżnicowana w zależności od szczepu. To samo zostało zweryfikowane w przypadku szczepów paciorkowców. Autorzy zasugerowali, że linalol wykazuje działanie przeciwdrobnoustrojowe poprzez niszczenie ścian komórkowych bakterii, hamowanie aktywności enzymów bakteryjnych i tłumienie translacji niektórych produktów genów regulatorowych. Ponadto autorzy doszli do wniosku, że linalol wykazywał silne działanie przeciwdrobnoustrojowe przeciwko periodontopatom i próchnicogennym bakteriom. Jeśli jednak linalol ma być stosowany jako składnik past do zębów lub jako roztwór do płukania gardła, należy przedsięwziąć środki ostrożności, ponieważ stężenie linalolu wyższe niż 0,4 mg/ml może działać drażniąco na błonę śluzową jamy ustnej.

Innym przykładem właściwości przeciwbakteryjnych linalolu jest jego zastosowanie jako antybiofilm przeciwko patogenom (*Salmonella*, *Escherichia coli* i *Campylobacter*), które zanieczyszczają żywność. Duarte i in. [27] pokazali, że linalol wykazuje działanie antybiofilmowe przeciwko szczepom *Campylobacter* i *Campylobacter coli*. Ponadto wykazano, że stosowanie olejku z kolendry lub linalolu może wydłużyć okres przydatności do spożycia i zwiększyć bezpieczeństwo żywności. Oprócz działania na patogeny bakteryjne linalol posiada również właściwości przeciwgrzybicze. *Candida spp.*, zwłaszcza *Candida albicans*, są powszechnymi składnikami normalnej mikroflory człowieka i na ogół zasiedlają jamę ustną, drogi oddechowe i jelitowe oraz jamę pochwy. Hsu i in. [28] wykazali przeciwgrzybicze działanie linalolu wobec *C. albicans* ATCC 14053. Wyniki wskazują, że linalol może mieć potencjał terapeutyczny w leczeniu kandydozy wywołanej *C. albicans*. Ponadto protezy dentystyczne są podatne na infekcje *Candida*, w szczególności *C. tropicalis*, które mogą przedostawać się do jamy ustnej [29]. W badaniach Souza i in. [29] przebadano właściwości przeciwgrzybicze kilku olejków eterycznych. Okazało się, że olejek eteryczny *Pelargonium graveolens* był najbardziej skuteczny przeciwko biofilmom *C. tropicalis*. Linalol jest jednym z głównych składników olejku eterycznego *Pelargonium graveolens*, dlatego autorzy przetestowali również sam związek i stwierdzili, że linalol zapobiega tworzeniu się biofilmów *C. tropicalis*. Uzyskane wyniki pokazują szczególne znaczenie linalolu w leczeniu infekcji jamy ustnej wywołanej przez grzyby.

2.5. Właściwości przeciwlękowe i przeciwdepresyjne

Szybkie tempo codziennego życia przyczynia się do wzrostu zachorowalności na choroby psychiczne. W tradycyjnej medycynie brazylijskiej olejki eteryczne z *Aniba rosaedora*, *Aniba parviflora* i *Aeollanthus suaveolens* są znane ze swoich właściwości uspokajających i przeciwdepresyjnych. Wspólną cechą olejków eterycznych *Aniba rosaedora*, *Aniba parviflora* i *Aeollanthus suaveolens* jest wysoka zawartość linalolu (od 45 do 88,6%). Dos Santos i in. [30] ocenili właściwości przeciwdepresyjne brazylijskich olejków eterycznych i linalolu na modelach myszy, które zostały poddane testom dotyczącym pomiaru aktywności anksjolitycznej w celu sprawdzenia ich działania przeciwdepresyjnego, czynności lokomocyjnej oraz aktywności na retencję pamięci. Okazało się, że linalol jest głównym składnikiem odpowiedzialnym za antydepresyjne i przeciwlękowe właściwości olejków eterycznych. Dodatkowo linalol wpływa na pobudliwość neuronów poprzez hamowanie zależnych od napięcia kanałów sodowych.

Guzman-Gutierrez i in. [31] przeprowadzili badania na olejku eterycznym *Litsea glaucescens*, który stosowany jest w medycynie meksykańskiej. Właściwości tego

olejku są mocno uzależnione od stężenia w nim β -pinenu i linalolu. Autorzy publikacji udowodnili, że dootrzewnowe podanie linalolu (100 mg/kg) zmniejsza zdolność poruszania się u myszy, co wywołuje działanie uspokajające, być może spowodowane działaniem linalolu na receptory NMDA. Guzman-Gutierrez i in. [32] donoszą, że linalol wykazuje działanie przeciwdepresyjne i relaksujące poprzez receptory: serotoninowy 1A (znany również jako receptor 5-HT_{1A}) oraz α 2 adrenergiczne.

Olejek eteryczny z liści *Cinnamomum osmophloeum* zawiera około 90% linalolu i jest powszechnie stosowany w leczeniu lęku [33]. Testy przeprowadzone na myszach wskazują, iż linalol wykazywał właściwości anksjolityczne bez pogarszania czynności lokomotorycznych zwierząt. Cheng i in. [33] opisali, że po podaniu doustnym linalol zmniejsza ilość 5-hydroksytryptofanu (5-HT), dopaminy i noradrenaliny w korze czołowej myszy. Ponadto autorzy wykazali, że (3S)-(+)-linalol zwiększył poziom dopaminy w prążkowie (zwojach podstawy), będąc tym samym potencjalnym aktywnym związkiem w leczeniu choroby Parkinsona.

Aromaterapia to niekonwencjonalna terapia łagodząca objawy depresji i lęku, a także bezsenność. Ta terapia wykorzystuje aromatyczne olejki eteryczne, które oddziałują z centralnym nerwem (CNS) dzięki łatwemu przechodzeniu składników olejków przez barierę krew–mózg [34]. Linalol jest głównym składnikiem szerokiej gamy olejków eterycznych stosowanych w aromaterapii, takich jak np. olejek lawendowy. Linck i in. [35] opisali, że w modelach myszy wdychanie linalolu wywołuje działanie uspokajające, prawdopodobnie poprzez wywieranie antagonistycznego działania na receptory NMDA.

Linck i in. [36] zauważyli, że wdychanie linalolu w modelach mysich wykazuje działanie przeciwlękowe takie jak diazepam (lek psychotropowy).

Farmakologiczne działanie olejku lawendowego zbadano za pomocą dwóch testów konfliktowych na myszach ICR. Olejek lawendowy spowodował działanie przeciwlękowe przy zastosowaniu go w ilości 800 i 1600 mg/kg w teście Gellera i 800 mg/kg w teście Vogla. Analiza metodą GC/MS wykazała, że olejek lawendowy zawiera 26 składników, w tym α -pinen (w stosunku 0,22%), kamfen (0,06%), β -mircen (5,33%), p-cymen (0,3%), limonen (1,06%), cyneol (0,51%), linalol (26,12%), borneol (1,21%), terpinen-4-ol (4,64%), octan linalilu (26,32%), octan geranylu (2,14%) i kariofilen (7,55%). Zbadano wpływ linalolu, octanu linalilu, borneolu, kamfenu, cyneolu, terpinen-4-olu, α -pinenu i β -mircenu za pomocą testów konfliktu Gellera i Vogla u myszy z genem ICR. Cineol, terpinen-4-ol, α -pinen i β -mircen nie wywoływały żadnych znaczących efektów przeciwlękowych w teście Gellera. Octan linalilu nie wywoływał żadnych znaczących efektów. Zarówno borneol, jak i kamfen w dawce 800 mg/kg wywoływały znaczące efekty przeciwkonfliktowe w teście Gellera, ale nie w teście konfliktu Vogla. Linalol, główny składnik olejku lawendowego, wywoływał znaczące efekty przeciwkonfliktowe odpowiednio przy 600 i 400 mg/kg w testach Gellera i Vogla, które były podobne do wyników olejku lawendowego. Badania te pokazały, że linalol jest głównym aktywnym farmakologicznie składnikiem biorącym udział w przeciwlękowym działaniu olejku lawendowego [37].

Marihuanę leczniczą definiuje się jako produkt na bazie konopi. Badania związków konopi w chorobach psychicznych i neurologicznych skupiają się przede wszystkim na głównych kannabinoidach, kannabidiolu (CBD) i Δ 9-tetrahydrokannabinolu (Δ 9-THC), które wpływają korzystnie na wiele chorób objawiających się upośledzeniem funkcji poznawczych, neurodegeneracją i stanem zapalnym układu nerwowego, a także przewlekłym

bólem, padaczką oraz zespołem stresu pourazowego. Roślina konopi zawiera >500 związków, w tym terpeny odpowiedzialne za profile smakowe i zapachowe roślin. Ostatnio badania dostarczają dowodów na potencjalne zastosowanie niektórych terpenów pochodzenia roślinnego we współczesnej medycynie. Zbadano wpływ dwóch kluczowych terpenów – pinenu i linalolu – na parametry istotne dla zaburzeń neurologicznych i psychiatrycznych. Przeprowadzone badania sugerują, że pinen i linalol są odpowiednimi kandydatami do dalszych badań jako nowe leki na różne choroby, w tym udar, niedokrwienie, ból zapalny i neuropatyczny (w tym migrenę), zaburzenia poznawcze (związane z chorobą Alzheimera i starzeniem się), bezsenność, lęk i depresję. Linalol i pinen wpływają na wiele neuroprzekazników, sygnałów zapalnych i neurotroficznych oraz na zachowanie, wykazując psychoaktywność. Optymalizacja profilu fitochemicznego konopi może stanowić wyjątkową okazję do odkrycia nowych leków do leczenia chorób psychicznych i neurologicznych, jednak potrzebne są dalsze badania [38].

2.6. Właściwości przeciwnowotworowe oraz antyproliferacyjne

Obecnie w przemyśle farmaceutycznym kładziony jest silny nacisk na nowe leki stosowane w terapii onkologicznej. Aktualne badania pokazują, iż fitochemikalia, a w szczególności monoterpeny, wpływają na wewnątrzkomórkowe szlaki sygnałowe indukujące autofagię i apoptozę w różnych typach komórek nowotworowych [39]. W tradycyjnej medycynie japońskiej olejek *Lindera umbellata* jest stosowany w leczeniu nerwobólów oraz sztywności bólowej karku i pleców [40]. Olejek eteryczny *Lindera umbellata*, a także jego główny składnik – linalol – w tej samej dawce (5 lub 50 $\mu\text{g/ml}$) powodowały zahamowanie rozwoju komórek ludzkiej białaczki HL-60, różnicowanie i ostatecznie indukowanie apoptozy [40, 41].

Dodatkowo linalol indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego w niektórych typach raka. Sun i in. [42] wykazali, że linalol o stężeniach 20, 40 i 80 μM indukował sub-G1 poprzez zatrzymanie cyklu komórkowego, a w konsekwencji doprowadził do uszkodzenia DNA. Podobnie Chang i in. [43] wykazali, że w linii komórkowej białaczki szpikowej U937 linalol indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego, który powoduje zawieszenie replikacji, a w konsekwencji prowadzi do akumulacji uszkodzonego DNA i aktywacji mechanizmów supresji guza. Ponadto w niedawnym artykule Zhao i in. [44] potwierdzili cytotoksyczne działanie linalolu na komórki raka prostaty DU145 i PC-3 (ludzki kaukaski gruczolak prostaty). W PC-3 linii komórkowej wrażliwość na linalol jest wyższa w porównaniu z linią komórkową DU145, ponieważ w pierwszej linii ekspozycja na linalol indukuje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G2/M. Ten sam mechanizm występuje w komórkach HeLa, prowadząc do wzrostu ekspresji genów supresorowych nowotworów, takich jak: p53, p21, p27, p16 i p18 oraz inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (CDKI), które mogą aktywować mechanizmy śmierci komórkowej [45].

Przeprowadzone do tej pory badania wykazały, iż potencjalne właściwości przeciwnowotworowe linalolu są ściśle związane z jego działaniem proapoptotycznym. W linii komórek czerniaka ludzkiego RPMI 7932 Cerchiara i in. [46] udowodnili, że stosując immunobarwienie fluorescencyjne, linalol aktywuje kaspazę 3, indukując apoptozę. Ponadto w linii komórkowej ludzkiego glejaka U87-MG linalol nie tylko zwiększał kaspazę 9 i 3, ale także zwiększał ekspresję czynników proapoptotycznych (Bax i Bak) oraz redukował czynniki antyapoptotyczne (Bcl-2 i Bcl-xl) aktywujące wewnętrzny szlak apoptozy [47]. Linalol wykazywał hamujące działanie na komórki glejaka poprzez

regulację sirtuiny 3 – szlak sygnalizacyjny dysmutazy ponadtlenkowej 2 – reaktywnych form tlenu (SIRT3-SOD2-ROS). Dodatkowo linalol hamował ekspresję SIRT3, w konsekwencji zmniejszając aktywność SOD2, która doprowadziła do wzrostu produkcji ROS [47]. Wzrost produkcji ROS wywołany przez linalol (plus zmniejszenie zużycia tlenu przez mitochondria) aktywował ścieżkę apoptozy w linii komórkowej ludzkiego glejaka U87-MG.

Podobnie badania przeprowadzone przez Jana i in. [48] potwierdziły, że działania apoptotyczne i antyproliferacyjne linalolu są wynikiem zwiększenia produkcji ROS i zmniejszenia aktywności enzymów przeciwutleniających. Linalol wykazywał również selektywne działanie bioaktywne, indukując mechanizmy przeciwnowotworowe i antyproliferacyjne w komórkach nowotworowych oraz mechanizmy ochronne w prawidłowych komórkach [48].

Ponadto podczas testowania w szerokim zakresie stężeń 1-1000 $\mu\text{mol/L}$ linalol aktywował apoptozę ludzkich komórek raka okrężnicy, głównie HCT 116, poprzez generację ROS [49]. Iwasaki i in. [49] przeprowadzili badania *in vivo* na modelach mysich z heteroprzeszczepem ludzkiego raka okrężnicy i udowodnili, że doustne podawanie linalolu (w niższej dawce 100 mg/kg i wyższej 200 mg/kg) hamowało wzrost ludzkiego heteroprzeszczepionego nowotworu w mysim modelu, bez wywołania dodatkowych skutków ubocznych. Mitić-Ćulafić i in. [50] wywołali uszkodzenie DNA w ludzkich komórkach wątrobiaka (HepG2) oraz w ludzkim B limfoblastoid (NC-NC).

Linalol może również działać jako aktywator komórek odpornościowych odpowiedzialnych za jego działanie przeciwnowotworowe. W swoim badaniu Chang i Shen [49] wykazali, że linalol wykazuje działanie cytotoksyczne na SW 620 (ludzki kaukaski gruczolakorak jelita grubego) i T-47D (ludzki nowotwór piersi). Komórki HepG2 i A549 wykazują wartości IC₅₀ odpowiednio 222, 224, 290 i 438 μM . W szczególności – w komórkach T-47D – specyficzne dla nowotworu działanie linalolu jest związane z aktywacją odpowiedzi immunologicznej limfocytów Th1 (komórki pomocnicze T). Te komórki odpornościowe są aktywowane przez cytokiny, które są wytwarzane w komórkach T47D po ekspozycji na linalol.

Właściwości przeciwnowotworowe i antyproliferacyjne linalolu są wynikiem aktywacji szeregu różnych mechanizmów komórkowych. Uznaje się, że ekspozycja skóry na promieniowanie ultrafioletowe (UV) może powodować uszkodzenie DNA poprzez tworzenie dimerów cyklobutanu pirymidyny (CPD) oraz 6-4 fotoproduktów (6-4PPs) [51]. Gunaseelan i in. [52] donoszą, że w skórze narażonej na promieniowanie UV w modelach myszy z nowotworem linalol hamował ekspresję markerów proliferacyjnych, takich jak: NF- κB , TNF- α , IL-6, COX-2. Ponadto linalol zapobiegał nadmiernej ekspresji angiogennej na takie czynniki jak: czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) i transformujący czynnik wzrostu beta 1 (TGF- β 1). Ochronne działanie linalolu, które prowadzi do zmniejszenia zachorowalności na raka skóry wywołanego promieniowaniem UV u myszy, wynika z aktywacji kilku komórkowych szlaków sygnałowych.

Równie ciekawe badania zostały przeprowadzone na serii komórek rakowych pochodzących z ośmiu narządów ludzkich. Wyniki pokazują, że linalol wykazywał najsilniejsze działanie przeciwko dziewięciu komórkom rakowym, a bajkaleina i luteolina również wykazywały szerokie spektrum działania antyproliferacyjnego. Wśród nich linalol wykazywał najsilniejsze działanie przeciw rakowi szyjki macicy (IC₅₀: 0,37 $\mu\text{g/ml}$), żołądka (IC₅₀: 14,1 $\mu\text{g/ml}$), skóry (IC₅₀: 14,9 $\mu\text{g/ml}$), płuc (IC₅₀: 21,5 $\mu\text{g/ml}$) i kości

(IC50: 21,7 µg/ml). Spośród flawonoidów najsilniejsze działanie luteolina wykazywała wobec raka żołądka (IC50: 7,1 µg/ml), szyjki macicy (IC50: 7,7 µg/ml), płuc (IC50: 11,7 µg/ml) i pęcherza moczowego (IC50: 19,5 µg/ml), natomiast bajkaleina wykazywała najsilniejsze działanie antyproliferacyjne wobec raka szyjki macicy (IC50: 9,8 µg/ml), żołądka (IC50: 16,1 µg/ml) i skóry (IC50: 19,5 µg/ml). Niniejsze badanie pokazuje, że linalol wykazywał najsilniejsze działanie przeciwko szerokiemu spektrum komórek rakowych, zwłaszcza komórkom raka szyjki macicy, co sugeruje, że linalol i flawonoidy są częściowo odpowiedzialne za zapobieganie nowotworom poprzez spożywanie popularnych warzyw i owoców [53].

2.7. Właściwości neuroprotecyjne

Linalol wykazuje działanie przeciwdrgawkowe, zapewniając ochronę przed pentylenotetrazolem, pikrotoksyną i przed drgawkami rogówki wywołanymi elektrowstrząsami. Dodatkowo linalol ma właściwości hipotermiczne i wydłuża czas trwania snu wywołanego przez pentobarbital sodu. Linalol znajdujący się w olejku eterycznym *Salvia lavandulaefolia* mógłby znaleźć zastosowanie w leczeniu choroby Alzheimera [54]. Medeiros Venancio i in. [55] wykazali u szczurów posiadających nerw kulszowy, że (3R)-(–)-linalol hamował pobudliwość obwodowego układu nerwowego. Właściwości neuroprotecyjne linalolu są związane z regeneracją aksonów, co umożliwia powrót do zdrowia po urazie rdzenia kręgowego (SCI) [56]. SCI wiąże się z poważnym uszkodzeniem ruchowym, czuciowym i autonomicznym układu nerwowego. Kaka i in. [56] opisują, że *Lavandula angustifolia* wykazuje właściwości neuroprotecyjne, ponieważ jest w stanie promować regenerację strukturalną i funkcjonalną SCI.

Niedrożność naczyń krwionośnych w mózgu, która nastąpiła wskutek udaru, powoduje, że komórki mózgowe otrzymują tylko tlen bez glukozy. Brak dostaw energii powoduje zaburzenia w syntezie ATP, prowadząc do masowej generacji wolnych rodników oraz dodatkowo zwiększając stres oksydacyjny. Neurony są szczególnie podatne na stres oksydacyjny ze względu na ich ograniczoną zdolność antyoksydacyjną. Park i in. [57] ocenili neuroprotecyjne działanie (3R)-(–)-linalolu przeciwko uszkodzeniu neuronów korowych wywołanym reoksygenacją (dopływem) tlenu i glukozy (OGD/R) na model udaru niedokrwinnego mózgu *in vitro*. Ze względu na działanie antyoksydacyjne (wychwytywanie wolnych rodników) i działanie przeciwzapalne (3R)-(–)-linalol istotnie wpływa na uszkodzenie/śmierć neuronów korowych. Jak wspomniano powyżej, bogata w lipidy tkanka mózgowa jest szczególnie podatna na: peroksydację lipidów podczas niedokrwinnego stresu oksydacyjnego, stąd wysoka aktywność (3R)-(–)-linalolu.

Linalol wykazuje wpływ na neuroprzebieżność i skurcz mięśni gładkich powodujący rozluźnienie mięśni gładkich. Poyton i in. [58] zbadali wpływ linalolu na układ nerwowy. Okazało się, iż linalol wpływa (w 0,03%) na 5-HT, acetylocholinę, histaminę i noradrenalinę. Mechanizmy działania linalolu są wieloczynnikowe, co prowadzi do zahamowania propagacji presynaptycznego potencjału czynnościowego i postsynaptycznej odpowiedzi (wywołane receptorem sprzężonym z białkiem G). Oznacza to, że linalol zmniejsza stężenie receptora sprzężonego z białkiem G mięśni gładkich (GPCR).

3. Wnioski

Linalol (2,6-dimetylo-2,7-oktadien-6-ol) to aromatyczny alkohol monoterpenowy, powszechnie występujący w olejkach eterycznych i szeroko stosowany w perfumach, w kosmetykach, w domowych środkach czystości i w dodatkach do żywności. Niniejszy

przegląd wykazuje bioaktywne właściwościach linalolu, w tym działanie przeciwnowotworowe, przeciwdrobnoustrojowe, neuroprotektoryjne, przeciwłękowe, przeciwdepresyjne i przeciwstresowe. Oprócz tego omówiono również potencjał terapeutyczny linalolu. Dodatkowo linalol może indukować apoptozę komórek nowotworowych poprzez stres oksydacyjny, jednocześnie chroniąc zdrowe komórki. Linalol wywiera działanie przeciwdrobnoustrojowe poprzez rozerwanie błon komórkowych. Ochronne działanie linalolu na wątrobę, nerki i płuca wynika z jego działania przeciwzapalnego. Ze względu na działanie ochronne i niską toksyczność linalol może być stosowany jako adiuwant leków przeciwnowotworowych lub antybiotyków.

Literatura

1. Kędzia B., Holderna-Kędzia E., *Działanie terpenów roślinnych na drobnoustroje*, Postępy Fitoterapii, 2012, s. 4.
2. Wojciechowski J., Ceremuga M., Bijak M., Szyposzyńska M., *Terpeny: budowa, klasyfikacja oraz zastosowanie w przemyśle spożywczym, perfumeryjnym oraz farmaceutycznym*, Przemysł Chemiczny, 2019, s. 4.
3. Król S., Skalicka-Woźniak K., Kandefor-Szerszeń M., Stepulak A., *Aktywność biologiczna i farmakologiczna olejków eterycznych w leczeniu i profilaktyce chorób infekcyjnych*, Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej, 2013, s. 67.
4. Trytek M., Paduch M., Fiedurek J., Kandefor-Szerszeń M., *Monoterpeny – stare związki, nowe zastosowania i biotechnologiczne metody ich otrzymywania*, Biotechnologia, 2007, s. 1.
5. University of Lorraine, LCOMS/Food Neurotoxicology and Bioactivity, Bridoux Campus, Metz, France, *Toxicological aspects and pharmacotherapeutic properties of linalol, a natural terpene derivative of essential oils. Literature studies*, 2020.
6. Antoniuk K., Bylka W., *Aktywność biologiczna wybranych składników olejków eterycznych*, Postępy Fitoterapii, 1, 2020, s. 35-41.
7. Jabir M.S., Taha A.A., Sahib S.I., *Antioxidant activity of linalol*, Engineering and Technology Journal, 36, 2018, s. 64-67.
8. Pereira I., Severino P., Santos A., Silva A., Souto E., *Linalol bioactive properties and potential applicability in drug delivery systems*, Colloids and Surfaces B, Biointerfaces, 171, 2018, s. 566-578.
9. Kuwahata H., Komatsu T., Katsuyama S., Corasaniti M.T., Bagetta G., Sakurada S., Sakurada T., Takahama K., *Peripherally injected linalol and bergamot essential oil attenuate mechanical allodynia via inhibiting spinal ERK phosphorylation*, Pharmacol. Biochem. Behav., 103, 2013, s. 735-741.
10. Katsuyama S., Kuwahata H., Yagi T., Kishikawa Y., Komatsu T., Sakurada T., Nakamura H., *Intraplantar injection of linalol reduces paclitaxel-induced acute pain in mice*, Biomed. Res., 33, 2012, s. 175-181.
11. Batista P.A., Werner M.F.P., Oliveira E.C., Burgos L., Pereira P., Brum L.F.S., Santos A.R.S., *Evidence for the involvement of ionotropic glutamatergic receptors on the antinociceptive effect of (-)-linalol in mice*, Neurosci. Lett., 440, 2008, s. 299-303.
12. Seol G.-H., Kang P., Lee H.S., Seol G.H., *Antioxidant activity of linalol in patients with carpal tunnel syndrome*, BMC Neurol., 16, 2016, s. 17.
13. Peana A., D'Aquila P., Chessa M., Moretti M., Serra G., Pippia P., *(-)-Linalol produces antinociception in two experimental models of pain*, European Journal of Pharmacology, 460, 2003, s. 37-41.
14. Batista P., de Paula Werner M., Oliveira E., Burgos L., Pereira P., Filot da Silva Brum L., Story G., Santos A., *The antinociceptive effect of (-)-linalol in models of chronic inflammatory and neuropathic hypersensitivity in mice*, The Journal of Pain, 11, 2010, s. 1222-1229.

15. Wu Q., Yu L., Qiu J., Shen B., Wang D., Soromou L.W., Feng H., *Linalol attenuates lung inflammation induced by Pasteurella multocida via activating Nrf-2 signaling pathway*, Int. Immunopharmacol., 21, 2014, s. 456-463.
16. Chang M.Y., Shen Y.L., *Linalol exhibits cytotoxic effects by activating antitumor immunity*, Molecules, 19, 2014, s. 6694-6706.
17. Peana A.T., Moretti M.D.L., Watson R., Preedy V., *Linalol in essential plant oils: pharmacological effects*, Botanical Medicine in Clinical Practice, 2008, s. 716-724.
18. Tiziana A., *Anti-inflammatory activity of linalol and linalyl acetate constituents of essential oils*, Phytomedicine, 9, 2002, s. 721-726.
19. Huo M., Cui X., Xue J., Chi G., Gao R., Deng X., Guan S., Wei J., Feng H., Wang D., *Anti-inflammatory effects of linalol in RAW 264.7 macrophages and lipopolysaccharide-induced lung injury model*, J. Surg. Res., 180, 2013, s. 47-54.
20. Ma J., Xu H., Wu J., Qu C., Sun F., Xu S., *Linalol inhibits cigarette smoke-induced lung inflammation by inhibiting NF- κ B activation*, Int. Immunopharmacol., 29, 2015, s. 708-713.
21. Li Y., Lv O., Zhou F., Li Q., Wu Z., Zheng Y., *Linalol inhibits LPS-induced inflammation in BV2 microglia cells by activating Nrf2*, Neurochem. Res., 40, 2015, s. 1520-1525.
22. Cheng B.H., Sheen L.Y., Chang S.T., *Hypolipidemic effects of S-(+)-linalol and essential oil from Cinnamomum osmophloeum ct. linalol leaves in mice*, J. Tradit. Complement. Med., 2017.
23. Santini A., Novellino E., *Nutraceuticals in hypercholesterolaemia: an overview*, Br. J. Pharmacol., 174, 2017, s. 1450-1463.
24. Souza C.M.C., Pereira S.A., Moraes da Silva T., Damasceno J.L., Amorim Mendes S., Dias H.J., Stefani R., Tavares D.C., Martins C.H.G., Crotti A.E.M., *Antifungal activity of plant-derived essential oils on Candida tropicalis planktonic and biofilms cells*, Med. Mycol., 54, 2016, s. 515-523.
25. Herman A., Tambor K., Herman A., *Linalol affects the antimicrobial efficacy of essential oils*, Curr. Microbiol., 72, 2016, s. 165-172.
26. Park S.N., Lim Y.K., Freire M.O., Cho E., Jin D., Kook J.K., *Antimicrobial effect of linalol and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria*, Anaerobe, 18, 2012, s. 369-372.
27. Duarte A., Luis Â., Oleastro M., Domingues F.C., *Antioxidant properties of coriander essential oil and Linalol and their potential to control Campylobacter spp*, Food Control, 61, 2016, s. 115-122.
28. Hsu C.C., Lai W.L., Chuang K.C., Lee M.H., Tsai Y.C., *The inhibitory activity of linalol against the filamentous growth and biofilm formation in Candida albicans*, Med. Mycol., 51, 2013, s. 473-482.
29. Souza C.M.C., Pereira Jr. S.A., Moraes da Silva T., Damasceno J.L., Amorim Mendes S., Dias H.J., Stefani R., Tavares D.C., Martins C.H.G., Crotti A.E.M., *Antifungal activity of plant-derived essential oils on Candida tropicalis planktonic and biofilms cells*, Med. Mycol., 54, 2016, s. 515-523.
30. Dos E.R.Q., Maia C.S.F., Fontes Jr. E.A., Melo A.S., Pinheiro B.G., Maia J.G.S., *Linalol-rich essential oils from the Amazon display antidepressant-type effect in rodents*, J. Ethnopharmacol., 212, 2018, s. 43-49.
31. Guzman-Gutierrez S.L., Gomez-Cansino R., Garcia Zebadua J.C., Jimenez-Perez N.C., Reyes-Chilpa R., *Antidepressant activity of Litsea glaucescens essential oil: identification of beta-pinene and linalol as active principles*, J. Ethnopharmacol., 143, 2012, s. 673-679.
32. Guzman-Gutierrez S.L., Bonilla-Jaime H., Gomez-Cansino R., Reyes-Chilpa R., *Linalol and β -pinene exert their antidepressant-like activity through the monoaminergic pathway*, Life Sci., 128, 2015, s. 24-29.

33. Cheng B.H., Sheen L.Y., Chang S.T., *Evaluation of anxiolytic potency of essential oil and S-(+)-linalol from Cinnamomum osmophloeum ct. linalol leaves in mice*, J. Tradit. Complement. Med., 5, 2015, s. 27-34.
34. Perry N., Perry E., *Aromatherapy in the management of psychiatric disorders. Clinical and neuropharmacological perspectives*, CNS Drugs, 20, 2006, s. 257-280.
35. Linck V.M., Silva A.L., Figueiró M., Piato A.L., Herrmann A.P., Birck F.D., Caramão E.B., Nunes D.S., Moreno P.R.H., Elisabetsky E., *Inhaled linalol-induced sedation in mice*, Phytomedicine, 16, 2009, s. 303-307.
36. Linck V.M., Silva A.L., Figueiró M., Caramão E.B., Moreno P.R.H., Elisabetsky E., *Effects of inhaled linalol in anxiety, social interaction and aggressive behavior in mice*, Phytomedicine, 17, 2010, s. 679-683.
37. Umezu T., *Anticonflict effects of lavender oil and identification of its active constituents*, Pharmacology Biochemistry and Behavior, 85, 2006, s. 713-721.
38. Weston-Green K., Clunas H., Jimenez Naranjo C., *A review of the potential use of pinene and linalol as terpene-based medicines for brain health. Discovering novel therapeutics in the flavours and fragrances of cannabis*, Frontiers in Psychiatry, 2021, s. 1309.
39. Fernandes J., *Antitumor monoterpenes*, Bioactive Essential Oils and Cancer, 2015, s. 175-200.
40. Maeda H., Yamazaki M., Katagata Y., *Kuromoji (Lindera umbellata) essential oil induced apoptosis and differentiation in human leukemia HL-60 cells*, Experimental and Therapeutic Medicine, 3, 2012, s. 49-52.
41. Sobral M.V., Xavier A.L., Lima T.C., Sousa D.P., *Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils*, The Scientific World Journal, 2014, s. 1-35.
42. Sun X.B., Wang S.M., Li T., Yang Y.Q., *Anticancer activity of linalol terpenoid: apoptosis induction and cell cycle arrest in prostate cancer cells*, Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 14, 2015, s. 619-625.
43. Chang M.Y., Shieh D.E., Chen C.C., Yeh C.S., Dong H.P., *Linalol induces cell cycle arrest and apoptosis in leukemia cells and cervical cancer cells through CDKIs*, International Journal of Molecular Sciences, 16, 2015, s. 28169-28179.
44. Zhao Y., Chen R., Wang Y., Qing C., Wang W., Yang Y., *In vitro and in vivo efficacy studies of lavender angustifolia essential oil and its active constituents on the proliferation of human prostate cancer*, Integrative Cancer Therapies, 2016.
45. Cerchiara T., Straface S.V., Brunelli E., Tripepi S., Gallucci M.C., Chidichimo G., *antiproliferative effect of linalol on RPMI 7932 human melanoma cell line. Ultrastructural studies*, Natural Product Communications, 10, 2015, s. 547-549.
46. Api M., Belsito D., Bhatia S., Bruze M., Calow P., Dagli M.L., Dekant W., Fryer A.D., Kromidas L., La Cava S., *RIFM fragrance ingredient safety assessment, linalol*, Food and Chemical Toxicology, 82, 2015, s. 29-38.
47. Cheng Y., Dai C., Zhang J., *SIRT3-SOD2-ROS pathway is involved in linalol-induced glioma cell apoptotic death*, Acta Biochimica Polonica, 64, 2017, s. 343-350.
48. Jana S., Patra K., Sarkar S., Jana J., Mukherjee G., Bhattacharjee S., Mandal D.P., *Antitumorogenic potential of linalol is accompanied by modulation of oxidative stress. An In vivo study in sarcoma-180 solid tumor model*, Nutrition and Cancer, 66, 2014, s. 835-848.
49. Chang M.Y., Shen Y.L., *Linalol exhibits cytotoxic effects by activating antitumor immunity*, Molecules, 19, 2014, s. 6694-6706.
50. Mitić-Ćulafić D., Žegura B., Nikolić B., Vuković-Gaćić B., Knežević-Vukčević J., Filipič M., *Protective effect of linalol, myrcene and eucalyptol against t-butyl hydroperoxide induced genotoxicity in bacteria and cultured human cells*, Food and Chemical Toxicology, 47, 2009, s. 260-266.
51. Richa R.P., Sinha D.P., *Physiological aspects of UV-excitation of DNA*, Topics in Current Chemistry, 356, 2015, s. 203-248.

52. Gunaseelan S., Balupillai A., Govindasamy K., Muthusamy G., Ramasamy K., Shanmugam M., Prasad N.R., *The preventive effect of linalol on acute and chronic UVB mediated skin carcinogenesis in swiss albino mice*, Photochemical & Photobiological Sciences, 15, 2016, s. 851-860.
53. Jaw-Ming Ch., *Chemopreventive effects of minor dietary constituents in common foods on human cancer cells*, Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 71, 2007, s. 1500-1504.
54. Perry N.S.L., Houghton P.J., Theobald A., Jenner P., Perry E.K., *In vitro inhibition of human erythrocyte acetylcholinesterase by Salvia lavandulaefolia essential oil and constituent terpenes*, Journal of Pharmacy and Pharmacology, 52, 2000, s. 895-902.
55. Medeiros Venancio A., Ferreira da Silva F.W., Alves da Silva K.S., de Carvalho Pimentel H., Macêdo Lima M., Fraga de Santana M., Barreto Alves P., Batista da Silva G., Leal-Cardoso J.H., Marchioro M., *Essential oil of Ocimum basilicum L. and (-)-linalol blocks the excitability of rat sciatic nerve*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2016.
56. Kaka G., Yaghoobi K., Davoodi S., Hosseini S.R., Sadraie S.H., Mansouri K., *Assessment of the neuroprotective effects of Lavandula angustifolia extract on the contusive model of spinal cord injury in Wistar rats*, Frontiers in Neuroscience, 2016, s. 10.
57. Park H., Seol G.H., Ryu S., Choi I.Y., *Neuroprotective effects of (-)-linalol against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury*, Archives of Pharmacal Research, 39, 2016, s. 555-564.
58. Poyton C., Manchadi M.L., Cheesman M., Lavidis N., *Effects of lavender and linalol on neurotransmission and contraction of smooth muscle*, Pharmacognosy Communications, 5, 2015, s. 217.

Właściwości lecznicze linalolu

Sreszczenie

Właściwości lecznicze olejków eterycznych pozyskiwanych z roślin aromatycznych znane są od starożytności. Główne składniki tych olejków należą do grupy terpenów i odpowiadają za szeroki zakres właściwości bioaktywnych olejków. Linalol (C₁₀H₁₈O), czyli 3,7-dimetylo-1,6-oktadien-3-ol, jest alkoholem monoterpenowym występującym jako główny składnik roślinnych olejków eterycznych, szczególnie olejku lawendowego i kolendrowego. Linalol jest nietoksyczny, co niewątpliwie sprzyja jego zastosowaniu w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym. Niniejszy przegląd skupia się na działaniu przeciwzapalnym, przeciwnowotworowym, przeciwhiperlipidemicznym, przeciwdrobnoustrojowym, antynocycyptywnym, przeciwbólowym, przeciwłękowym, przeciwdepresyjnym i neuroprotekcijnym linalolu.

Słowa kluczowe: linalol, olejek lawendowy, monoterpeny, działanie przeciwzapalne, działanie przeciwdepresyjne

Medicinal properties of linalol

Abstract

The healing properties of essential oils from aromatic plants have been known since antiquity. The main components of these oils belong to the group of terpenes and are responsible for a wide range of bioactive properties. Linalol (C₁₀H₁₈O), chemical name 3,7-dimethyl-1,6-octadiene-3-ol, is a monoterpene alcohol found as the main component of plant essential oils, especially lavender and coriander oils. Linalol is non-toxic, which undoubtedly favors its use in the pharmaceutical and cosmetic industries. This review focuses on the anti-inflammatory, antineoplastic, antihyperlipidemic, antimicrobial, antinoceptive, analgesic, anxiolytic, antidepressant and neuroprotective effects of linalol.

Keywords: linalol, lavender oil, monoterpenes, anti-inflammatory effect, antidepressant effect

Przeciwbakteryjna aktywność kompleksów jonów Co(II), Mn(II) oraz Zn(II) z kwasem niiflumowym i 1,10-fenantroliną

1. Wprowadzenie

Bakterie są najbardziej rozpowszechnionymi organizmami na świecie, gdyż cechuje je niespotykana u żadnego innego organizmu żywego zdolność adaptacji do otaczających warunków środowiska. Ponadto posiadają zdolność zasiedlania powierzchni skóry, błon śluzowych czy przewodu pokarmowego (ludzi i zwierząt), gdzie mogą pełnić rolę nieszkodliwej mikroflory, a nawet przyczyniać się do prawidłowego funkcjonowania organizmu gospodarza. Składają się na to m.in. udział bakterii w dostarczaniu odpowiednich witamin czy wywoływanie odporności na kolonizację przez drobnoustroje chorobotwórcze u żywiciela. Jednakże bakterie są również przyczyną wielu chorób, w tym sepsy, zapalenia wsierdza, kości czy infekcji dróg moczowo-płciowych [1-4].

Intensywne i nierzadko nieprawidłowe stosowanie leków przeciwdrobnoustrojowych wywarło ewolucyjną presję selekcyjną na drobnoustroje w kierunku wytwarzania mechanizmów oporności o podłożu genetycznym. Dlatego też pojedyncze leki, takie jak antybiotyki aminoglikozydowe, antybiotyki β -laktamowe czy wykazujące właściwości antibakteryjne niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ, ang. NSAIDs – *non-steroidal antiinflammatory drugs*) mogą nie być wystarczająco skuteczne [5]. Z tego powodu niezbędne są poszukiwania nowych związków aktywnych [1, 2], gdyż bakterie wielolekooporne można ponownie uwrażliwić przez połączenie antybiotyków z zatwierdzonymi związkami z innych grup [6]. Uważa się, że NLPZ zmniejszają stan zapalny, gorączkę i ból, ale również wykazują synergistyczny wpływ na aktywność przeciwbakteryjną antybiotyków [7]. Dostępne są ograniczone doniesienia dotyczące mechanizmu działania połączonych efektów antybiotyków z NLPZ [6, 8]. NLPZ zmniejszają głównie wytwarzanie mediatorów prozapalnych, które mogą mieć działanie terapeutyczne przeciwko infekcjom bakteryjnym. Problem oporności na antybiotyki przeciwko patogenom można rozwiązać, łącząc antybiotyki z NLPZ, nasilając ich działanie przeciwbakteryjne [8, 9].

Kwas niiflumowy (kwas 2-[3-(trifluorometylo)anilino]nikotynowy, $m_w = 282,22$ g/mol) jest pochodną kwasu mefenamowego [10]. Zaliczany jest do fluoroorganicznych związków zawierających pierścień benzenowy, w których jeden lub kilka atomów wodoru zostało podstawionych grupami trifluorometylowymi (rys. 1A). Obecność tych grup

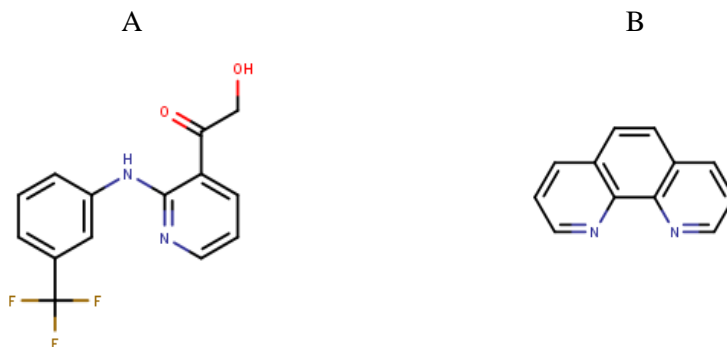
¹ ewa.ciszkowicz@prz.edu.pl, Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska, <http://cb.prz.edu.pl/>.

² d520@stud.prz.edu.pl, Szkoła Doktorska Nauk Inżyneryjno-Technicznych, Politechnika Rzeszowska, <https://szkoladoktorska.prz.edu.pl/informacje-ogolne>.

³ Katedra Biotechnologii i Bioinformatyki, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska, <http://cb.prz.edu.pl/>.

⁴ lzapala@prz.edu.pl, Katedra Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Rzeszowska, <http://zchnia.prz.edu.pl/>.

prawdopodobnie wpływa na poprawę właściwości fizycznych, chemicznych oraz biologicznych w porównaniu do związku pozbawionego ugrupowania trifluorometylowego. Dlatego też, podobnie jak inne związki zawierające grupę trifluorometylową (-CF₃), kwas niflumowy znajduje zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym [11]. Należy on do grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych, a stosowany jest jako środek przeciwbólowy oraz przeciwzapalny np. w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów. W połączeniu z innymi lekami może powodować w organizmie reakcje niepożądane takie jak np. krwotoki czy osłabianie leczniczego działania danego leku [12-14].



Rysunek 1. Wzór strukturalny kwasu niflumowego (A) oraz 1,10-fenantroliny (B) [opracowanie własne, program MarvinSketch 21.17.0, ChemAxon [15]]

1,10-Fenantrolina ($m_w = 180,20$ g/mol) jest pochodną fenantrenu (rys. 1B), wielopierścieniowym węglowodorem aromatycznym występującym w sterolach, hormonach płciowych, kwasach żółciowych, glikozydach nasercowych czy też w alkaloidach morfiny [16,17]. Ze względu na swoją budowę i właściwości chemiczne (w tym zdolność chelatowania metali, np. cynku(II), kobaltu(II), miedzi(II), żelaza(III)) 1,10-fenantrolina i jej pochodne przedstawiają wiele możliwości zastosowania. Związki te mogą być stosowane m.in. w chemii organicznej, nieorganicznej i analitycznej, do produkcji herbicydów, jako katalizatory reakcji chemicznych lub jako główne składniki czujników luminescencyjnych służących do wykrywania jonów metali. Ponadto – ze względu na zdolność oddziaływania z cząsteczką DNA – mogą być wykorzystywane jako środki terapeutyczne [18]. Zarówno 1,10-fenantrolina, jak i jej kompleksy z metalami przejściowymi wykazują aktywność w układach biologicznych, która obejmuje hamowanie wzrostu niektórych bakterii chorobotwórczych (np. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Mycoplasma* spp.), grzybów (*Candida albicans*) czy wirusów. Należy jednak zwrócić uwagę na to, z jakimi innymi lekami stosuje się 1,10-fenantrolinę, ponieważ niektóre połączenia mogą powodować reakcje niepożądane, a działanie obu związków może się wzajemnie niwelować [16, 17].

Wcześniejsze badania wykazały, że liczne kompleksy metali z NLPZ wykazują lepsze właściwości biologiczne w porównaniu z samym lekiem [18-20]. Dodatkowo wykazują niższą toksyczność niż nieorganiczne formy metali [21] oraz zmniejszają toksyczność żołądkowo-jelitową i działania niepożądane [22]. Zwiększona aktywność kompleksów jonów metali z NLPZ w porównaniu z wolnymi ligandami wynika z faktu, że jony metali działają jako miejsca wiązania biocząsteczek z lekami oraz jako centra redoks lub katalityczne i ułatwiają wiązanie poprzez wywoływanie zmian strukturalnych

biocząsteczek [23]. Wspomniane fakty przyczyniły się do tego, że kompleksy zawierające kwas fenamowy i jego pochodne są ostatnio szeroko badane pod kątem ich działania biologicznego (przeciwdrobnoustrojowego [18], przeciwzapalnego [18, 23, 24], przeciwnowotworowego [25, 26] i przeciwutleniającego [27, 28]). Ponadto badane są również ich interakcje z biocząsteczkami takimi jak DNA i albuminy – w celu określenia ich sposobu wiązania i możliwego znaczenia biologicznego [28-31].

Podstawą do opracowania związków na bazie jonów Co(II), Mn(II), Zn(II), kwasu niflumowego oraz 1,10-fenantroliny było połączenie właściwości każdej ze wspomnianych składowych. W niniejszej pracy dokonano oceny właściwości antybakteryjnych kompleksów jonów Co(II), Mn(II) oraz Zn(II) z kwasem niflumowym oraz z kwasem niflumowym i 1,10-fenantroliną wobec Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych bakterii. Dodatkowo poddano analizie wzajemne oddziaływania gentamycyny, półsyntetycznego antybiotyku aminoglikozydowego oraz kompleksów jonów Zn(II) z kwasem niflumowym oraz z kwasem niflumowym i 1,10-fenantroliną wobec certyfikowanego szczepu *Staphylococcus aureus*.

2. Materiał i metody

Ocenie poddano aktywność przeciwbakteryjną trzech kompleksów kwasu niflumowego z jonami metali przejściowych (Me-Nif, gdzie Me oznacza jony: Co(II), Mn(II) i Zn(II)) oraz trzech heteroligandowych kompleksów tego kwasu z ww. jonami metali, z 1,10-fenantroliną (Phen) pełniącą rolę koliganda (Me-Nif-Phen). Badane związki były udostępnione przez pracowników Katedry Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Rzeszowskiej. Aktywność antybakteryjna była badana wobec bakterii Gram-ujemnych (*Escherichia coli* ATCC 10536 oraz *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 21458), a także Gram-dodatnich (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 oraz *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984). W celu wyznaczenia wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii (ang. *Minimum Inhibitory Concentration*, MIC) wykorzystano metodę mikrorozcieńczeń na płytkach 96-dołkowych – na podstawie metodologii CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute). Minimalne stężenie bakteriobójcze (ang. *Minimum Bactericidal Concentration*, MBC) określono wysiewając bakterie po inkubacji z określonymi stężeniami związków na płytce Petriego z podłożem agarowym. Wzajemne oddziaływania pomiędzy Zn(II)-Nif-Phen a antybiotykiem gentamycyną poddano analizie, stosując metodę szachownicy (ang. *checkerboard*).

2.1. Minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii oraz minimalne stężenia bakteriobójcze

Prace Bocian i in. (2018) [32] oraz Zapala i in. (2021) [13] przedstawiają szczegółowy opis zastosowanej metodyki. W skrócie: roboczą hodowlę bakteryjną o gęstości 10^5 kom./ml przygotowano w pożywce Mueller Hinton Broth (MHB). W każdym dniu badania przygotowano seryjne 2-krotne rozcieńczenia związków w pożywce MHB na płytkach 96-dołkowych. Następnie dodawano bakterie z hodowli roboczej, ponownie rozcieńczając 2-krotnie związki na płytkach. Płytki inkubowano w 37°C w otaczającym powietrzu przez 18-24 godziny, po czym odczytano wyniki, analizując stopień zmętnienia hodowli w dołkach zawierających określone stężenie badanego związku. W przypadku wątpliwości – porównywano z uzyskanymi wynikami z pomiaru spektrofotometrycznego przy długości fali 600 nm. Najniższe stężenie związku, które całkowicie hamowało wzrost hodowli bakteryjnej określano jako MIC.

W kolejnym kroku z każdego dołka, dla którego wyznaczono MIC, a także dwóch dołków zawierających stężenie $2 \times \text{MIC}$ oraz $4 \times \text{MIC}$, pobrano po 100 μl hodowli bakteryjnej i wysiano na szalki Petriego z zestaloną pożywką (Mueller Hinton Agar, MHA). Tak przygotowane szalki inkubowano przez 18-24 godziny w 37°C , a następnie obserwowano na pożywce MHA występowanie lub brak kolonii bakteryjnych. Związki, dla których zaobserwowano brak wzrostu kolonii, określono jako bakteriobójcze w badanym zakresie stężeń (MIC, $2 \times \text{MIC}$, $4 \times \text{MIC}$). Związki, dla których w każdym przypadku zaobserwowano wzrost kolonii bakteryjnych, określono jako bakteriostatyczne w badanym zakresie stężeń (MIC, $2 \times \text{MIC}$, $4 \times \text{MIC}$). W pozostałych przypadkach wyznaczono wartość MBC.

2.2. Analiza wzajemnych oddziaływań gentamycyny oraz kompleksu jonów Zn(II) z kwasem niiflumowym i 1,10-fenantroliną

Metoda szachownicy (ang. *checkerboard*) lub wyznaczania frakcyjnego stężenia hamującego (ang. *Fractional Inhibitory Concentration*, FIC) wykorzystywała metodykę podobną do tej, która stosowana była w celu określania MIC metodą seryjnych mikro-rozcieńczeń [33]. Stężenia badanych związków ustalono tak, by otrzymać serię dwukrotnych rozcieńczeń, począwszy od stężenia $2 \times \text{MIC}$, $4 \times \text{MIC}$ każdego ze stosowanych związków. Rozcieńczenia jednego z badanych środków w kombinacji przeprowadza się wzdłuż osi odciętych, zaś drugiego z nich wzdłuż osi rzędnych. Inkubację przeprowadza się standardowo przez 18-24 godziny w temperaturze 37°C . Interakcję badanych związków przeciwdrobnoustrojowych w kombinacji wyraża się ilościowo jako ułamkowy wskaźnik stężenia hamującego wzrost bakterii (ang. *fractional inhibitory concentration index*, FICI) i oblicza dla każdego związku według poniższego równania:

$$FICI = FICA + FICB \quad (1)$$

gdzie:

$$FICA = \frac{\text{MIC związku A w kombinacji ze związkiem B}}{\text{MIC związku A}} \quad (2)$$

$$FICB = \frac{\text{MIC związku B w kombinacji ze związkiem A}}{\text{MIC związku B}} \quad (3)$$

Uzyskane wyniki FICI można uznać za synergistyczne, gdy wartość wskaźnika przyjmuje wartości $\leq 0,5$, addytywne – gdy $0,5 < FICI \leq 1$, obojętne – gdy otrzymane wartości mieszczą się w przedziale 1–2 lub antagonistyczne – gdy $FICI \geq 2$ [32].

Inny sposób określania charakteru oddziaływań na podstawie indeksów FICI opiera się na wyodrębnieniu jedynie trzech rodzajów interakcji: a) synergizm ($FICI \leq 0,5$); b) brak oddziaływań ($FICI > 0,5$ i $\leq 4,0$); oraz c) antagonizm ($FICI > 4,0$) [34].

3. Wyniki

Ocenie poddano aktywność przeciwbakteryjną *in vitro* kompleksów jonów Co(II), Mn(II), Zn(II) z kwasem niiflumowym oraz kwasem niiflumowym i 1,10-fenantroliną bakterii Gram-dodatnich oraz Gram-ujemnych poprzez określenie wartości MIC i MBC oraz porównanie uzyskanych wyników aktywności z referencyjnymi środkami przeciwdrobnoustrojowymi stosowanymi jako produkty lecznicze (gentamycyna, chloramfenikol, kanamycyna i tetracyklina).

3.1. Minimalne stężenie hamujące wzrost bakterii oraz minimalne stężenia bakteriobójcze

Wszystkie analizowane związki wykazywały silniejsze działanie hamujące wzrost wszystkich wykorzystanych bakterii w porównaniu z ligandem – kwasem niflumowym. Jedynie wobec szczepów *S. epidermidis* kompleksy heteroligandowe z 1,10-fenantoliną wykazywały zwiększoną aktywność antybakteryjną w porównaniu do samego koliganda. Dodatkowo zaobserwować można było zależność, iż oba szczepy *S. epidermidis* charakteryzowały się największą wrażliwością wobec wszystkich badanych kompleksów (tab. 1).

Tabela 1. Wartości MIC oraz MBC kompleksów jonów Co(II), Mn(II), Zn(II) z kwasem niflumowym oraz z kwasem niflumowym i 1,10-fenantroliną wyznaczone w badanym zakresie stężeń: dla Co(II)-Nif-Phen od 0,001 do 6,25 mM, dla pozostałych kompleksów: od 0,001 do 12,5 mM)

Badane związki	<i>E. coli</i> ATCC 10536	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 21458	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	<i>S. epidermidis</i> ATCC 35984
	MIC / MBC [mM]				
Co(II)-Nif	0,781 ^a / nb	0,781 / nb	0,098 / 0,781	0,024 / – *	0,195 / 1,563
Co(II)-Nif-Phen	0,391 / – *	3,125 / 6,250	0,195 / 3,125	0,006 / – *	0,098 / 0,781
Mn(II)-Nif	6,250 ^a / nb	3,125 / nb	0,049 / 0,049	0,012 / – *	0,024 / 0,024
Mn(II)-Nif-Phen	0,024 / 0,195	0,195 / 1,563	0,195 / 3,125	0,012 / – *	0,049 / 0,195
Zn(II)-Nif	3,125 ^a / nb	3,125 / nb	0,098 / 0,781	0,049 / 0,195	0,098 / 1,563
Zn(II)-Nif-Phen	0,049 / – *	1,563 / 1,563	0,195 / – *	0,024 / 0,391	0,195 / 3,125
HNif	12,500 / nd	3,125 / nd	0,781 / 0,781	0,781 / 3,125	12,500 / – *
Phen	0,049 / 0,049	0,781 / – *	0,781 / 0,781	0,049 / – *	0,195 / – *
Chloramfenikol	0,012	0,774	0,024	0,012	0,774
Gentamycyna	0,004	0,387	0,002	0,004	3,978
Kanamycyna	0,008	– *	0,008	0,016	0,008

nd – brak właściwości bakteriobójczych w badanym zakresie stężeń

nb – nie badano

* – brak właściwości antybakteryjnych w badanym zakresie stężeń

Źródło: opracowanie własne.

Uzyskane wyniki potwierdzają doniesienia o istotnym wpływie jonów metali na aktywność kompleksów kwasu niflumowego. Największy wzrost aktywności przeciwbakteryjnej w porównaniu z samym ligandem zaobserwowano dla kompleksu Mn(II)-Nif wobec *P. aeruginosa* ATCC 21458 oraz wobec *S. epidermidis* ATCC 12228, odpowiednio 520- oraz 65-krotne zmniejszenie wartości MIC. Przyłączenie koliganda

do ww. kompleksu nieznacznie pogorszyło działanie przeciwbakteryjne kompleksu Mn(II)-Nif-Phen wobec *S. epidermidis*. Interesującym jest, że obecność koliganda we wszystkich kompleksach powodowała zwiększenie obserwowanej wartości MIC wobec *S. aureus*, natomiast wobec *E. coli* wartość MIC ulegała znacznemu zmniejszeniu. Wobec *S. epidermidis* ATCC 12228 związki zawierające jony Mn(II) posiadają wartość minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii porównywalną z chloramfenikolem oraz kanamycyną. Kompleks Co(II)-Nif wykazuje aktywność antybakteryjną wyższą lub porównywalną z antybiotykami.

3.2. Analiza wzajemnych oddziaływań gentamycyny oraz kompleksu jonów Zn(II) z kwasem niiflumowym i 1,10-fenantroliną

Analizę wzajemnego oddziaływania z gentamycyną (Gen) przeprowadzono dla samego liganda, samego koliganda oraz kompleksu jonów Zn(II) z kwasem niiflumowym i 1,10-fenantroliną, wykorzystując metodę szachownicy wobec *S. aureus* ATCC 6538 oraz *E. coli* ATCC 10536 (tab. 2).

Tabela 2. Wartości FICI dla badanych związków zastosowanych w kombinacji z gentamycyną oraz odpowiadający im rodzaj oddziaływania

Kombinacja związków	<i>E. coli</i> ATCC 10536			<i>S. aureus</i> ATCC 6538		
	MIC w działaniu osobnym	MIC w kombinacji	FIC I	MIC w działaniu osobnym	MIC w kombinacji	FIC I
Zn(II)-Nif-Phen / Gen	0,049 / 0,004	0,049 / >0,016	>2	0,195 / 0,002	0,049 / 0,0005	0,5
Zn(II)Nif / Gen	3,125 / 0,004	6,25 / 0,004		0,098 / 0,002	0,195 / 0,0002	>2
HNif / Gen	12,5 / 0,004	12,5 / >0,016		0,781 / 0,002	0,391 / 0,0005	0,75
Phen / Gen	0,049 / 0,004	0,195 / >0,016		0,781 / 0,002	0,049 / 0,002	1,06

Źródło: opracowanie własne.

Ligand, koligand oraz kompleksy Zn(II)-Nif i Zn(II)-Nif-Phen wykazały antagonistyczny charakter oddziaływania w połączeniu z gentamycyną wobec *E. coli*. Wobec Gram-dodatniej bakterii *S. aureus* interakcje kompleksu Zn(II)-Nif-Phen z gentamycyną określono jako synergizm, czyli zaobserwowano wzmocnienie działania antybakteryjnego przy niższym stężeniu obu związków w porównaniu do uzyskanych wartości MIC dla związków działających osobno. Kompleks Zn(II)-Nif wykazał natomiast w kombinacji z gentamycyną antagonistyczny charakter oddziaływania. Połączenie kwasu niiflumowego i gentamycyny wykazywało charakter obojętny lub addytywny, w zależności od wykorzystanej metody podziału indeksów FICI. Natomiast wzajemne oddziaływania 1,10-fenantroliny i gentamycyny określono jako obojętne.

4. Wnioski

W niniejszej pracy podjęto się oceny właściwości antybakteryjnych kompleksów jonów Co(II), Mn(II) oraz Zn(II) z kwasem niiflumowym, a także kwasem niiflumowym oraz 1,10-fenantroliną jako koligandem. Dodatkowym celem była ocena wzajemnego

oddziaływania gentamycyny z heteroligandowym kompleksem z jonami Zn(II) wobec Gram-dodatniej bakterii *Staphylococcus aureus* i Gram-ujemnej *Escherichia coli*.

Do chwili obecnej w literaturze światowej nie ma doniesień o syntezie kompleksów heteroligandowych (Me-Nif-Phen) z wymienionymi metalami, a opisane kompleksy z kwasem niflumowym nie zostały szczegółowo przebadane pod kątem ich właściwości antibakteryjnych. Stąd też badania prowadzone w obrębie niniejszej pracy są innowacyjne w skali światowej.

Niesteroidowe leki przeciwzapalne są często najważniejszą składową maścią i kremów wykorzystywanych w leczeniu stanów zapalnych skóry. Stąd opracowanie kompleksów zawierających dodatkowo jony metali, a u części także 1,10-fenantrolinę, o wzmocnionej aktywności przeciwbakteryjnej stanowiłoby odpowiedź na zapotrzebowanie farmakologiczne w tej dziedzinie. Dodatkową zaletą otrzymanych związków może być również ich forma amorficzna, co sprawia, że leki są bardziej biodostępne [13]. Dobór szczepów bakteryjnych był podyktowany potencjalnym zastosowaniem badanych kompleksów w leczeniu stanów zapalnych skóry i odpowiedzią na zapotrzebowanie farmakologiczne w tej dziedzinie. Bakterie *S. epidermidis* mogą wywoływać stany zapalne skóry, natomiast *S. aureus* i *P. aeruginosa* utrudniają gojenie się ran, np. oparzeniowych [35, 36].

Najwyższą skuteczność syntetyzowane kompleksy wykazały wobec Gram-dodatniej *S. epidermidis* ATCC 12228, która nie tworzy biofilmu bakteryjnego. Jest to najprawdopodobniej przyczyną zwiększonej wrażliwości tego szczepu na badane kompleksy, ponieważ biofilm chroni bakterie przed reakcją układu odpornościowego gospodarza, dzięki czemu są bardziej odporne na czynniki przeciwbakteryjne niż ich odpowiedniki planktonowe [37]. Utworzenie kompleksów kwasu niflumowego z jonami metali przejściowych wpłynęło na zwiększenie aktywności antibakteryjnej w porównaniu do samego liganda.

Analiza wspólnego oddziaływania gentamycyny oraz kompleksów z Zn(II) miała na celu znalezienie odpowiedzi, czy tak korzystne działanie antibakteryjne związku może być wzmocnione poprzez interakcje z antybiotykiem. Uzyskane wyniki są zgodne z doniesieniami określającymi rodzaj interakcji NLPZ (diklofenak, ketorolak) z gentamycyną, wskazując na brak istotnych oddziaływań [7]. Kompleks kwasu niflumowego z jonami Zn(II) oraz 1,10-fenantroliną charakteryzuje się wzmoczoną aktywnością w połączeniu z gentamycyną, co może stanowić podstawę do badań nad zastosowaniem tego połączenia w praktyce klinicznej.

Uzyskane wyniki wskazują, iż charakter oddziaływania jest silnie związany z rodzajem bakterii. Wobec *E. coli*, będącej bakterią Gram-ujemną, zostało zaobserwowane antagonistyczne działanie gentamycyny z badanymi związkami, co spowodowało zniesienie aktywności antibakteryjnej, którą posiadają owe związki stosowane w pojedynkę. Oznacza to, że dane 2 substancje składające się na określoną kombinację wzajemnie niwelują swoje działanie antibakteryjne, w związku z czym kombinacja ta nie posiada zastosowania w zwalczaniu drobnoustrojów.

Leczenie infekcji bakteryjnych przez skojarzenie NLPZ z antybiotykami może stanowić skuteczny sposób przezwyciężenia lekooporności wśród bakterii. Należy jednak odpowiednio dobrać związki i ich stężenia, by zapewnić optymalne działanie antibakteryjne potencjalnych leków.

Źródło finansowania:

Narodowe Centrum Nauki, nr grantu: 2021/05/X/NZ6/00002.

Literatura

1. McKinnon P.S., Davis S.L., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of bacterial infectious diseases*, European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 23, 2004, s. 271-288.
2. Gnanamani A., Hariharan P., Paul-Satyaseela M., *Staphylococcus aureus. Overview of bacteriology, clinical diseases, epidemiology, antibiotic resistance and therapeutic approach*, [w:] Enany S., Alexander L.E.C. (red.), *Frontiers in Staphylococcus aureus*, IntechOpen, Rijeka 2017.
3. Percival S.L., Williams D.W., *Escherichia coli*, [w:] *Microbiology of waterborne diseases*, Elsevier, 2014, s. 89-117.
4. Khan Z.A., Siddiqui M.F., Park S., *Current and emerging methods of antibiotic susceptibility testing*, Diagnostics, 9, 2019, s. 1-17.
5. Neves P.R., McCulloch J.A., Mamizuka E.M., Lincopan N., *Pseudomonas aeruginosa*, [w:] *Encyclopedia of food microbiology*, Elsevier, 2014, s. 1867-1871.
6. Chan E.W.L., Yee Z.Y., Raja I., Yap J.K.Y., *Synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) on antibacterial activity of cefuroxime and chloramphenicol against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*, Journal of Global Antimicrobial Resistance, 10, 2017, s. 70-74.
7. Altaf M., Ijaz M., Ghaffar A., Rehman A., Avais M., *Antibiotic susceptibility profile and synergistic effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on antibacterial activity of resistant antibiotics (oxytetracycline and gentamicin) against methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*, Microbial Pathogenesis, 137, 2019, s. 103755.
8. Yin Z., Wang Y., Whittell L.R., Jergic S., Liu M., Harry E., Dixon N.E., Kelso M.J., Beck J.L., Oakley A.J., *DNA replication is the target for the antibacterial effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs*, Chem. Biol., 21, 2014, s. 481-487.
9. Worthington R.J., Melander C., *Combination approaches to combat multidrug-resistant bacteria*, Trends in Biotechnology, 31, 2013, s. 177-184.
10. www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Niflumic-acid [data dostępu: 19.05.2022].
11. Bonacorso H.G., Andrighetto R., Frizzo C.P., Zanatta N., Martins M.A.P., *Recent advances in the chemistry of 1,10-phenanthrolines and their metal complex derivatives. Synthesis and promising applications in medicine*, Technology and Catalysis, Societa Chimica Italiana, 2016, s. 1-27.
12. Tarushi A., Raptopoulou C.P., Psycharis V., Kessissoglou D.P., Papadopoulos A.N., Psomas G., *Interaction of zinc(II) with the non-steroidal anti-inflammatory drug niflumic acid*, Journal of Inorganic Biochemistry, 176, 2017, s. 100-112.
13. Zapala L., Kosińska-Pezda M., Byczyński Ł., Zapala W., Maciołek U., Woźnicka E., Ciszkowicz E., Lecka-Szlachta K., *Green synthesis of niflumic acid complexes with some transition metal ions (Mn(II), Fe(III), Co(II), Ni(II) and Zn(II)). Spectroscopic, thermoanalytical and antibacterial studies*, Thermochemica Acta, 696, 2021, s. 178814.
14. Tsiliki P., Perdih F., Turel I., Psomas G., *Structure, DNA and albumin-binding of the manganese(II) complex with the non-steroidal antiinflammatory drug niflumic acid*, Polyhedron, 53, 2013, s. 215-222.
15. www.chemaxon.com [data dostępu: 29.06.2022].
16. Zapala L., Kosińska M., Kalemekiewicz J., *Synteza i charakterystyka właściwości kompleksów jonów gadolinu(III) z kwasem niflumowymi 1,10-fenantroliną*, [w:] Szala M., Maciąg K. (red.), *Najnowsze doniesienia z zakresu nauk ścisłych*, Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o., Lublin 2017, s. 7-20.

17. Sammes P.G., Yahioğlu G., *1,10-Phenanthroline. A versatile ligand*, Chemical Society Reviews, 23, 1994, s. 327-334.
18. Kovala-Demertzi D., Hadjipavlou-Litina D., Staninska M., Primikiri A., Kotoglou C., Demertzis M.A., *Anti-oxidant, in vitro, in vivo anti-inflammatory activity and antiproliferative activity of mefenamic acid and its metal complexes with manganese(II), cobalt(II), nickel(II), copper(II) and zinc(II)*, Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 24, 2009, s. 742-752.
19. Dimiza F., Raptopoulou C.P., Psycharis V., Papadopoulos A.N., Psomas G., *Manganese(II) complexes with the non-steroidal anti-inflammatory drugs naproxen and mefenamic acid. Synthesis, structure, antioxidant capacity, interaction with albumins and DNA*, New Journal of Chemistry, 42, 2018, s. 16666-16681.
20. Psomas G., Kessissoglou D.P., *Quinolones and non-steroidal anti-inflammatory drugs interacting with copper(II), nickel(II), cobalt(II) and zinc(II). Structural features, biological evaluation and perspectives*, Dalton Transactions, 42, 2013, s. 6252-6276.
21. Sorenson J.R.J., *Copper complexes offer a physiological approach to treatment of chronic diseases*, Progress in Medicinal Chemistry, 26, 1989, s. 437-568.
22. Ma Z., Moulton B., *Recent advances of discrete coordination complexes and coordination polymers in drug delivery*, Coordination Chemistry Reviews, 255, 2011, s. 1623-1641.
23. White M.M., Aylwin M., *Niflumic and flufenamic acids are potent reversible blockers of Ca²⁺-activated Cl⁻ channels in Xenopus oocytes*, Molecular Pharmacology, 37, 1990, s. 720-724.
24. Kale M.A., Shelke R., Nawale R.B., *Zinc-aceclofenac complex: synthesis, hydrolysis study and antiinflammatory studies*, Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry, 13, 2014, s. 36-44.
25. Vincent C.M., Laugel C., Marty J.P., *In vitro topical delivery of nonsteroidal anti-inflammatory drugs through human skin*, Arzneimittelforschung, 49, 1999, s. 509-513.
26. Banti C.N., Hadjikakou S.K., *Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in metal complexes and their effect at the cellular level*, European Journal of Inorganic Chemistry, 19, 2016, s. 3048-3071.
27. Galanakis D., Kourounakis A.P., Tsiakitzis K.C., Doulgeris C., Rekkas E.A., Gavalas A., Kravaritou C., Charitos C., Kourounakis P.N., *Synthesis and pharmacological evaluation of amide conjugates of NSAIDs with L-cysteine ethyl ester, combining potent antiinflammatory and antioxidant properties with significantly reduced gastrointestinal toxicity*, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 14, 2004, s. 3639-3643.
28. Costa D., Moutinho L., Lima J.L.F.C., Fernandes E., *Antioxidant activity and inhibition of human neutrophil oxidative burst mediated by arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 29, 2006, s. 1659-1670.
29. Tarushi A., Kastanias P., Raptopoulou C.P., Psycharis V., Kessissoglou D.P., Papadopoulos A.N., Psomas G., *Zinc complexes of flufenamic acid. Characterization and biological evaluation*, Journal of Inorganic Biochemistry, 163, 2016, s. 332-345.
30. Palacios-Hernández T., Höpfl H., Sánchez-Salas J.L., González-Vergara E., Pérez-Benítez A., Quiroz-Alfaro M.A., Méndez-Rojas M.A., *In vitro antibacterial activity of meclofenamate metal complexes with Cd(II), Pb(II), Co(II), and Cu(II). Crystal structures of [Cd(C₁₄H₁₀NO₂Cl₂)₂(CH₃OH)]_n and [Cu(C₁₄H₁₀NO₂Cl₂)₂(C₅H₅N)₂]*, Journal of Inorganic Biochemistry, 139, 2014, s. 85-92.
31. Tserkezidou C., Hatzidimitriou A.G., Psomas G., *Nickel(II) complexes of flufenamic acid. Characterization, structure and interaction with DNA and albumins*, Polyhedron, 117, 2016, s. 184-192.
32. Bocian A., Ciszkowicz E., Hus K., Buczkowicz J., Lecka-Szlachta K., Pietrowska M., Petrilla V., Petrillová M., Legáth L., *Antimicrobial activity of protein fraction from Naja Ashei venom against Staphylococcus epidermidis*, Molecules, 25, 2020, s. 293.

33. Spoorthi N.J., Vishwanatha T., Reena V., Divyashree B.C., Sampath A., Siddhalingeswar K.G., Venugopal N., Ramesh I., *Antibiotic synergy test. Checkerboard method on multi drug resistant Pseudomonas aeruginosa*, International Research Journal of Pharmacy, 2, 2011, s. 196-198.
34. Odds F.C., *Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them*, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 52, 2003, s. 1.
35. Junaid K., Ul Mustafa A., Arshad S., Al Farraj D.A., Younas S., Ejaz H., *Burn wound infections. A serious threat of multidrug-resistant Staphylococcus aureus*, Pakistan Journal of Medical and Health Sciences, 13, 2019, s. 804.
36. Gonzalez M.R., Ducret V., Leoni S., Fleuchot B., Jafar P., Raffoul W., Applegate L.A., Que Y.A., Perron K., *Transcriptome analysis of pseudomonas aeruginosa cultured in human burn wound exudates*, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8, 2018, s. 1-14.
37. Lv Z., Zhao D., Chang J., Liu H., Wang X., Zheng J., Huang R., Lin Z., Shang Y., Ye L., Wu Y., Han S., Qu D., *Anti-bacterial and anti-biofilm evaluation of thiazolopyrimidinone derivatives targeting the histidine kinase yycg protein of Staphylococcus epidermidis*, Frontiers in Microbiology, 8, 2017, s. 1-10.

Przeciwbakteryjna aktywność kompleksów jonów Co(II), Mn(II) oraz Zn(II) z kwasem niiflumowym oraz kwasem niiflumowym i 1,10-fenantroliną

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było dokonanie oceny właściwości antybakteryjnych kompleksów jonów Co(II), Mn(II), Zn(II) z niesteroidowym lekiem przeciwzapalnym, kwasem niiflumowym, a także z 1,10-fenantroliną jako koligandem, wobec bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych. Wyznaczono wartości minimalnego stężenia hamującego wzrost bakterii, minimalnego stężenia bakterioobójczego oraz wykorzystano metodę szachownicy (ang. *checkerboard*) w celu określenia rodzaju interakcji pomiędzy kompleksami zawierającymi jony cynku(II) a antybiotykiem gentamycyną wobec *Staphylococcus aureus* oraz *Escherichia coli*. Ogólne najbardziej korzystne działanie kompleksów stwierdzono przeciw bakteriom *S. epidermidis* ATCC 12228, dla których wyznaczono wartości MIC porównywalne ze standardowymi antybiotykami (chloramfenikol, gentamycyna, kanamycyna). Wzmocnione działanie antybakteryjne wykazała kombinacja gentamycyny z kompleksem jonów Zn(II) z kwasem niiflumowym i 1,10-fenantroliną, dla których rodzaj interakcji został określony jako synergistyczny.

Słowa kluczowe: kwas niiflumowy, 1,10-fenantrolina, kompleksy metali przejściowych, badania antybakteryjne

Antibacterial activity of Co(II), Mn(II) and Zn(II) complexes with niiflumic acid and 1,10-phenanthroline

Abstract

The aim of this study was to evaluate the antibacterial properties of Co(II), Mn(II), Zn(II) ion complexes with a non-steroidal anti-inflammatory drug, niiflumic acid, as well as with 1,10-phenanthroline as a colligand, against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The values of the minimum concentration inhibiting bacterial growth, the minimum bactericidal concentration were determined and the checkerboard method was used to determine the type of interaction between complexes containing zinc(II) ions and the antibiotic gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The overall most beneficial effect of the complexes was found against *S. epidermidis* ATCC 12228 bacteria, for which MIC values comparable with standard antibiotics (chloramphenicol, gentamicin, kanamycin) were determined. The combination of gentamicin with a complex of Zn(II) ions with niiflumic acid and 1,10-phenanthroline, for which the type of interaction was described as synergistic, demonstrated the enhanced antibacterial activity.

Keywords: niiflumic acid, 1,10-phenanthroline, transition metal complexes, antibacterial tests

Występowanie grzybów w samochodowych filtrach klimatyzacyjnych

1. Wprowadzenie

Transport drogowy jest w Polsce najbardziej powszechnym sposobem przewozu osób i towarów, stanowił on w 2019 r. 86,5%. Przykładem może tu być Warszawa, gdzie szacunkowa liczba pasażerów przewiezionych autobusami komunikacji miejskiej w 2019 r. wносиła 600 mln. Transportem samochodowym w 2019 r. przewieziono na terenie Polski ponad 2 mld ładunków, dla porównania kolejną zaledwie 200 milionów [1]. Liczba osobowych pojazdów samochodowych zarejestrowanych w Polsce, wg Centralnej Ewidencji Pojazdów i Kierowców, w dniu 31 grudnia 2019 r. wyniosła ponad 24 mln, natomiast samochodów ciężarowych ponad 3,5 mln [2].

W celu podwyższenia komfortu kierowców i pasażerów w pojazdach samochodowych instalowane są manualne lub automatyczne systemy klimatyzacyjne. W 1939 r. firma Packard w Stanach Zjednoczonych po raz pierwszy zaoferowała nabywcom samochodów osobowych klimatyzatory. Chrysler Imperial w 1953 roku był jednym z pierwszych samochodów seryjnych, który oferował jako opcję nowoczesną klimatyzację samochodową [3]. Od lat 50. XX w. regularnie obserwuje się wzrost liczby samochodów wyposażonych w instalację klimatyzacyjną. Pod koniec lat 80. około 10% nowych samochodów sprzedawanych w Europie było wyposażonych w instalacje klimatyzacyjne, w 2013 r. było to już 74%. W nowoczesnych instalacjach klimatyzacyjnych samochodów osobowych stosowane są najczęściej filtry jednostopniowe wykonane z celulozy, celulozy z włókniną lub wyłącznie z włókniny z tworzywa sztucznego (np. poliestru). Samochody ciężarowe, pojazdy eksploatowane w warunkach dużego zapylenia są zwykle wyposażone w kilkustopniowe systemy filtracji: warstwa podstawowa, odpowiedzialna za wychwyt największych cząstek pyłu, w tym pyłków roślin; warstwa środkowa (mikrofaza), zatrzymująca cząstki grzybów, bakterie i drobiny sadzy; warstwa nasycona węglem aktywnym (opcjonalnie), która chroni wnętrze kabiny samochodu przed szkodliwymi gazami, takimi jak: ozon, tlenek węgla, tlenek azotu; warstwa nośna, stabilizująca konstrukcję całego filtra [4].

W miarę wydłużania się okresu eksploatacji zanieczyszczone filtry w samochodowych systemach klimatyzacyjnych mogą zapewniać mikroorganizmom dostęp do substancji odżywczych i wody [5]. Stają się wówczas źródłem niepożądanego zanieczyszczenia powietrza mikroorganizmami, w tym drobnoustrojami chorobotwórczymi [6]. W piśmiennictwie przedmiotu spotykane są prace charakteryzujące zanieczyszczenie mikrobiologiczne samochodowych instalacji klimatyzacyjnych. Wynika z nich, że pojawiają się

¹ magol@ciop.pl, Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy, www.ciop.pl.

² fatla.angelina@imw.lublin.pl, Instytut Medycyny Wsi im. W. Chodźki, www.imw.lublin.pl.

³ agsto@ciop.pl, Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy, www.ciop.pl.

⁴ ragor@ciop.pl, Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy, www.ciop.pl.

głównie grzyby, a wśród nich pleśniowe i drożdżoidalne. Najczęściej izolowane są gatunki z rodzaju: *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium* oraz *Candida* [7-9].

Występowanie i rozwój grzybów pleśniowych wiąże się z uwalnianiem do środowiska wielu aktywnych biologicznie cząstek, w tym alergenów, mykotoksyn, lotnych związków organicznych i glukanów. Narażenie, zwłaszcza drogą inhalacyjną, na grzyby pleśniowe może być przyczyną reakcji alergicznych, przybierających różne postaci dolegliwości: zapalenia spojówek, nieżyty błony śluzowej nosa, kataru siennego, dychawicy oskrzelowej, a także alergicznego zapalenia pęcherzyków płucnych (AZPP). U osób z obniżoną odpornością grzyby mogą być przyczyną ciężkich infekcji oportunistycznych [10].

W tym kontekście celem niniejszych badań była ocena samochodowych włóknin filtracyjnych pod kątem obecności w nich grzybów pleśniowych i drożdżoidalnych.

2. Materiały i metody

Próbki używanych filtrów z 10 samochodów ciężarowych/dostawczych pobierano w 2 turach pomiarowych: w czasie trwania umownie przyjętego sezonu „zimowego” (3-miesięczny okres – od stycznia do marca, w którym średnia temperatura powietrza zewnętrznego utrzymywała się poniżej 10°C przez co najmniej 7 dni) oraz „letniego” (5-miesięczny okres – od maja do września, o średniej temperaturze powietrza zewnętrznego powyżej 10°C utrzymującej się przez co najmniej 7 dni).

W każdej turze pomiarowej pobierano również próbki filtrów nowych/nieużywanych i poddawano je analizie w taki sam sposób, jak używane filtry.

Charakterystykę samochodów wytypowanych do badań przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka samochodów ciężarowych objętych badaniem w sezonach „zimowym” i „letnim”

Nr	Rok produkcji	Przebieg [km]	Przebieg od ostatniej wymiany filtra kabinowego [km]	Rodzaj systemu klimatyzacyjnego
Sezon zimowy				
1/Z	2015	465 250	50 000	Automatyczny
2/Z	2014	420 000	50 000	Manualny
3/Z	2016	388 204	50 000	Manualny
4/Z	2014	310 000	30 000	Manualny
5/Z	2014	512 355	50 000	Automatyczny
6/Z	2010	586 100	brak danych	Automatyczny
7/Z	2013	510 000	50 000	Automatyczny
8/Z	2000	693 000	brak danych	Manualny
9/Z	2011	567 000	brak danych	Automatyczny
10/Z	2015	550 000	200 000	Automatyczny
Sezon letni				
1/L	2000	688 000	brak danych	Manualny
2/L	2017	360 000	70 000	Manualny
3/L	2017	388 000	50 000	Automatyczny
4/L	2016	266 380	50 000	Manualny
5/L	2016	525 500	brak danych	Automatyczny
6/L	2009	1 208 724	brak danych	Automatyczny
7/L	2011	599 345	brak danych	Automatyczny

8/L	2008	78 000	20 000	Manualny
9/L	2014	700 000	100 000	Automatyczny
10/L	1999	555 000	20 000	Manualny

Źródło: opracowanie własne.

Z każdego filtra pobierano, przy użyciu sterylnego skalpela/nożyczek, fragment o wymiarach 10 x 10 cm, ważono go i umieszczano w 100 ml roztworu (1 g/l pepton + 5 g/l NaCl). Każdą próbkę następnie wytrząsano na wytrząsarce orbitalnej przez 15 minut przy 250 rpm, a w dalszej kolejności wysiewano, każdorazowo w 2 powtórzeniach, po 100 µl na podłoża mikrobiologiczne: agar z ekstraktem słodowym (Malt Extract Agar – MEA, Merck KGaA, Darmstadt, Niemcy).

Warunki inkubacji posianych próbek z filtrów przedstawiały się następująco: 4 dni (30°C) + 4 dni (22°C). Wszystkie próbki były inkubowane w warunkach tlenowych.

Stężenie żywych mikroorganizmów było wyrażane jako liczba jednostek tworzących kolonie (jtk), obecnych w 1 m² filtra (jtk/m²).

Identyfikacji grzybów dokonano na podstawie obserwacji makro- i mikroskopowych cech kolonii prowadzonych w oparciu o klucze taksonomiczne [11-13]. Do identyfikacji grzybów drożdżoidalnych zastosowano szereg biochemiczny API AUX (bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, Francja).

Przynależność gatunkowa grzybów zidentyfikowanych przy zastosowaniu metod biochemicznych i mikroskopowych została potwierdzona metodami biologii molekularnej.

2.1. Analiza DNA grzybów pleśniowych

Po 8 dniach hodowli grzybów na agarze z ekstraktem słodowym materiał do izolacji DNA zmywano z płytek przy użyciu soli fizjologicznej (0,9% NaCl).

Izolację kwasów nukleinowych wykonano metodą kolumnkową przy użyciu zestawu Syngen Fungi DNA Mini Kit (Syngen Biotech, Polska), zgodnie z protokołem do ekstrakcji całkowitego DNA z kultur tkankowych grzybów. W celu oznaczenia stężenia DNA oraz sprawdzenia czystości otrzymanych izolatów wykonano pomiary absorbancji przy długości fali: 260 nm oraz 280 nm, na aparacie QIAxpert (Qiagen, Germantown, USA).

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) została wykonana z wykorzystaniem primerów ITS1 (5'-TCCGTA GGTGAACCTTGCGG-3') i ITS4 (5'-TCCTCC GCTTATTGATATGC-3'), komplementarnych do wysoce konserwatywnych regionów rybosomalnego DNA (rDNA) większości gatunków grzybów, obejmujących geny 18S rRNA dla małej podjednostki rybosomu, 5.8S rRNA oraz 28S rRNA dla dużej podjednostki rybosomu [14].

Kontrolę pozytywną analizy stanowiło DNA wyizolowane z hodowli mikrobiologicznej szczepu wzorcowego *Aspergillus flavus* (ATCC 8062). Kontrolę negatywną stanowiła woda wolna od nukleaz (Qiagen).

Reakcja amplifikacji została przeprowadzona w termocyklerze C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, USA). Amplifikacja DNA obejmowała następujące etapy: denaturację wstępną (10 minut w 96°C) oraz 30 cykli obejmujących denaturację właściwą (60 sekund w 95°C), przyłączanie primerów (60 sekund w 55°C), elongację (60 sekund w 72°C) oraz wydłużanie końcowe (10 minut w 72°C).

Obraz rozdziału elektroforetycznego analizowano za pomocą systemu do analizy i dokumentacji żeli Ingenius Syngene Bio Imaging (SYNGENE, Cambridge, Wielka Brytania). Produkt odczytywano w obecności markera GeneRules 100bp (Thermo scientific, Waltham, USA) w systemie do dokumentacji żeli Ingenius Syngene Bio Imaging (SYNGENE). Za wynik dodatni uznawano produkt o wielkości 520-550 par zasad.

2.2. Wykonanie reakcji real-time PCR

W celu potwierdzenia w badanych izolatach obecności co najmniej 1 z 4 gatunków rodzaju *Aspergillus* – *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* i/lub *A. flavus* – wykonano badania z wykorzystaniem techniki real-time PCR – (*Aspergillus* – Selective screening kit, Genesis, Chandler's Ford, Wielka Brytania), przeprowadzając modyfikację własną celem zwiększenia czułości metody.

Mieszanina reakcyjna o objętości 20 μ l zawierała 0,5 μ l *Aspergillus*_SCRN primer/probe mix (zawartej w zestawie), 2 μ l wody wolnej od nukleaz 9 (zawartej w zestawie), 2,5 μ l wyizolowanego DNA oraz 5 μ l iTaqTM Universal Probes Supermix (Bio-Rad, USA). Oprócz szczepów kontrolnych użyto kontroli pozytywnej załączonej do zestawu *Aspergillus*_SCRN positive control template (FAM). Reakcje amplifikacji przeprowadzono na aparacie StepOne real-time PCR System ((Thermo scientific, Waltham, USA) w następujących warunkach: Pre-PCR Read (holding stage) – 30 sekund w temperaturze 60°C, Holding stage – 2 minuty w 50°C i 10 minut w 95°C; 40 cykli: 15 sekund w 95°C i 1 minuta w 60°C, Post PCR-Read – 30 sekund w 60°C.

Stosowane w doświadczeniu sondy TaqMan znakowane były barwnikiem FAM (6-karboksylofluoresceina), odczyt fluorescencji prowadzono zgodnie z protokołami, na kanale niebieskim.

Zastosowane testy charakteryzują się wysoką czułością ≥ 90 i pozwalają na wykrycie od 1×10^2 do 1×10^8 kopii poszukiwanych genów w próbce.

Za wynik pozytywny przyjmuje się wynik, gdy krzywa amplifikacji przecina linię odcięcia (threshold line), dając wartość cyklu progowego C_q (ang. *threshold cycle*). Próbkę, dla której wartość C_q = 28 ± 3 , przy braku amplifikacji w kontroli negatywnej oraz przy wartościach $16 \leq C_q \leq 23$ dla kontroli pozytywnej (zgodnie z zaleceniami zawartymi w protokole) były uznawane za pozytywne. Pod uwagę brano te reakcje, dla których wydajność amplifikacji kształtowała się na poziomie $\geq 90\%$.

2.3. Analiza statystyczna

Uzyskane dane pomiarowe poddano analizie statystycznej, wykorzystując test Kruskala-Wallis'a, test U Manna-Whitney'a, analizę korelacji Spearman'a oraz test Fisher'a z wykorzystaniem pakietu „STATISTICA data analysis software system”, wersja 7.1. (StatSoft, Inc., Tulsa, USA, 2006), przyjmując za znamienne statystycznie wartości $p < 0,05$.

3. Wyniki

3.1. Analiza ilościowa

Wyniki analizy ilościowej grzybów w próbkach włóknin filtracyjnych z instalacji klimatyzacyjnych samochodów ciężarowych/dostawczych (pobranych w sezonie „letnim” i „zimowym”) oraz w nieużywanych/nowych włókninach filtracyjnych przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Stężenie grzybów – wartości średnie [jtk/m²] i odchylenie standardowe SD – w badanych próbkach włóknin filtracyjnych instalacji klimatyzacyjnych w samochodach ciężarowych/dostawczych pobranych w sezonie „letnim” i „zimowym”

Nr pojazdu	Stężenie grzybów, wartość średnia [jtk/m ²]	SD
Sezon zimowy		
1/Z	9,5 x 10 ⁴	1414,2
2/Z	1,6 x 10 ⁵	707,1
3/Z	1,0 x 10 ⁵	7424,6
4/Z	7,0 x 10 ⁴	2121,3
5/Z	1,7 x 10 ⁵	2121,3
6/Z	4,9 x 10 ⁴	6364,0
7/Z	1,4 x 10 ⁴	9545,9
8/Z	8,5 x 10 ⁴	36769,6
9/Z	4,4 x 10 ⁴	9545,9
10/Z	1,1 x 10 ⁵	6010,4
Kontrola	5,0 x 10 ²	353,6
Sezon letni		
1/L	1,8 x 10 ⁵	40305,1
2/L	5,9 x 10 ⁴	5656,9
3/L	6,2 x 10 ⁴	19799,0
4/L	5,8 x 10 ⁴	3535,5
5/L	2,2 x 10 ⁵	22273,9
6/L	2,5 x 10 ⁵	3182,0
7/L	2,1 x 10 ⁵	15909,9
8/L	4,0 x 10 ⁴	4242,6
9/L	9,2 x 10 ⁴	6717,5
10/L	2,4 x 10 ⁴	9545,9
Kontrola	2,0 x 10 ³	707,1

Źródło: opracowanie własne.

Analiza stężenia grzybów pleśniowych i drożdżoidalnych we włókninach filtracyjnych instalacji klimatyzacyjnych samochodów ciężarowych w sezonie „letnim” i „zimowym” wykazała, że ich średnie stężenia wynosiły odpowiednio 1,2 x 10⁵ jtk/m² i 3,4 x 10⁴ jtk/m² włókniny.

Analiza stężeń grzybów we włókninach filtracyjnych w obu sezonach pomiarowych wykazała istotne statystycznie różnice. Wyższe stężenia grzybów występowały w sezonie „letnim” niż w „zimowym” (test Manna-Whitney’a: p < 0,001).

Porównując wartości stężeń grzybów zmierzone we włókninach filtracyjnych pobranych z pojazdów samochodowych z analogicznymi wartościami zmierzonymi w próbkach włóknin nowych/nieużywanych filtrów, stwierdzono, że stężenia grzybów w próbkach filtrów nowych były znamienne niższe od wartości stężeń z próbek filtrów używanych (w obu sezonach pomiarowych, test Kruskala-Wallis: p < 0,01).

Porównanie wyników stężeń grzybów w obu sezonach pomiarowych wykazało znamienne statystycznie różnice pomiędzy badanymi samochodami (test Kruskala-Wallis: p < 0,05). Najwyższe stężenia grzybów odnotowano w pojazdach nr 1L, 6L oraz 7L. Były to pojazdy z największą liczbą przejechanych kilometrów od ostatniej wymiany filtra powietrza podczas przeglądu instalacji klimatyzacyjnej. Wartości te były

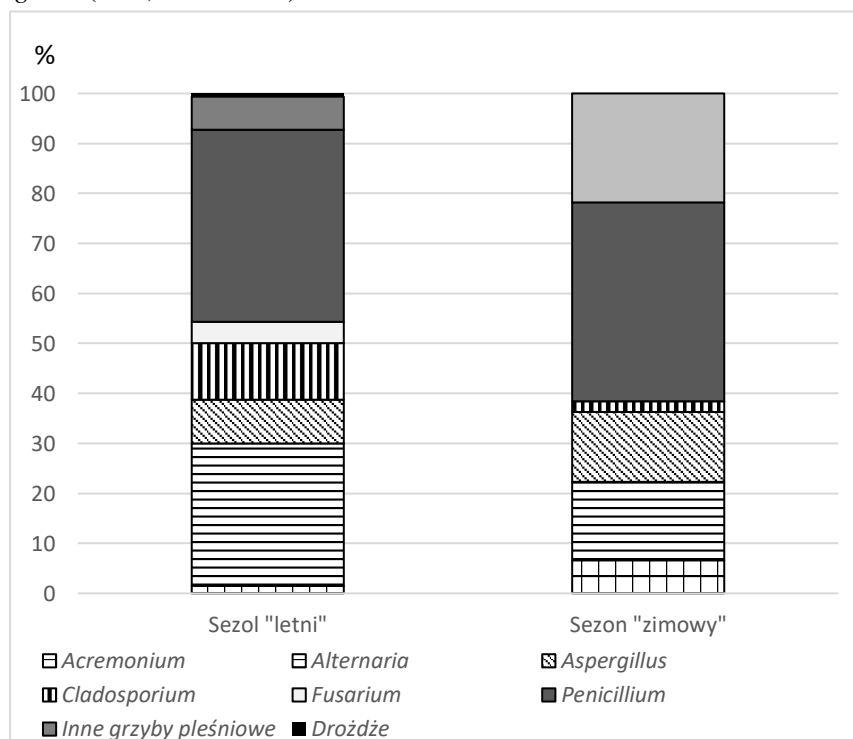
istotnie wyższe w porównaniu z pozostałymi badanymi samochodami ($p < 0,05$). W przypadku pojazdu nr 6L nie jest znana liczba kilometrów przejechanych od ostatniej wymiany filtra kabinowego, natomiast stan licznika pojazdu (1 208 742 km), może wskazywać na bardzo odległy czas serwisu instalacji klimatyzacyjnej. Na podstawie wyników przeprowadzonej analizy korelacji Spearmana stwierdzono, że liczba przejechanych kilometrów od momentu wymiany filtra powietrza wpływała istotnie na wielkości obserwowanych stężeń grzybów we włókninie filtracyjnej ($R = 0,622$ przy $p < 0,05$), a zależność ta była wprost proporcjonalna.

W niniejszych badaniach porównano również średnie stężenia grzybów we włókninach filtracyjnych w zależności od typu systemu klimatyzacyjnego (automatyczny i manualny). Na podstawie wyników wykonanej analizy stwierdzono, że typ klimatyzacji nie wpływał w sposób znaczący na wielkości obserwowanych stężeń grzybów w badanych filtrach powietrza samochodów ciężarowych ($p > 0,05$).

3.2. Analiza jakościowa bioty grzybowej

Udziały procentowe poszczególnych grup grzybów w stosunku do całości bioty grzybowej wyizolowanej z próbek filtrów przedstawiono na rysunku 1.

W badanych próbach włóknin filtracyjnych w sezonie „letnim” i „zimowym” dominowały grzyby z rodzaju *Penicillium* (od 38,4% do 39,8%). Kolejną grupą grzybów pod względem częstości izolacji były gatunki z rodzajów *Alternaria* (od 15,7% do 28,5%) i *Aspergillus* (od 8,7% do 14%).



Rysunek 1. Udziały procentowe poszczególnych grup mikroorganizmów w stosunku do całości bioty grzybowej wyizolowanej z próbek filtrów. Źródło: opracowanie własne

Wyniki analizy jakościowej grzybów wyizolowanych z badanych włókien filtracyjnych przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3. Rodzaje i gatunki grzybów zidentyfikowane w próbkach włókien filtracyjnych samochodowych instalacji klimatyzacyjnych

Grzyby	Sezon „zimowy”	Sezon „letni”	Kontrola Sezon „zimowy”	Kontrola Sezon „letni”
Grzyby pleśniowe				
<i>Acremonium strictum</i>	x	x	x	x
<i>Alternaria alternata</i>	x	x		
<i>Aspergillus fumigatus**</i>	x	x		
<i>Aspergillus flavus**</i>	x	x		
<i>Aspergillus nidulans</i>		x		
<i>Aspergillus niger</i>	x	x		
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	x	x		
<i>Fusarium culmorum</i>		x		
<i>Fusarium solani</i>		x		
<i>Mucor spp.</i>	x	x		
<i>Penicillium brevicompactum</i>	x	x		x
<i>Penicillium chrysogenum Thom</i>	x			x
<i>Penicillium citrinum Thom</i>	x	x	x	x
<i>Penicillium commune Thom</i>	x	x	x	x
<i>Trichoderma spp.</i>		x		
<i>Rhizopus spp.</i>	x			
<i>Ulocladium spp.</i>		x		
Grzyby drożdżoidalne				
<i>Candida famata</i>		x		
<i>Candida rugosa</i>		x		

Objaśnienia: ** – 2. grupa zagrożenia wg rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 11 grudnia 2020, Dz. U. z 2020 r., poz. 2234. Źródło: opracowanie własne

W badanych próbkach filtrów pobranych w samochodach ciężarowych/dostawczych w sezonie „letnim” wyizolowano 18 gatunków grzybów należących do 16 rodzajów, natomiast w sezonie „zimowym” 17 gatunków z 11 rodzajów. Mniejsze zróżnicowanie taksonomiczne bioty grzybowej obserwowano w sezonie „zimowym”.

Wśród zidentyfikowanych szczepów dominowały te z rodzajów: *Alternaria*, *Aspergillus* oraz *Penicillium*. Gatunkowo wśród grzybów najliczniej reprezentowane były pleśnie z rodzajów *Aspergillus* i *Penicillium* (w obu przypadkach po 4 gatunki).

W próbce pobranych z filtrów nowych/nieużywanych (kontrola) w sezonie „letnim” wyizolowano 3 gatunki grzybów należące do 2 rodzajów, natomiast w sezonie „zimowym” 2 gatunki z 2 rodzajów. W próbkach kontrolnych występowały grzyby pleśniowe z rodzajów *Penicillium* i *Acremonium*.

3.3. Analiza molekularna próbek

Stężenia DNA w izolatach z próbek filtrów mieściły się w granicach od 68,2 do 168,5 ng/μl, natomiast poziom zanieczyszczeń w badanych próbkach nie przekraczał granicy od 1,6 do 4,6%.

We wszystkich badanych próbkach filtrów potwierdzono obecność regionów ITS1 i ITS 4, komplementarnych do wysoce konserwatywnych fragmentów rybosomalnego DNA (rDNA) większości gatunków grzybów (tab. 4). Geny te są obecne w komórkach wszystkich grzybów, zarówno drożdżoidalnych, jak i pleśniowych (obecność produktu PCR oznacza obecność DNA pochodzącego z komórek grzybowych).

W celu potwierdzenia w badanych izolatach obecności co najmniej jednego z 4 gatunków rodzaju *Aspergillus* (*Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* i/lub *A. flavus*) wykonano badania z wykorzystaniem techniki real-time PCR. W większości (85%) próbek filtrów pobranych z samochodów ciężarowych w obu sezonach stwierdzono obecność ww. potencjalnie zakaźnych i toksycznych gatunków z rodzaju *Aspergillus*. W próbkach filtrów nieużywanych nie stwierdzono występowania gatunków rodzaju *Aspergillus*: *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* i/lub *A. flavus*. Analiza statystyczna wykazała również, że sezon pomiarowy („letni”/„zimowy”) nie miały istotnego wpływu na występowanie grzybów *Aspergillus fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* i/lub *A. flavus* w badanych próbkach filtrów (test Fishera: $p = 1$).

Tabela 4. Wyniki analizy reakcji elektroforetycznej produktów reakcji PCR przeprowadzonych na izolatach DNA z próbek filtrów na obecność DNA pochodzącego z komórek grzybowych oraz reakcji real-time PCR na obecność grzybów pleśniowych z rodzaju *Aspergillus*

Nr próbki	Produkt PCR ITS1/ITS4	real-time PCR +/- <i>A. fumigatus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. terreus</i> i/lub <i>A. flavus</i>
Sezon „letni”		
1/L	+	+
2/L	+	+
3/L	+	-
4/L	+	-
5/L	+	-
6/L	+	+
7/L	+	+
8/L	+	+
9/L	+	+
10/L	+	+
Kontrola	+	-
Sezon „zimowy”		
1/Z	+	+
2/Z	+	+
3/Z	+	+
4/Z	+	+
5/Z	+	+
6/Z	+	+
7/Z	+	+
8/Z	+	+
9/Z	+	+
10/Z	+	+
Kontrola	+	-

Źródło: opracowanie własne.

4. Dyskusja

Analiza uzyskanych wyników wykazała, że filtry powietrza instalacji klimatyzacyjnych były zanieczyszczone grzybami pleśniowymi i drożdżoidalnymi. Najwyższe stężenia grzybów, sięgające wartości $1,2 \times 10^5$ jtk/m² włókniny, odnotowano w pojazdach z największą liczbą przejechanych kilometrów od ostatniej wymiany filtra powietrza. Wg analiz przeprowadzonych przez innych badaczy – stężenia mikroorganizmów grzybowych w samochodowych włókninach filtracyjnych kształtowały się na poziomie 5×10^2 do 5×10^5 jtk/m² włókniny [15-17]. Uwzględniając przytoczone dane, można stwierdzić, że wartości stężeń grzybów izolowanych z samochodów ciężarowych/dostawczych mieściły się w zakresie stężeń zazwyczaj obserwowanych w tego typu filtrach powietrza.

Na podstawie badań przeprowadzonych w sezonach pomiarowych „letnim” i „zimowym” stwierdzono, że stężenia grzybów w filtrach powietrza były istotnie wyższe w sezonie „letnim”. Zmienność sezonowa jest ważnym czynnikiem wpływającym na poziomy stężenie mikroorganizmów. Zakresy stężeń grzybów w powietrzu atmosferycznym kształtują się latem na poziomie 10^2 – 10^4 jtk/m³, a zimą poniżej 10^2 jtk/m³. Skutkować to może addytywnie wyższym zanieczyszczeniem filtrów powietrza wewnątrz kabin samochodowych w „ciepłym” sezonie roku [18].

Analiza jakościowa wykazała, że w badanych próbkach filtrów w obu sezonach pomiarowych najczęściej identyfikowanymi gatunkami były grzyby z rodzajów *Penicillium*, *Aspergillus* i *Cladosporium*. Wykorzystanie techniki real-time PCR potwierdziło obecność w badanych próbkach filtrów potencjalnie zakaźnych i toksycznych gatunków grzybów [18] z rodzaju *Aspergillus*: *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus* i/lub *A. flavus*. Zastosowanie metod klasycznych/hodowlanych ma największe znaczenie dla identyfikacji mikroorganizmów żywych, które są kluczowe w ocenie narażenia zawodowego człowieka na szkodliwe czynniki biologiczne (SCB) i dają możliwość interpretacji poziomów obserwowanego zanieczyszczenia [19, 20]. Mikroorganizmy żywe, zdolne do wzrostu, stanowią tylko niewielki procent rzeczywistej mikrobioty, co prowadzi do niedoszacowania narażenia człowieka na SCB. Uwzględniając fakt, że w bioaerozolu obecne są również np. submikronowe fragmenty struktur mikroorganizmów ocenia się, że różnica w stężeniu bioaerozolu żywego w porównaniu z całkowitym jest jeszcze bardziej wyraźna [21].

Zastosowanie w identyfikacji jakościowej mikroorganizmów równoległe z narzędziami molekularnymi umożliwia bardziej dokładną charakterystykę mikrobioty wyizolowanej z filtrów powietrza [15]. Słusznym zatem jest stosowanie metod biologii molekularnej jako uzupełnienie metod hodowlanych dla potrzeb rozszerzonej oceny narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne.

Z dostępnych danych piśmiennictwa przedmiotu wynika, że grzyby pleśniowe z rodzajów *Acremonium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Aureobasidium*, *Cladosporium* i *Penicillium* są najczęściej występującymi gatunkami w samochodowych włókninach filtracyjnych [22]. Grzyby pleśniowe, głównie z rodzajów *Aspergillus*, *Cladosporium* i *Penicillium*, mogą stanowić szczególne zagrożenie dla zdrowia człowieka. Kontakt z nimi może być przyczyną reakcji alergicznych typu dychawicy oskrzelowej, zapalenia spojówek, kataru siennego lub alergicznego zapalenia pęcherzyków płucnych. Stanowią one najczęstszą przyczynę alergii na pleśnie. Około 80 gatunków grzybów jest łączonych przyczynowo z symptomami związanymi z chorobami alergicznymi układu odde-

chowego. Dotyczy to najczęściej takich gatunków grzybów jak *Penicillium notatum*, *Aspergillus fumigatus* i *Cladosporium herbarum* [23, 24]. Alergeny grzybów stanowią główną przyczynę chorób o podłożu atopowym [25]. Do chorób układu oddechowego wywołanych działaniem grzybów pleśniowych należą między innymi: astma oskrzelowa, alergiczne zapalenie pęcherzyków płucnych (*alveolitis allergica*), zespół toksyczny wywołany pyłem organicznym (ang. *organic dust toxic syndrome*, ODTS), bisynoza, przewlekły nieżyt oskrzeli.

Niektóre grzyby pleśniowe, takie jak *A. fumigatus*, powodują zakażenia oportunistyczne u osób z obniżoną odpornością, w tym cierpiących na choroby alergiczne, takie jak astma lub mukowiscydoza. *A. fumigatus* uznano jako czynnik etiologiczny wywołujący ok. 90% infekcji grzybiczych u ludzi [10, 26]. Zidentyfikowane w badanych próbkach filtrów samochodowych gatunki *A. fumigatus* oraz *A. flavus* zostały sklasyfikowane na liście szkodliwych czynników biologicznych w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z 2020 r. w grupie 2. zagrożenia [27], a zatem ich obecność należy uznać za niekorzystną z punktu widzenia zdrowia narażonych na nie osób.

Występowanie i rozwój grzybów pleśniowych wiąże się często z uwalnianiem do środowiska mykotoksyn. Mykotoksyny produkowane przez niektóre grzyby pleśniowe (między innymi grzyby z rodzajów *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fusarium*) charakteryzują się działaniem toksycznym na organizmy zwierząt i ludzi [28]. Do mykotoksyn należą m.in. aflatoksyny wytwarzane przez *Aspergillus flavus*, ochratoksyny uwalniane przez *Aspergillus ochraceus* czy rubratoksyny wytwarzane przez *Penicillium rubrum*. Najnowsze dane dowodzą, że aflatoksyny są produkowane przez co najmniej 20 gatunków z rodzaju *Aspergillus*. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC, ang. *The International Agency for Research on Cancer*) sklasyfikowała wszystkie aflatoksyny do grupy 1., jako rakotwórcze dla ludzi [29].

5. Wnioski

W samochodowych instalacjach klimatyzacyjnych panują korzystne warunki do rozwoju chorobotwórczych grzybów. Wraz z wydłużeniem się okresu eksploatacji samochodowe instalacje klimatyzacyjne (np. włókniny filtracyjne) mogą stanowić źródło zanieczyszczenia powietrza tymi szkodliwymi czynnikami biologicznymi.

Wśród oznaczonych grzybów pleśniowych zidentyfikowano gatunki *Aspergillus flavus* i *Aspergillus fumigatus* sklasyfikowane na liście szkodliwych czynników biologicznych w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z 2020 r. w grupie 2. Zagrożenia, posiadają też dodatkowe oznakowanie – „A – możliwe efekty alergiczne”. Ich obecność w dużych stężeniach jest powszechnie uznawana za niekorzystną z punktu widzenia zdrowia narażonych osób.

Zastosowanie metod molekularnych (charakteryzujących się wysoką czułością i selektywnością) równoległe z metodami hodowlanymi daje możliwość dokładniejszej identyfikacji mikrobioty wyizolowanej z filtrów powietrza, poszerzając w ten sposób precyzję oceny narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne.

Obserwowane poziomy zanieczyszczenia mikrobiologicznego włókien filtracyjnych samochodów ciężarowych wskazują na konieczność częstszej wymiany filtrów w celu uniknięcia rozprzestrzeniania się bioaerozoli we wnętrzu ich kabin i potencjalnego narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne.

Uwagi ogólne

Publikacja opracowana w ramach zadania nr 2.SP.16 pt. „Ocena występowania grzybów o właściwościach zakaźnych i toksycznych na włókninach filtracyjnych pochodzących z układów wentylacyjnych środków transportu” realizowanego w ramach V etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w latach 2020–2022 w zakresie służb państwowych ze środków Ministerstwa Rodziny i Polityki Społecznej (koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy, kierownik projektu: dr Małgorzata Gołofit-Szymczak).

Literatura

1. Raport 2019, 2020, Zarząd Transportu miejskiego w Warszawie.
2. Transport. Wyniki działalności w 2019 r., GUS, Warszawa 2020.
3. <https://en.wikipedia.org/> [data dostępu: 10.08.05.2022].
4. Dziubak T., Dziubak S.D., *Experimental study of filtration materials used in the car air intake*, Materials, 13(16), 2020, s. 3498.
5. Fernández-Iriarte A., Duchaine C., Degois J., Mbareche H., Veillette M., Moreno N., Amato F., Querol X., Moreno T., *Bioaerosols in public and tourist buses*, Aerobiologia, 37, 2021, s. 525-541.
6. Li J.L., Mingzhen S., Fangxia Z.Z., Yao M., Wu C.Y., *Characterization of biological aerosol exposure risks from automobile air conditioning system*, Environmental Science and Technology, 47, 2013, s. 10660-10666.
7. Gołofit-Szymczak M., Górny R.L., Stobnicka-Kupiec A., Ławniczek-Wałczyk A., Cyprowski M., *Microbial air quality in municipal buses before and after disinfection of their air-conditioning systems*, Journal of Ecological Engineering, 20(10), 2019, s. 189-194.
8. Nowakowicz-Dębek B., Pawlak H., Wlazło Ł., Maksym P., Kapica J., Chmielowiec-Korzeniowska A., Trawińska B., *Evaluating bioaerosol exposure among bus drivers in the public transport sector*, Journal of Occupational and Environmental Hygiene, 14(11), 2017, s. 169-172.
9. Sattar S.A., Wright K.E., Zargar B., Rubino J.R., Khalid I., *Airborne infectious agents and other pollutants in automobiles for domestic use: potential health impacts and approaches to risk mitigation*, Journal of Environmental and Public Health, 2016, s. 1-12.
10. Gutarowska B., *Grzyby strzępkowe zasiedlające materiały budowlane. Wzrost oraz produkcja miotoksyn i alergenów*, Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej, Łódź 2010.
11. Fisher F., Cook N.B., *Fundamentals of diagnostic mycology*, WB Saunders Company, Philadelphia, PA, 1998.
12. Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C., *Introduction to food- and airborne fungi*, Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht 2004.
13. St-Germain G., Summerbell R., *Identifying filamentous fungi*, Star, Belmont 1996.
14. Kumar M., Shukla P.K., *Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single-stranded conformation polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis*, Journal of Clinical Microbiology, 43(2), 2005, s. 662-668.
15. Viegas C., Faria T., de Oliveira A.C., Caetano L.A., Carolino E., Quintal-Gomes A., Twarużek M., Kosicki R., Soszczyńska E., Viegas S., *A new approach to assess occupational exposure to airborne fungal contamination and mycotoxins of forklift drivers in waste sorting facilities*, Mycotoxin Research, 33(4), 2017, s. 285-295.
16. Viegas C., Monteiro A., dos Santos M., Faria T., Caetano L.A., Carolino E., Quintal Gomes A., Marchand G., Lacombe N., Viegas S., *Filters from taxis air conditioning*

- system. A tool to characterize driver's occupational exposure to bioburden?, *Environmental Research*, 164, 2018, s. 522-529.
17. Ji-Hyun L., Wan-Kuen J., *Exposure to airborne fungi and bacteria while commuting in passenger cars and public buses*, *Atmospheric Environment*, 39(38), 2005, s. 7342-7350.
 18. Varga J., Baranyi N., Chandrasekaran M., Vágvölgyi C., Kocsuó S., *Mycotoxin producers in the Aspergillus genus*, *Acta Biologica Szegediensis*, 59, 2015, s. 151-167.
 19. Eduard W., Halstensen A., *Quantitative exposure assessment of organic dust*, *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 7, 2009, s. 30-35.
 20. Samson R., Hoekstra E., Frisvad J., *Introduction to food and airborne fungi* (6th ed.), Central Bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, 2000, s. 1-282.
 21. Górný R., Harkawy A., Ławniczek-Wałczyk A., Wlazło A., Niesler A., Gołofit-Szymczak M., Cyprowski M., *Exposure to culturable and total microbiota in cultural heritage conservation*, *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, 29, 2016, s. 255-275.
 22. Liu Z., Ma S., Cao G., Meng C., He B., *Distribution characteristics, growth, reproduction and transmission modes and control strategies for microbial contamination in HVAC systems. A literature review*, *Energy and Buildings*, 177, 2018, s. 77-95.
 23. Khan A.A.H., Karuppaiyl S.M., Manoharachary C., Kunwar I.K., Waghray S., *Isolation, identification and testing for allergenicity of fungi from air-conditioned indoor environments*, *Aerobiologia*, 25, 2009, s. 119-123.
 24. Saijo Y., Kanazawa K., Nakayama K., Takigawa T., Tanaka M., Shibata E., Yoshimura T., Chikara H., Kisi R., *Relationships between mite allergen levels, mold concentrations, and sick building syndrome symptoms in newly built dwellings in Japan*, *Indoor Air*, 21, 2001, s. 253-263.
 25. Fischer G., Dott W., *Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene*, *Archives of Microbiology*, 179, 2003, s. 750-782.
 26. Dales R., Liu L., Wheeler A.J., Gilbert N.L., *Quality of indoor residential air and health*, *Canadian Medical Association Journal (Journal de l'Association Medicale Canadienne)*, 179(2), 2008, s. 147-152.
 27. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 11 grudnia 2020 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki (Dz. U. z 2020 r., poz. 2234).
 28. Fisher G., Müller T., Schwalbe R., Ostrowski R., Dott W., *Species-specific profiles of mycotoxins produced in cultures and associated with conidia of airborne fungi derived from biowaste*, *The International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203, 2000, s. 105-116.
 29. www.monographs.iarc.who.int [data dostępu: 28.09.2022].

Występowanie grzybów w samochodowych filtrach klimatyzacyjnych

Streszczenie

W samochodowych instalacjach klimatyzacyjnych panują zazwyczaj sprzyjające warunki do rozwoju szkodliwych czynników biologicznych. Celem badań była ocena samochodowych włóknin filtracyjnych pod kątem obecności w nich grzybów pleśniowych i drożdżoidalnych. Analizie poddano 20 używanych filtrów powietrza z samochodów ciężarowych/dostawczych pobranych w sezonie „zimowym” i „letnim”. Badania wykonano z zastosowaniem technik mikrobiologii klasycznej oraz metod biologii molekularnej (real-time PCR). Średnie stężenia grzybów we włókninach filtracyjnych instalacji klimatyzacyjnych samochodów ciężarowych w sezonie „letnim” i „zimowym” wynosiło odpowiednio $1,2 \times 10^5$ jtk/m² i $3,4 \times 10^4$ jtk/m² włókniny. W badanych próbach włóknin filtracyjnych dominowały grzyby z rodzaju *Penicillium*, *Alternaria* i *Aspergillus*. W 85% próbek filtrów stwierdzono obecność potencjalnie zakaźnych i toksycznych gatunków z rodzaju

Aspergillus. Zastosowanie metod molekularnych równoległe z metodami hodowlanymi daje możliwość dokładniejszej identyfikacji mikrobioty wyizolowanej z filtrów powietrza, poszerzając w ten sposób precyzję oceny narażenia na szkodliwe czynniki biologiczne.

Słowa kluczowe: grzyby pleśniowe, włókniny filtracyjne, instalacje klimatyzacyjne, samochody

Fungal contamination of automobile air-conditioning filters

Abstract

Automobile air conditioning systems create favourable conditions for growth of harmful biological agents. The purpose of this study was to assess the presence of mold and yeast fungi on filters used in ventilation systems. The 20 used air filters from trucks/vans collected in the "winter" and "summer" seasons were analysed. The research was carried out using classical microbiology techniques and molecular biology methods (real-time PCR). The average concentrations of fungi in truck air-conditioning filters during the 'summer' and 'winter' seasons were equal to $1,2 \times 10^5$ cfu/m² and $3,4 \times 10^4$ cfu/m² non-woven fabric, respectively. Among the most common fungal species in studied samples were those from *Penicillium*, *Alternaria* i *Aspergillus* genera. Potentially infectious and toxic species of the genus *Aspergillus* were found in 85% of the filter samples. Applications of molecular methods in parallel with classical microbiological methods makes it possible to more accurately identify the microbiota isolated from air filters, thus extending the precision of the assessment of exposure to harmful biological agents.

Keywords: fungi, nonwoven filters, air-conditioning system, cars

Rola wyciągu z fermentacji bakterii *Lactobacillus* w kształtowaniu cech funkcjonalnych pasty mikroorganizmicznej

1. Wprowadzenie

Jama ustna, zaraz po jelitach, jest miejscem występowania drugiej co do wielkości i różnorodności mikrobioty w organizmie ludzkim. Jest to najbardziej zróżnicowany ekosystem i szacuje się, że zawiera około 700 różnych taksonów [1]. Dominują w nim bakterie, natomiast udział grzybów w biomacie nie przekracza 0,1% [2]. Według informacji z bazy danych mikrobiomu jamy ustnej człowieka (HOMD, ang. *Human Oral Microbiome Database*) tylko 57% bakterii udało się zidentyfikować, natomiast 30% stanowią szczepy niepoddające się procedurom hodowli [3].

Przyglądając się mikrobiomowi jamy ustnej na tle innych środowisk, można zaobserwować, że jest on dość unikatowy, co ułatwia odróżnienie go od siedlisk mikroorganizmów zlokalizowanych w innych częściach ciała ludzkiego [1, 2]. Równocześnie charakteryzuje się zmiennością w trakcie całego życia [2, 4]. Wpływ na niego ma przede wszystkim wiek, płeć, sposób i jakość spożywanych pokarmów, przebyte leczenie, szerokość geograficzna, styl życia, używki – głównie tytoń [1, 2]. Natomiast przyglądając się jeszcze dokładniej temu ekosystemowi, można zauważyć bardzo wiele odrębnych nisz powstałych na różnych powierzchniach, twardych i miękkich, występujących w jamie ustnej [2, 5, 6]. Nisze te różnią się między sobą dostępnością tlenu, składników odżywczych, pH i przepływami śliny, co może mieć wpływ pobudzający lub hamujący na wzrost różnych organizmów w obrębie jamy ustnej [7, 8]. Szacuje się, że jeden mililitr śliny zawiera 10^8 - 10^9 jtk bakterii i są to mikroorganizmy głównie zasiedlające język, policzki oraz płytkę nazębną i dziąsłową [4].

Skład mikroorganizmów zasiedlających jamę ustną nie wpływa jedynie na stan jej zdrowia, ale również może oddziaływać na wystąpienie lub nasilenie innych ogólnoustrojowych schorzeń. Do najczęściej wymienianych bakterii jamy ustnej, uznawanych za patogenne, należą: *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*, *Aggregatibacter*, *Eubacterium nodatum*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*,

¹ michal.swiatek@itm.turek.pl, Instytut Technologii Mikrobiologicznych, Stowarzyszenie Ekosystem-Dziedzictwo Natury, www.itm.turek.pl.

² piotr.nowotnik@upwr.edu.pl, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, www.upwr.edu.pl.

³ aleksandra.jeske@itm.turek.pl, Instytut Technologii Mikrobiologicznych, Stowarzyszenie Ekosystem-Dziedzictwo Natury, www.itm.turek.pl.

⁴ aleksandra.kaczmarek@itm.turek.pl, Instytut Technologii Mikrobiologicznych, Stowarzyszenie Ekosystem-Dziedzictwo Natury, www.itm.turek.pl.

⁵ izabela.krzymińska@itm.turek.pl, Instytut Technologii Mikrobiologicznych, Stowarzyszenie Ekosystem-Dziedzictwo Natury, www.itm.turek.pl.

⁶ kamila.kazmierczak@probiotics.pl; Dział Badań i Rozwoju, ProBiotics Polska, www.probiotics.pl.

Candida albicans. Odpowiedzialne one są głównie za powstawanie płytki i kamienia nazębnego, rozwój próchnicy oraz powstawania nieprzyjemnego zapachu z ust [2, 9]. Część szczepów występujących w obrębie jamy ustnej zostało powiązanych z występowaniem konkretnych schorzeń w obrębie jamy ustnej. Z rozwojem próchnicy wiąże się *Streptococcus mutans* oraz *Candida albicans*, rozwój paradontozy indukują m.in. *Clostridia*, *Negativicutes*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Filifactor alocis*, *Methanobacterium curvum/congolense*, agresywne zapalenie przyzębia powiązane jest z obecnością *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* oraz *Tannerella forsythia*. Nowotwory jamy ustnej są również związane z występowaniem w jej mikroflorze mikroorganizmów, takich jak: *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus mitis*, *Tannerella forsythia* oraz *Porphyromonas gingivalis*. Odnotowuje się również powiązania z innymi chorobami, np. układu pokarmowego, układu sercowo-naczyniowego, zaburzeniami metabolicznymi oraz chorobami neurologicznymi takimi jak Alzheimer [2, 4]. *Streptococcus mutans* opisywany jest w literaturze jako kluczowy patogen występujący w jamie ustnej i odgrywa główną rolę w rozwoju oraz tworzeniu biofilmu nazębnego związanego z powstawaniem próchnicy oraz zwiększa zjadliwość biofilmu, ułatwiając utrzymywanie się kwaśnego środowiska w jamie ustnej poprzez uczestnictwo w tworzeniu pozakomórkowych matryc polisacharydowych [2, 4, 9, 10].

Pośród prozdrowotnych mikroorganizmów w jamie ustnej wymieniane są *Streptococcus salivarius*, *Bacilli*, *Actinomyces* oraz *Granulicatella*. *Streptococcus salivarius* jest jednym z pierwszych kolonizatorów jamy ustnej w życiu człowieka, wykazując podstawowe cechy umożliwiające wiązanie się z komórkami języka oraz nabłonkiem policzków, zanim pojawią się pierwsze zęby. Dzięki zdolności *S. salivarius* do syntezy saliwarycyny oraz stymulowaniu szlaków, m.in. interferonu I i II, jest w stanie konkurować z patogennym *S. mutans* i ograniczać jego rozwój, a co z tego wynika – również zmniejszać stany zapalne i przeciwdziałać postępowi chorób przyzębia oraz próchnicy. Przykładem innych probiotycznych szczepów jamy ustnej są *Streptococcus dentisani* oraz *Streptococcus A12*, które oddziałują pozytywnie poprzez metabolizm argininy, powodując zwiększenie kwaśnego pH wytwarzanego w biofilmach [2].

W związku z rozwojem świadomości ludzkiej na temat zdrowia oraz ekologii notuje się coraz większy odsetek prac badawczych o tematyce wykorzystywania probiotyków oraz ekstraktów naturalnych w walce z niepożądaną mikroflorą. Badania takie rozpoczęto również odnosząc się do mikroflory jamy ustnej – jako pierwszej niszy opisującej mikrobiom układu pokarmowego człowieka, ale również ze względu na coraz większe zapotrzebowanie na ekologiczne i organiczne produkty do higieny. W niniejszej pracy podjęto zatem próbę analizy możliwości zastosowania wyciągu z probiotycznych bakterii fermentacji mlekowej (LAB) jako czynnika funkcjonalnego o potencjalnym znaczeniu dla kształtowania mikrobiomu jamy ustnej w sposób ukierunkowany na rozwój mikroorganizmów pożytecznych kosztem mikroorganizmów wywołujących próchnicę.

2. Cel

Celem pracy była analiza selektywności oddziaływania przeciwdrobnoustrojowego wyciągu z fermentacji bakterii *Lactobacillus* oraz past (w tym pasty zawierającej wyciąg z fermentacji bakterii *Lactobacillus*) wobec *S. salivarius*, *S. mutans* i *C. albicans*. Badania zrealizowano w ramach prac badawczo-rozwojowych dotyczących nowego produktu w postaci pasty mikroorganizmowej o właściwościach funkcjonalnych ukierun-

kowanych na wspieranie prawidłowego rozwoju mikrobiomu jamy ustnej z jednoczesnym zapewnieniem właściwej higieny i pielęgnacji zębów i jamy ustnej. Przedstawione doświadczenie reprezentuje wyniki badań wstępnych prowadzonych w warunkach *in vitro* z zastosowaniem roztworów naśladowujących ślinę ludzką oraz szczepów wzrocowych w celu umożliwienia odtwarzania metodyki i przeprowadzania badań porównawczych przez innych autorów.

3. Materiały i metody

Do badań wykorzystano:

- Wyciąg z fermentacji bakterii *Lactobacillus* (L, otrzymany na substracie z melasy trzcinowej poddanej procesowi fermentacji mlekowej prowadzonemu w obecności probiotycznych szczepów z gatunków *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*; dzięki procesowi fermentacji otrzymany wyciąg nie zawierał cukru);
- pastę mikroorganizmiczną zawierającą wyciąg z fermentacji bakterii *Lactobacillus* (PM+L) o składzie: Calcium Carbonate, Glycerin, Lactobacillus Ferment, Aqua, Silica, Coco-Glucoside, Sodium Chloride, Stevia Rebaudiana Leaf Powder, Solum Diatomeae, Cetraria Islandica Extract, Camellia Sinensis Leaf, Extract, Aloe Barbadensis Leaf Juice Powder, Eugenia Caryophyllus Bud, Oil, Mentha Piperita Oil, Cinnamomum Zeylanicum Bark Oil, Xanthan Gum, Sodium Benzoate, Potassium Sorbate, Benzyl Alcohol, Limonene, Eugenol, Linalol, Cinnamal, składniki naturalnych olejków eterycznych;
- pastę mikroorganizmiczną zawierającą wyciąg z fermentacji bakterii *Lactobacillus* (PM-L) o składzie jak powyżej, zubożonym o *Lactobacillus ferment*;
- ogólnie dostępną pastę komercyjną (PK) o składzie: Aqua, Sorbitol, Hydrated Silica, Disodium Pyrophosphate, Sodium Lauryl Sulfate, Aroma, Sodium Hydroxide, Cellulose Gum, Sodium Saccharin, Sodium Fluoride, Carbomer, Mica, Limonene, CI 77891, Polysorbate 80, CI 42090;
- szczepy wskaźnikowe: *S. salivarius* DSM 20067, *S. mutans* DSM 20523, *C. albicans* ATCC 10231.

Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągu L wykonano techniką mikro-rozcieńczeń MIC (ang. *minimal inhibitory concentration*), MBC (ang. *minimal bactericidal concentration*) oraz MFC (ang. *minimal fungicidal concentration*) wykonano w płytce 96-dołkowej, stosując stężenia wyciągu L w gradiencie 3,125-50 μ l/100 μ l w bulionie BHI (dla *S. salivarius* oraz *S. mutans*) lub YM (dla *C. albicans*). Wartość pH układów doświadczalnych kształtowała się w zakresie 6,7-7,3. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze mikroaerofilnej (dla *S. salivarius* oraz *S. mutans*) lub niemodyfikowanej (dla *C. albicans*). Badanie wykonano w trzech powtórzeniach, a wyniki przeliczano na wartości średnie.

Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej past w odniesieniu do mikroorganizmów wskaźnikowych wykonano w cieście symulującym warunki panujące w jamie ustnej w warunkach *in vitro*, stosując procedurę PN-EN 1656:2019 (dla *S. salivarius* oraz *S. mutans*) oraz PN-EN 1657:2017 (dla *C. albicans*) z modyfikacjami. Sporządzano 10-krotne rozcieńczenie pasty do zębów w modelowym roztworze śliny [11] o końcowej objętości 10 ml. Dla każdego szczepu wskaźnikowego oraz czasu trwania ekspozycji (1 min, 2 min, 3 min, 10 min) sporządzano indywidualną zawiesinę i zakażano do

początkowej gęstości $7 \log_{10}$ jtk (w przypadku *S. salivarius* oraz *S. mutans*) lub $6 \log_{10}$ jtk (w przypadku *C. albicans*). Wszystkie procedury (sporządzanie zawiesin, zakażanie, ekspozycja) przeprowadzano w temperaturze $36,6^{\circ}\text{C}$ z zastosowaniem łaźni wodnej. Wartość pH układów doświadczalnych kształtowała się w zakresie 6,7-7,3. Próbkę przenoszono za pomocą pompy próżniowej na filtr membranowy $0,45 \mu\text{m}$, neutralizowano za pomocą bulionu Eugon, przemywano solą fizjologiczną, a następnie przenoszono z zestawu do filtracji na pożywki agarowe MITIS (dla *S. salivarius* oraz *S. mutans*) lub MALT (dla *C. albicans*). Płytki inkubowano w temperaturze 37°C w atmosferze mikroaerofilnej (dla *S. salivarius* oraz *S. mutans*) lub niemodyfikowanej (dla *C. albicans*). Badanie wykonano w trzech powtórzeniach, a wyniki przeliczano na wartości średnie.

Badanie oddziaływania past do zębów na adhezję *S. salivarius* oraz *S. mutans* wykonano w probówkach szklanych w bulionie BHI z 1% sacharozą [12]. Zawiesiny testowe zawierały stężenia pasty do zębów 10, 20, 30, 40 lub 50%. Populację komórek adhezyjnych odzyskiwano wg Duarte i in. (2003) [12], a detekcję wykonywano za pomocą cytometru przepływowego Guava easyCyte 8. Badanie wykonano w trzech powtórzeniach, a wyniki przeliczano na wartości średnie.

4. Wyniki

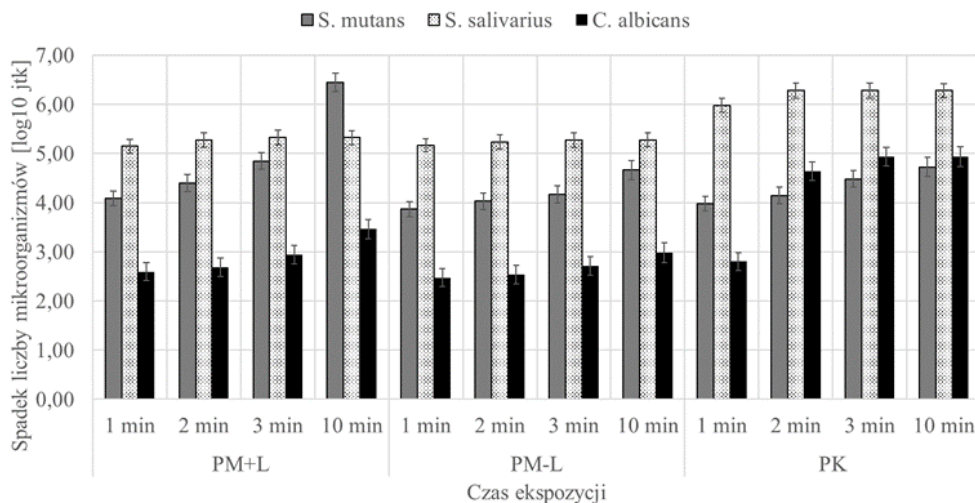
Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągu z fermentacji bakterii *Lactobacillus* (wyciąg L) wskazuje na wysoką aktywność ograniczającą i bójczą tego czynnika wobec *C. albicans* ATCC 10231 oraz *S. mutans* DSM 20523. Aktywność zaobserwowana w odniesieniu do tych szczepów jest silniejsza niż w odniesieniu do szczepu *S. salivarius* DSM 20067 (tab. 1). Znaczne różnice w występują pomiędzy stężeniem ograniczającym a bójczym.

Tabela 1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa wyciągu L wobec mikroorganizmów wskaźnikowych

	MIC	MBC	MFC
	$\mu\text{l}/100 \mu\text{l}$		
<i>S. salivarius</i> DSM 20067	9,375	25,0	NB
<i>S. mutans</i> DSM 20523	4,688	18,75	NB
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	3,125	NB	18,75

Źródło: opracowanie własne; NB – nie badano

Badanie aktywności przeciwdrobnoustrojowej past do zębów przeprowadzono w warunkach *in vitro* symulujących środowisko panujące podczas szczotkowania zębów. Przeprowadzono zatem również ocenę przeżywalności mikroorganizmów w doświadczeniu podczas czasu kontaktu drobnoustrojów wynoszącego 1, 2 i 3 minuty (jako czasy mogące mieć zastosowanie podczas rutynowego szczotkowania zębów) oraz wynoszącym 10 minut. Wyniki badań przeliczano do wielkości opisującej liczbę jtk obumierających podczas przeprowadzania doświadczenia. W odniesieniu do szczepu *S. mutans* DSM 20523 zaobserwowano wyższą śmiertelność przy kontakcie z pastą PM+L i śmiertelność w tym wariantcie była istotnie wyższa niż przy zastosowaniu pasty PM-L lub pasty PK w czasie kontaktu wynoszącego 3 i 10 minut i różniła się o ok. $0,5-1,2 \log_{10}$ jtk (wykres 1).

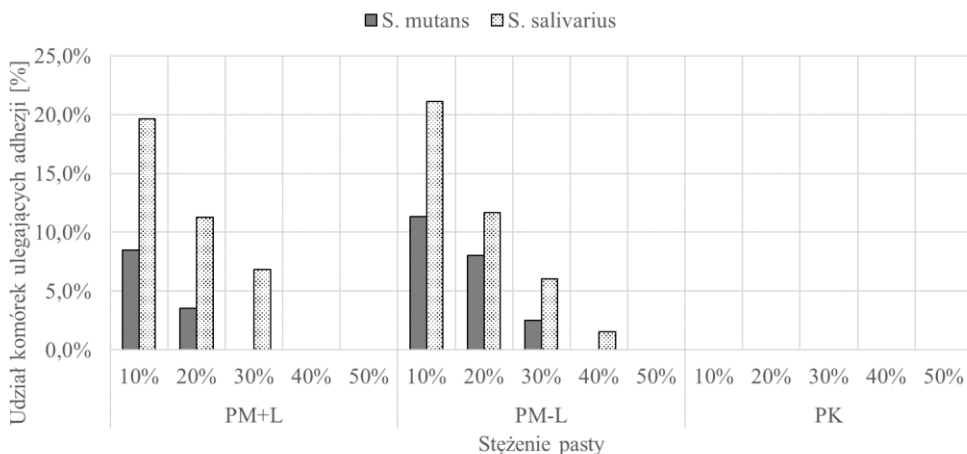


Wykres 1. Zmiana liczebności żywych komórek mikroorganizmów wskaźnikowych w zależności od czasu trwania ekspozycji na oddziaływanie past do zębów PM+L, PM-L oraz K. Źródło: opracowanie własne

Aktywność przeciwdrobnoustrojowa wobec *S. salivarius* DSM 20067 w warunkach *in vitro* symulujących środowisko jamy ustnej była jednakowa w przypadku ekspozycji na pastę PM+L i PM-L oraz nie była uzależniona od czasu trwania ekspozycji. Aktywność tych produktów wobec tego szczepu była niższa o ok. 1,0 log₁₀ jtk niż w przypadku ekspozycji szczepu na działanie pasty PK (wyk. 1).

Wrażliwość szczepu *C. albicans* ATCC 10231 była najniższa na oddziaływanie pasty PM-L i wzrastała wraz z zastosowaniem wyciągu z fermentacji bakterii *Lactobacillus* o ok. 0,5 lub 1,0 log₁₀ jtk wraz z czasem ekspozycji odpowiednio po 3 lub 10 minutach kontaktu. Znacznie wyższą drażliwość szczepu obserwowano przy zastosowaniu pasty PK i w tych wariantach była to jednocześnie najwyższa obserwowana aktywność przeciwdrobnoustrojowa (wyk. 1).

Oddziaływanie analizowanych past na zdolność do adhezji komórek do powierzchni gładkich (w eksperymencie – powierzchnie szklane) przeprowadzono w odniesieniu do szczepów *S. salivarius* DSM 20067 i *S. mutans* DSM 20523 jako wskaźników mikrobiomu jamy ustnej wykazującego naturalną zdolność do tworzenia biofilmów i adhezji do powierzchni szklanych zębów. Stosowanie pasty PK w każdym stężeniu zupełnie ograniczało występowanie zjawiska adhezji obu analizowanych szczepów. Pasty PM+L i PM-L również ograniczały adhezję szczepów wskaźnikowych, jednak zjawisko to było obserwowane w różnym stopniu i było pozytywnie skorelowane ze wzrostem stężenia produktu w eksperymencie. Pasty PM ograniczały adhezję szczepu *S. salivarius* DSM 20067 w mniejszym stopniu niż w przypadku szczepu *S. mutans* DSM 20523. Dodatkowe ograniczenie adhezji w przypadku tych produktów następowało wraz z zastosowaniem wyciągu z fermentacji bakterii *Lactobacillus* do recepturowania kosmetyku (wyk. 2).



Wykres 2. Zmiana liczebności żywych komórek mikroorganizmów wskaźnikowych wykazujących zdolność do adhezji do powierzchni szklanej, w zależności od stężenia past do zębów PM+L, PM-L oraz K.

Źródło: opracowanie własne

5. Dyskusja

Pośród dostępnej literatury brak jest jednoznacznej charakterystyki prawidłowego i nieprawidłowego mikrobiomu jamy ustnej, co jest związane z nadal niedostatecznym stopniem poznania pełnej bioróżnorodności mikroorganizmów zasiedlających to środowisko. Obecny stan wiedzy wskazuje pewnych przedstawicieli mikrobiomu jamy ustnej, których obecność jest niepożądana i powiązywana z występowaniem chorób zębów, przyzębia, dziąseł, ale również dolegliwości ze strony innych układów (np. pokarmowego, krążenia, nerwowego) [13, 14]. Gatunkiem zgodnie wskazywanym jako czynnik chorób jamy ustnej jest *S. mutans*, którego szczepy mają zdolność do tworzenia biofilmów na powierzchniach jamy ustnej oraz adhezji do powierzchni szklanej, uczestnicząc w powstawaniu płytki nazębnej i doprowadzając do rozwoju próchnicy [15]. Również drożdże *C. albicans* są opisywane jako czynnik etiologiczny chorób jamy ustnej [16]. Z kolei reprezentantem mikroflory pożytecznej są szczepy *S. salivarius* o zdolności do syntezy saliwarycyny o aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec *S. mutans* [17]. Ponadto szczepy *S. salivarius* w literaturze opisywane są jako bezpieczny, niepatogenny, dominujący w jamie ustnej gatunek zdolny do produkcji bakteriocyn o szerokim spektrum działania, co klasyfikuje go do roli idealnego kandydata do rozwoju jako modelowy probiotyk jamy ustnej [18, 19]. Szczep *S. salivarius* K12 jest przykładem szczepu skomercjalizowanego jako czynnik probiotyczny w suplementach diety [20, 21].

Szczotkowanie zębów i jamy ustnej powinno zapewnić ochronę przed procesami chorobowymi zębów i przyzębia. Mało jest jednak informacji na temat skuteczności tych zabiegów, kiedy skuteczność ta oceniana jest przez pryzmat oddziaływania na mikrobiom jamy ustnej i kształtowanie jego składu w kierunku mikrobiomu bogatego w mikroorganizmy – takie jak *S. salivarius* – z jednoczesnym ograniczeniem mikroorganizmów niepożądanych, takich jak *S. mutans* lub *C. albicans*. Nie brakuje jednak doniesień o aktywności przeciwdrobnoustrojowej pewnych czynników pochodzenia naturalnego analizowanych w testach dyfuzyjnych lub metodą mikrorozcieńczeń. Przykładem tak badanych czynników są wyciągi pochodzenia roślinnego, np. *Cudrania*

tricuspidata, *Sophora flavescens*, *Ginkgo biloba*, *Betula Schmidtii*, pośród których wyciąg z *S. flavescens* wykazuje znaczącą aktywność wobec szczepów *Streptococcus* występujących w formach wolnych, a w mniejszym stopniu wobec komórek występujących w postaci biofilmu [22]. Dodatkowo ekstrakty z *Notoginseng Radix*, *Perillae Herba* oraz *Psoraleae Semen* wykazują oddziaływanie ograniczające syntezę nierozpuszczalnych w wodzie glukanów wśród szczepów *S. mutans* [23].

W opisywanych badaniach podjęto próbę zastosowania wyciągu z fermentacji konsorcjum bakterii *Lactobacillus* – składnika otrzymywanego poprzez proces fermentacji mlekowej melasy trzcinowej w obecności probiotycznych gatunków *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Rola bakterii fermentacji mlekowej w mikrobiomie jamy ustnej i ich udział w stanie zdrowia jamy ustnej nie jest jednoznaczny. Zwraca się uwagę na fakt, że bakterie te przez swoją zdolność do fermentacji cukrów z wytworzeniem kwasów mogą przyczyniać się do zakwaszenia środowiska jamy ustnej i przez to mogą przyspieszać erozję szkliwa [4]. Z drugiej strony odnotowuje się jednak pozytywne skutki stosowania np. *Lactobacillus salivarius* w badaniach klinicznych ukierunkowanych na ocenę możliwości ograniczania takich przypadłości jak nieprzyjemny zapach z ust i halitoza [24], choroby przyzębia [25], rozwój niepożądanych mikroorganizmów (np. *Tannerella forsythia*) [26, 27]. Interesującym przypadkiem gatunku opisywanego jako czynnika z jednej strony mogącego przyczyniać się do pogarszania stanu zdrowia jamy ustnej lub wręcz odwrotnie – wspierania kondycji, jest *Lactobacillus acidophilus*. Gatunek ten na ogół opisywany jest jako czynnik sprawczy próchnicy zębów [28, 29]. Jednak nie brakuje doniesień o pozytywnych skutkach jego stosowania jako czynnika minimalizującego ryzyko próchnicy, kiedy jest stosowany np. jako probiotyczny składnik żywności, jak jogurt [30] lub lody [31]. Ponieważ rola żywych komórek *Lactobacillus* w kondycji jamy ustnej nie jest opisywana jednoznacznie, podjęto próbę zastosowania wyciągu w postaci płynu pofermentacyjnego z inaktywowanymi komórkami (niezawierającego cukru).

Przedstawione wyniki badań są pierwszym doniesieniem na temat możliwości wykorzystania wyciągu z fermentacji bakterii *Lactobacillus* w celu uzyskania efektu ukierunkowanego kształtowania mikrobiomu jamy ustnej. W badaniach zaobserwowano niższą aktywność wyciągu oraz pasty mikroorganizmicznej zawierającej wyciąg wobec *S. salivarius* DSM 20067 oraz wyższą aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec *S. mutans* DSM 20523 oraz *C. albicans* ATCC 10231. Wykazano znaczenie wyciągu z fermentacji bakterii *Lactobacillus* w wystąpieniu tego efektu. Otrzymane wyniki zachęcają do kontynuowania eksperymentu z użyciem kolejnych szczepów *S. salivarius*, u których potwierdzono probiotyczne oddziaływanie na zdrowie jamy ustnej. Wyniki tych badań wskazują zatem na korzystny efekt wynikający ze stosowania wyciągu jako alternatywy dla stosowania żywych komórek z rodzaju *Lactobacillus* oraz wskazują na możliwość zastosowania analizowanego wyciągu z fermentacji bakterii *Lactobacillus* jako składnika funkcjonalnego naturalnego pochodzenia o właściwości do kształtowania mikrobiomu jamy ustnej. Na podstawie uzyskanych wyników można przypuszczać, że analizowane substancje będą w podobny sposób wpływać na inne szczepy z gatunku *S. salivarius*, takie jak *S. salivarius* K12. W takim przypadku, znając rolę niektórych szczepów *S. salivarius* oraz *S. mutans* i *C. albicans* dla stanu zdrowia jamy ustnej, wykorzystywanie analizowanego wyciągu do recepturowania produktów przeznaczonych do

pielęgnacji i utrzymania prawidłowej higieny jamy ustnej dałoby możliwość stosowania preparatów celowanych, które nie wpływałyby znacząco na pożyteczną mikroflorę jamy ustnej, przy jednoczesnym silnym oddziaływaniu na mikroflorę chorobotwórczą. Opisanie oddziaływanie staje się pierwszą tak opisaną alternatywą dla past konwencjonalnych, których przykład zastosowano w niniejszej pracy do badań porównawczych, w tym przypadku oddziaływanie przeciwdrobnoustrojowe wykazuje odwrotny kierunek (wysoka aktywność wobec *S. salivarius* DSM 20067 i niższa aktywność wobec *S. mutans* DSM 20523 oraz *C. albicans* ATCC 10231).

6. Wnioski

Analizowany wyciąg z fermentacji bakterii *Lactobacillus* wykazuje aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec *S. salivarius* DSM 20067, *S. mutans* DSM 20523 i *C. albicans* ATCC 10231. Miara aktywności przeciwdrobnoustrojowej wyciągu z fermentacji bakterii *Lactobacillus* jest różna pomiędzy mikroorganizmami wskaźnikowymi i wskazuje na możliwość jego selektywnego oddziaływania w stopniu silniejszym wobec *S. mutans* DSM 20523 i *C. albicans* ATCC 10231 niż wobec *S. salivarius* DSM 20067. Zastosowanie wyciągu z fermentacji bakterii *Lactobacillus* do recepturowania pasty mikroorganizmicznej wzmaga aktywność przeciwdrobnoustrojową produktu wobec *S. mutans* DSM 20523 (równocześnie z ograniczeniem adhezji) oraz *C. albicans* ATCC 10231 i nie wpływa na dalsze ograniczenie liczebności *S. salivarius* DSM 20067.

Ponadto pasta mikroorganizmiczna z wyciągiem z fermentacji bakterii *Lactobacillus* w podobnym stopniu jak produkt konwencjonalny wpływa na liczebność *S. mutans* DSM 20523, natomiast w mniejszym stopniu wpływa na liczebność *S. salivarius* DSM 20067 i adhezję szczepu.

Zastosowanie wyciągu z fermentacji *Lactobacillus* do recepturowania pasty mikroorganizmicznej jest drogą umożliwiającą ukierunkowane oddziaływanie na rozwój *S. salivarius* kosztem *S. mutans* i *C. albicans* w jamie ustnej, a poznanie mechanizmu i zależności tego zjawiska wymaga dalszych badań z zastosowaniem szerszego zestawu mikroorganizmów, w tym szczepów wyizolowanych z jamy ustnej, oraz z uwzględnieniem czynników różnicujących tj. płeć, wiek, stan zdrowia, mikroflora towarzysząca.

Literatura

1. Deo P.N., Deshmukh R., *Oral microbiome. Unveiling the fundamentals*, Journal of Oral and Maxillofacial Pathology, 23(1), 2019, s. 122-128.
2. Willis J.R., Gabaldón T., *The human oral microbiome in health and disease: from sequences to ecosystems*, Microorganisms, 8(2), 2020, s. 308-336.
3. Escapa I.F., Chen T., Huang Y., Gajare P., Dewhirst F.E., Lemon K.P., *New insights into human nostril microbiome from the expanded human oral microbiome database (eHOMD)A resource for the microbiome of the human aerodigestive tract*, mSystems, 3(6), 2018.
4. Sedghi L., DiMassa V., Harrington A., Lynch S.V., Kapila Y.L., *The oral microbiome. Role of key organisms and complex networks in oral health and disease*, Periodontology 2000, 87(1), 2021, s. 107-131.
5. Zaura E., Nicu E.A., Krom B.P., Keijsers B.J., *Acquiring and maintaining a normal oral microbiome. Current perspective*, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 4, 2014, s. 85-92.
6. Wade W.G., *The oral microbiome in health and disease*, Pharmacological Research, 69, 2013, s. 137-143.

7. Wilson M., *Bacteriology of humans an ecological perspective*, Blackwell Publishing, Hoboken, NJ, USA, 2008.
8. Laubichler M.D., Renn J., *Extended evolution. A conceptual framework for integrating regulatory networks and niche construction*, Journal of Experimental Zoology, Part B: Molecular and Developmental Evolution, 324, 2015, s. 565-577.
9. Dhakal A., Sundaram S., Rajesh V., John R., Rajan A.P., *Comparative antimicrobial efficacy study of different commercially available toothpaste in India. An in vitro study*, DRC Sustainable Future, Journal of Environment, Agriculture and Energy, 2(2), 2020, s. 122-131.
10. Alp S., Baka Z.M., *Effects of probiotics on salivary Streptococcus mutans and Lactobacillus levels in orthodontic patients*, American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 154(4), 2018, s. 517-523.
11. Sarkar A., Feng X., Seunghwan L., *Human saliva and model saliva at bulk to adsorbed phases—similarities and differences*, Advances in Colloid and Interface Science, 273, 2019, s. 1020-1034.
12. Duarte S., Koo H., Bowen W.H., Hayacibara M.F., Cury J.A., Ikegaki M., Rosalen P.L., *Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci*, Biological and Pharmaceutical Bulletin, 26(4), 2003, s. 527-531.
13. He J., Li Y., Cao Y., Xue J., Zhou X., *The oral microbiome diversity and its relation to human diseases*, Folia Microbiologica, 60(1), 2015, s. 69-80.
14. Sampaio-Maia B., Caldas I.M., Pereira M.L., Pérez-Mongiovi D., Araujo R. *The oral microbiome in health and its implication in oral and systemic diseases*, Advances in Applied Microbiology, 97, 2016, s. 171-210.
15. Lemos J.A., Palmer S.R., Zeng L., Wen Z.T., Kajfasz J.K., Freires I.A., Abranches J., Brady L.J., *The biology of Streptococcus mutans*, Microbiology Spectrum, 7(1), 2019, s. 7-10.
16. Di Cosola M., Cazzolla A.P., Charitos I.A., Ballini A., Inchingolo F., Santacroce, L., *Candida albicans and oral carcinogenesis. A brief review*, Journal of Fungi, 7(6), 2021, s. 476.
17. Burton J.P., Chilcott C.N., Moore C.J., Speiser G., Tagg J.R., *A preliminary study of the effect of probiotic Streptococcus salivarius K12 on oral malodour parameters*, Journal of Applied Microbiology, 100(4), 2006, s. 754-764.
18. Wescombe F.A., Heng N.C.K., Burton J.P., Chilcott C.N., Tagg J.R., *Streptococcal bacteriocins and the case for Streptococcus salivarius as model oral probiotics*, Future Microbiology, 4(7), 2009, s. 819-835.
19. Santagati M., Scillato M., Patane F., Aiello C., Stefani S., *Bacteriocin-producing oral streptococci and inhibition of respiratory pathogens*, FEMS Immunology & Medical Microbiology, 65(1), 2012, s. 23-31.
20. Wescombe P.A., Hale J.D., Heng N.C., Tagg J.R., *Developing oral probiotics from Streptococcus salivarius*, Future Microbiology, 7(12), 2012, s. 1355-1371.
21. Burton J.P., Wescombe P.A., Moore C.J., Chilcott C.N., Tagg J.R., *Safety assessment of the oral cavity probiotic Streptococcus salivarius K12*, Applied and Environmental Microbiology, 72(4), 2006, s. 3050-3053.
22. Lee S.H., *Antimicrobial effects of herbal extracts on Streptococcus mutans and normal oral streptococci*, Journal of Microbiology, 51(4), 2013, s. 484-489.
23. Yim N.H., Jung Y.P., Cho W.K., Kim T., Kim A., Im M., Ma J.Y., *Screening of aqueous extracts of medicinal herbs for antimicrobial activity against oral bacteria*, Integrative Medicine Research, 2(1), 2013, s. 18-24.
24. Iwamoto T., Suzuki N., Tanabe K., Takeshita T., Hirofuji T., *Effects of probiotic Lactobacillus salivarius WB21 on halitosis and oral health: an open-label pilot trial*, Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology, 110(2), 2010, s. 201-208.

25. Shimauchi H., Mayanagi G., Nakaya S., Minamibuchi M., Ito Y., Yamaki K., Hirata H., *Improvement of periodontal condition by probiotics with Lactobacillus salivarius WB21. A randomized, double-blind, placebo-controlled study*, Journal of Clinical Periodontology, 35(10), 2008, s. 897-905.
26. Mayanagi G., Kimura M., Nakaya S., Hirata H., Sakamoto M., Benno Y., Shimauchi H., *Probiotic effects of orally administered Lactobacillus salivarius WB21-containing tablets on periodontopathic bacteria: a double-blinded, placebo-controlled, randomized clinical trial*, Journal of Clinical Periodontology, 36(6), 2009, s. 506-513.
27. Pham L.C., van Spanning R.J., Röling W.F., Prosperi A.C., Terefework Z., Jacob M., Zaura E., *Effects of probiotic Lactobacillus salivarius W24 on the compositional stability of oral microbial communities*, Archives of Oral Biology, 54(2), 2009, s. 132-137.
28. Zhang S., *Dental caries and vaccination strategy against the major cariogenic pathogen, Streptococcus mutans*, Current Pharmaceutical Biotechnology, 14(11), 2013, s. 960-966.
29. Ajagannanavar S.L., Battur H., Shamarao S., Sivakumar V., Patil P.U., Shanavas P., *Effect of aqueous and alcoholic licorice (glycyrrhiza glabra) root extract against streptococcus mutans and lactobacillus acidophilus in comparison to chlorhexidine. An in vitro study*, Journal of International Oral Health, 6(4), 2014, s. 29-34.
30. Bafna H.P., Ajithkrishnan C.G., Kalantharakath T., Singh R.P., Kalyan P., Vathar J.B., Patel H.R., *Effect of short-term consumption of amul probiotic yogurt containing Lactobacillus acidophilus La5 and Bifidobacterium lactis Bb12 on salivary Streptococcus mutans count in high caries risk individuals*, International Journal of Applied and Basic Medical Research, 8(2), 2018, s. 111-115.
31. Singh R., Damle S.G., Chawla A., *Salivary mutans streptococci and lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing Bifidobacterium lactis Bb12 and Lactobacillus acidophilus La5*, Acta Odontologica Scandinavica, 69(6), 2011, s. 389-394.

Rola wyciągu z fermentacji bakterii *Lactobacillus* w kształtowaniu cech funkcjonalnych pasty mikroorganizmicznej

Streszczenie

Jama ustna jest siedliskiem mikroorganizmów takich jak *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium sp.*, *Candida albicans* – powiązanych z procesami m.in. powstawania płytki i kamienia nazębnego, próchnicy, powstawaniem nieprzyjemnego zapachu. W jamie ustnej pożądana jest obecność szczepów *Streptococcus salivarius* jako naturalnego czynnika ograniczającego liczebność *S. mutans*. Celem pracy była weryfikacja mikroorganizmicznej pasty do zębów zawierającej składniki funkcjonalne (*Lactobacillus ferment*), której stosowanie będzie sprzyjać rozwojowi *S. salivarius* i ograniczać rozwój *S. mutans* oraz *C. albicans*. Analizę skuteczności działania przeprowadzono w doświadczeniach *in vitro*, oceniając wpływ kosmetyku na liczebność mikroorganizmów wskaźnikowych oraz zdolność do adhezji *Streptococcus* do powierzchni szklanej. Wyniki odnoszono do wariantu zubożonego o składnik funkcjonalny oraz do produktu konwencjonalnego, szeroko dostępnego na rynku. Wyniki doświadczeń potwierdziły właściwości selektywnego oddziaływania mikroorganizmicznej pasty wobec mikroorganizmów wskaźnikowych: wyższa wrażliwość *S. mutans*, którego liczebność spada wraz z wydłużaniem czasu kontaktu, a zdolność do adhezji zanika przy 30% stężeniu produktu mikroorganizmicznego, a także niższa wrażliwość *S. salivarius*, którego liczebność zmniejsza się w mniejszym stopniu niż w przypadku ekspozycji na produkt konwencjonalny, a zdolność do adhezji zanika przy 40% stężeniu produktu mikroorganizmicznego.

Słowa kluczowe: jama ustna, mikrobiom, wyciąg z bakterii *Lactobacillus*, pasta do zębów, aktywność przeciwdrobnoustrojowa

The contribution of *Lactobacillus* ferment in developing the functional proprieties in microorganic toothpaste

Abstract

The oral cavity is a habitat of microorganisms such as *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella melaninogenica*, *Fusobacterium sp.*, *Candida albicans* related to the processes of formation of dental plaque and tartar, caries, unpleasant odor. In the oral cavity, the presence of *Streptococcus salivarius* strains is desirable as a natural limiting factor for *S. mutans*. The aim of the study was to verify the microorganic toothpaste containing functional ingredients (*Lactobacillus* ferment), the use of which will promote the development of *S. salivarius* and limit the development of *S. mutans* and *C. albicans*. The effectiveness test was carried out in *in vitro* experiments, assessing the effect of the cosmetic on the number of indicator microorganisms and the adhesion ability of *Streptococcus* to the glass surface. The results were compared to the variant depleted by the functional ingredient as well to conventional product, widely available on the market. The results confirmed the properties of the selective action of the microorganic toothpaste against indicator microorganisms: higher sensitivity of *S. mutans*, the number of which decreases with increasing contact time, and the adhesion capacity disappears at 30% concentration of the microorganic product; and lower sensitivity of *S. salivarius*, the number of which decreases in less extend than when exposed to a conventional product, and the adhesive capacity is lost at 40% concentration of the microorganic product.

Keywords: oral cavity, microbiome, *Lactobacillus* ferment, toothpaste, antimicrobial activity

Udział bakterii jelitowych w regulacji masy ciała

1. Wprowadzenie

Przewód pokarmowy człowieka zamieszkuje ponad tysiąc gatunków bakterii. U zdrowych dorosłych osób większość mikrobioty stanowią jednak bakterie należące do dwóch typów: *Firmicutes* (głównie *Clostridium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*) oraz *Bacteroidetes* (przede wszystkim *Bacteroides* i *Prevotella*) [1, 2]. Mikrobiota jelitowa wpływa na organizm gospodarza, uczestnicząc między innymi w regulacji procesu odżywiania, wchłaniania, metabolizmu, trawienia, produkcji witamin oraz modulacji odporności [3, 4]. Wpływ bakterii jelitowych na organizm gospodarza nie zawsze jednak jest pozytywny i zależy zarówno od rodzaju, jak i liczebności bakterii tworzących mikrobiotę. Zmniejszenie różnorodności bakteryjnej lub/ oraz zmiana składu polegająca na ograniczonej liczebności pożytecznych mikroorganizmów i jednocześnie wzroście liczebności patobiontów (dysbioza) opisano w przebiegu takich chorób jak: cukrzyca [5], choroby układu krążenia [6], zespół jelita drażliwego [7] oraz rak jelita grubego [8]. Dysbiozę jelitową zaobserwowano również w przebiegu zaburzeń depresyjnych, lękowych [9, 10], demencji [11, 12] oraz w chorobach przebiegających z osłabieniem procesów poznawczych [13]. Ponadto przeprowadzone w ciągu ostatnich kilku lat badania wykazały także różnice w składzie mikrobioty jelitowej u osób otyłych w porównaniu z osobami o prawidłowej masie ciała [14-16].

Celem pracy jest wykazanie udziału bakterii jelitowych w regulacji masy ciała oraz opisanie mechanizmów, poprzez które bakterie jelitowe mogą wpływać na masę ciała gospodarza.

2. Masa ciała a skład mikrobioty

W 2006 roku zespół naukowców pod kierownictwem Ley'a – w badaniach z wykorzystaniem myszy genetycznie otyłych (ob/ob) oraz myszy z prawidłową masą ciała – wykazał różnice w składzie mikrobioty jelitowej pomiędzy tymi osobnikami. U myszy otyłych w porównaniu z osobnikami o prawidłowej masie ciała zaobserwowano obniżenie liczebności bakterii należących do *Bacteroidetes* (o około 50%) i proporcjonalny wzrost liczebności bakterii należących do *Firmicutes*. Przeprowadzone w kolejnych latach badania na zwierzętach potwierdziły występowanie różnic w składzie mikrobioty jelitowej u osobników otyłych w porównaniu z osobnikami o prawidłowej masie ciała i wykazały, że u zwierząt dysbioza najczęściej polega na wzroście liczebności bakterii typu *Firmicutes* w stosunku do bakterii należących do *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* oraz *Proteobacteria* [15, 16]. Udział bakterii jelitowych w regulacji masy ciała udowodniły badania, podczas których wykonywano przeszczep mikrobioty jelitowej od myszy otyłych do myszy typu *germ-free* (pozbawione patogenów), wywołując w ten sposób wzrost masy ciała u jałowych, jak dotąd, osobników [17]. Wyniki z badań przeprowadzonych na ludziach nie są tak jednoznaczne jak te, które pochodzą z badań

¹ blanka.dwojaczny@cm.umk.pl, Katedra Fizjologii Człowieka, Wydział Lekarski, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy, UMK w Toruniu.

na modelu zwierzęcym. Jednak mimo to większość dotychczas przeprowadzonych eksperymentów potwierdza różnice w składzie mikrobioty u osób z prawidłową masą ciała w porównaniu z osobami otyłymi [18-20]. U osób otyłych, podobnie jak u otyłych zwierząt, zaobserwowano redukcje liczebności Gram-ujemnych bakterii typu *Bacteroidetes* i jednocześnie wzrost bakterii Gram-dodatnich *Firmicutes* [15, 21, 22]. Zaobserwowano także, że zmiany w składzie mikrobioty dotyczą bakterii rodzaju *Lactobacillus*, a szczególnie wyższej liczebności *Lactobacillus reuteri* i *Lactobacillus gasseri* oraz zmniejszonej liczebności *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* i *Bifidobacterium* [23]. U osób otyłych wykazano także zwiększoną liczebność *Staphylococcus aureus* [19, 24-26]. Wzrost liczebności *Firmicutes* w stosunku do *Bacteroides* to najczęściej opisywana zmiana w mikrobiocie zarówno otyłych ludzi, jak i otyłych zwierząt, jednak w zależności od sposobu żywienia, przyczyn wzrostu masy ciała oraz od poziomu nadwagi lub otyłości obserwuje się także różnice w składzie mikrobioty również wśród otyłych. Różnice te najczęściej dotyczą zmian na poziomie gatunku. Na przykład w przeprowadzonych dotychczas badaniach zaobserwowano, że u otyłych ciężarnych kobiet wzrasta liczebność *Bacteroides*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* oraz *Escherichia coli*. U kobiet z nadwagą zaobserwowano natomiast wzrost *Escherichia coli*, *Staphylococcus* i jednocześnie obniżenie liczebności *Bifidobacterium* oraz *Akkermansia muciniphila*. W innych badaniach zaobserwowano, że niewielki wzrost masy ciała koreluje ze wzrostem liczebności *Clostridium* oraz *Bifidobacterium* [22, 24]. Oprócz różnic w liczebności określonych typów bakterii (głównie *Bacteroides* oraz *Firmicutes*) u osób otyłych zazwyczaj obserwuje się także zmniejszoną różnorodność bakterii (w porównaniu z osobami z prawidłową masą ciała) [16, 21, 27, 28]. Trudno jednoznacznie wskazać, co jest przyczyną dysbiozy jelitowej u osób otyłych, jednak jednym z najważniejszych czynników wpływających na skład mikrobioty jest rodzaj stosowanej diety. Na obserwowany w otyłości wzrost liczebności *Firmicutes* duży wpływ wydaje się mieć dieta wysokotłuszczowa oraz dieta bogata w węglowodany proste [16, 17, 29-32]. Oddziaływanie diety na skład mikrobioty potwierdzają badania, które wykazują, że utrata masy ciała wynikająca ze zmiany w sposobie odżywiania wpływa także pozytywnie na skład mikrobioty (wzrost liczebności *Bacteroides*) [26, 33].

3. Potencjalne mechanizmy wpływu bakterii jelitowych na masę ciała

Przeprowadzone dotychczas badania jednoznacznie wykazały udział bakterii jelitowych w regulacji masy ciała [15, 16]. Mechanizmy, poprzez które bakterie jelitowe mogą wpływać na masę ciała gospodarza, nie są jednak jeszcze dobrze poznane i opisane. Obecnie proponuje się kilka mechanizmów wyjaśniających udział bakterii jelitowych w rozwoju otyłości, z których dwa najważniejsze to zmiana metabolizmu gospodarza i/lub rozwój stanu zapalnego. Do zmiany metabolizmu gospodarza może dochodzić na kilka sposobów. Po pierwsze, może ona wynikać z tego, że pewne gatunki bakterii mają większą od innych zdolność do pozyskiwania energii z pożywienia, co sprzyja syntezie i gromadzeniu triglicerydów oraz wzrostowi zawartości tkanki tłuszczowej w organizmie gospodarza. Oprócz zwiększonego wchłaniania (głównie monosacharydów) obserwuje się także rozwój nabłonka jelitowego i zwiększenie gęstości kosmków jelitowych [34, 35]. Po drugie, bardzo duży wpływ na masę ciała wydają się mieć różne metabolity produkowane przez bakterie jelitowe [36, 37]. Zalicza się do nich między innymi powstałe w reakcji fermentacji węglowodanów krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe

(SCFAs, ang. *short-chain fatty acids*) takie jak: kwas octowy, masłowy, izomasłowy, mrówkowy oraz propionowy. Mechanizm działania SCFAs polega głównie na łączeniu się ich z receptorami na powierzchni komórek (neutrofilii, makrofagów, dendrytów), co z kolei prowadzi do wytwarzania cytokin (np. IL-18, IL-22), przeciwciał IgA oraz hormonów zaangażowanych w regulację metabolizmu, w tym także regulację łaknienia. Ponadto krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe wpływają na czynniki transkrypcyjne (CHREBP oraz SREBP1), a to prowadzi do indukcji procesu lipogenezy i wzrostu poziomu zmagazynowanych w tkance tłuszczowej triglicerydów. Na akumulację triglicerydów działa także inhibicyjny wpływ SCFAs na białko FIAF (czynnik tkankowy indukowany głodem), co hamuje aktywność lipazy lipoproteinowej i jednocześnie obniża uwalnianie hormonów regulujących łaknienie, takich jak: peptyd glukagonopodobny-1 (GLP-1, ang. *glucagon-like peptide 1*) oraz peptyd tyrozyna-tyrozyna (PYY, ang. *peptide YY*) [38-42]. Tak więc krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe uczestniczą w sygnalizacji procesów metabolizmu lipidów, glukozy i cholesterolu, w regulacji procesów zapalnych jelit oraz w regulacji procesów łaknienia. Wykazano, że całkowite stężenie SCFAs u osób otyłych jest wyższe w porównaniu z osobami o prawidłowej masie ciała, przy czym największy wzrost stężenia dotyczy kwasu octowego, a następnie kwasu propionowego oraz masłowego. Ponadto zaobserwowano pozytywną korelację pomiędzy stężeniem kwasu octowego oraz bakteriami *Streptococcus*, *Coprococcus*, *Dorea*, *Roseburia* oraz negatywną z bakteriami *Oscillibacter*. Kwas propionowy natomiast jest dodatnio skorelowany z bakteriami *Collinsella* i *Roseburia*, a ujemnie z bakteriami *Alistipes* oraz *Oscillibacter* [43]. Drugim opisywanym w literaturze mechanizmem, poprzez który bakterie jelitowe mogą wpływać na rozwój otyłości, jest wzrost w organizmie gospodarza ogólnoustrojowego stanu zapalnego, zwanego metaboliczną endotoksemią. Do rozwoju stanu zapalnego prowadzi natomiast wzrost poziomu endotoksyn LPS (liposacharydy, ang. *lipopolysaccharides*), które stanowią składnik błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych. Zwiększenie liczebności tych bakterii jest opisywane między innymi u osób stosujących dietę wysokotłuszczową, prowadzi do nasilonej przepuszczalności jelit oraz wzrostu poziomu LPS w osoczu. Metaboliczna endotoksemia wpływa na powstawanie zaburzeń metabolicznych w całym organizmie, a przez to odgrywa istotną rolę w rozwoju otyłości [44].

4. Rola probiotyków w regulacji masy ciała

Wyniki badań z wykorzystaniem modelu zwierzęcego oraz badania przeprowadzone na ludziach wskazują na korzystny wpływ wybranych probiotyków (głównie bakterii należących do *Firmicutes*) na regulację masy ciała. Doświadczenia na zwierzętach wykazały między innymi, że kilkunastotygodniowa (zwykle 12-14 tygodni) suplementacja myszy bakteriami *Lactobacillus curvatus* oraz *Lactobacillus plantarum* wpływa na redukcję tkanki tłuszczowej, spadek poziomu cholesterolu w osoczu oraz w wątrobie, obniżenie poziomu cytokin prozapalnych, a także obniżenie poziomu ekspresji genów enzymów zaangażowanych w syntezę kwasów tłuszczowych [45, 46]. Redukcję masy ciała zaobserwowano także w wyniku suplementacji *Lactobacillus reuteri* [47], *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* [48, 49]. Podobny, korzystny wpływ na masę ciała obserwowano po zastosowaniu suplementacji *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium longum* [50], *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium breve* [51, 52] oraz *Bacteroides uniformis* [53]. W przeprowadzonych

badaniach zmniejszeniu masy ciała często towarzyszyło obniżenie insulinooporności, spadek ciśnienia krwi, poprawa gospodarki lipidowej oraz poprawa poziomu glukozy.

Badania na ludziach przede wszystkim potwierdziły wpływ *Lactobacillus gasseri* na spadek masy ciała, ograniczenie objętości tkanki tłuszczowej oraz zmniejszenie obwodu bioder i talii [54, 55]. Obniżenie wskaźnika masy ciała (BMI, ang. *body mass index*) oraz zawartości tkanki tłuszczowej uzyskano także podczas kilkutygodniowej kuracji *Lactobacillus plantarum* [56], *Lactobacillus acidophilus* [57] oraz *Lactobacillus rhamnosus* [58]. Natomiast podawanie *Lactobacillus fermentum* oraz *Lactobacillus amylovorus* wpłynęło na obniżenie zawartości tkanki tłuszczowej bez zmian w masie ciała [59]. Podobnie jak w przypadku modelu zwierzęcego, w badaniach na ludziach czas suplementacji bakteriami wynosił zwykle 6-12 tygodni. Poza zmianami dotyczącymi masy ciała i zawartości tkanki tłuszczowej zaobserwowano, że 6-tygodniowa suplementacja preparatem zawierającym *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidum* oraz *Lactobacillus casei* doprowadziła do obniżenia poziomu triglicerydów oraz poziomu interleukiny 6 [60]. Co istotne, zarówno w badaniach na zwierzętach, jak i na ludziach wpływ probiotyków na masę ciała był niezależny od rodzaju stosowanej diety [45-47, 50].

5. Podsumowanie

Na podstawie wyników dotychczas przeprowadzonych badań trudno jest jednoznacznie opisać profil mikrobioty charakterystyczny dla osób otyłych. Niemniej jednak skład i różnorodność mikrobioty u otyłych zwierząt i ludzi jest inny niż u osób/osobników z prawidłową masą ciała. Przede wszystkim różnica polega na zmianie stosunku bakterii typu *Firmicutes* względem *Bacteroidetes*. Dysbioza jelitowa może bezpośrednio wpływać na zdolność organizmu do gromadzenia tkanki tłuszczowej i tym samym przyczyniać się do rozwoju otyłości. Udział bakterii jelitowych w powstawaniu otyłości wydają się potwierdzać badania, w których podawanie odpowiednich probiotyków wpływa na zmniejszenie masy ciała.

Literatura

1. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K., Rman D.A., *Diversity of the human intestinal microbial flora*, Science, 308, 2005, s. 1635-1638.
2. O'Hara A., Shanahan F., *The gut flora as a forgotten organ*, EMBO Reports, 7, 2006, s. 688-693.
3. Sekirov I., Russell S., Antunes L., Finlay B., *Gut microbiota in health and disease*, Physiological Reviews, 90, 2010, s. 859-904.
4. Tuddenham S., Sears C.L., *The intestinal microbiome and health*, Current Opinion in Infections Disease, 28, 2015, s. 464-470.
5. Qin J., Li Y., Cai Z., Li S., Zhu J., Zhang F., Liang S., Zhang W., Guan Y., Shen D., Peng Y., Zhang D., Jie Z., Wu W., Qin Y., Xue W., Li J., Han L., Lu D., Wu P., Dai Y., Sun X., *A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes*, Nature, 4, 2012, s. 55-60.
6. Blumberg R., Powrie F., *Microbiota, disease, and back to health. A metastable journey*, Science Translational Medicine, 4, 2012, s. 137.
7. Ghoshal U.C., Shukla R., Ghoshal U., Gwee K., Ng S.C., Quigley E., *The gut microbiota and irritable bowel syndrome: friend or foe?*, International Journal of Inflammation, 22, 2012.

8. Tilg H., Adolph T.E., Gerner R.R., Moschen A.R., *The intestinal microbiota in colorectal cancer*, Cancer Cell, 33, 2018, s. 954-964.
9. Naseribafrouei A., Hestad K., Avershina E., Sekelija M., Linlokken A., Wilson R., Rudi K., *Correlation between the human fecal microbiota and depression*, Neurogastroenterology & Motility, 26, 2014, s. 1155-1162.
10. Jiang H., Ling Z., Zhang Y., Mao H., Ma H., Yin Y., Wang W., Tang W., Tan Z., Shi J., Li L., Ruan B., *Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder*, Brain, Behavior and Immunity, 48, 2015, s. 86-194.
11. Nagpal R., Neth B.J., Wang S., Craft S., Yadav H., *Modified Mediterranean-ketogenic diet modulates gut microbiome and short-chain fatty acids in association with Alzheimer's disease markers in subjects with mild cognitive impairment*, EBioMedicine, 47, 2019, s. 529-542.
12. Vogt N.M., Kerby R.L., Dill-McFarland K.A., Harding S.J., Merluzzi A.P., Johnson S.C., Carlsson C.M., Asthana S., Blennow K., Bendelin B.B., Rey F.E., *Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease*, Scientific Reports, 7, 2017, s. 13537.
13. Cattaneo A., Cattane N., Galluzzi S., Provasi S., Lopizzo N., Festari C., Guerra U.P., Paghera B., Muscio C., Bianchetti A., Volta G.D., Turla M., Cotelli M.S., Gennuso M., Prella A., Zanetti O., Lussignoli G., Mirabile D., Bellandi D., Gentile S., Belotti G., Villani D., Harach T., Bolmont T., Padovani A., Boccardi M., Frisoni G.B., *Association of brain amyloidosis with pro-inflammatory gut bacterial taxa and peripheral inflammation markers in cognitively impaired elderly*, Neurobiology of Aging, 49, 2017, s. 60-68.
14. Moreno-Indias I., Cardona F., Tinahones F.J., Queipo-Ortuno M.I., *Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus*, Frontiers in Microbiology, 5, 2014, s. 1-10.
15. Ley R.E., Backhed F., Turnbaugh P., Lozupone C.A., Knight R.D., Gordon J.L., *Obesity alters gut microbial ecology*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 102, 2005, s. 11070-11075.
16. Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R., Gordon J.L., *An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest*, Nature, 444, 2006, s. 1027-1031.
17. Turnbaugh P.J., Backhed F., Fulton L., Gordon J.L., *Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome*, Cell Host and Microbiome, 3, 2008, s. 213-223.
18. Duncan S.H., Lobley G.E., Holtrop G., Ince J., Johnstone A.M., Louis P., Flint H.J., *Human colonic microbiota associated with diet, obesity, and weight loss*, International Journal of Obesity, 32, 2008, s. 1720-1724.
19. Zhang H., di Baise J.K., Zuccolo A., Kudma D., Braidotti M., Yu Y., Parameswaran P., Crowel M.D., Wing R., Rittmann B.E., Krajmalnik Brown R., *Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 106, 2009, s. 2365-2370.
20. Shwartz A., Tars D., Schafer K., Beijer S., Bos N.A., Donus C., Hardt P.D., *Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects*, Obesity, 18, 2010, s. 190-195.
21. Armougom F., Henry M., Vialettes B., Raccach D., Raoult D., *Monitoring bacterial community of human gut microbiota reveals an increase in Lactobacillus in obese patients and Methanogens in anorexic patients*, PLoS One, 4, 2009, s. 7125.
22. Santacruz A., Collado M.C., Garcia Valdes I., Segura M.T., Martin Lagos J.A., Anjos T., Marti Romero M., Lopez R.M., Florido J., Campoy C., Sanz Y., *Gut microbiota composition is associated with body weight, weight gain and biochemical parameters in pregnant women*, British Journal of Nutrition, 104, 2010, s. 83-92.

23. Million M., Angelakis E., Paul M., Armougom F., Leibovici L., Raoult D., *Comperative meta-analysis of the effect of Lactobacillus species on weight gain in human and animals*, Microbial Pathogenesis, 53, 2012, s. 100-108.
24. Collado M.C., Isolauri E., Laitinen K., Salminen S., *Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women*, The American Journal of Clinical Nutrition, 88, 2008, s. 894-899.
25. Kalliomaki M., Collado M.C., Salminen S., Isolauri E., *Early differences in fecal microbiota composition in children may predict overweight*, The American Journal of Clinical Nutrition, 87, 2008, s. 534-538.
26. Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.L., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*, Nature, 444, 2006, s. 1022-1023.
27. Muscogiuri G., Cantone E., Cassarano S., Tuccinardi D., Barrea L., Savastano S., Colao A., *Gut microbiota: a new path to treat obesity*, Int J Obes, 9, 2019, s. 10-19.
28. Le Chatelier E., Nielsen T., Qin J., Prifti E., Hildebrand F., Falony G., Almeida M., Arumugam J.M., Batto S., Kennedy P., Leonard J., Li K., Burgdorf N., Grarup T., Nielsen A.S., Juncker M., Bertalan F., Levenez N., Pons S., Rasmussen S., Sunagawa J., Tap S., Times E.G., Brunak K., Clement J., Dore M., Wang S.D., Ehrlich O., *Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers*, Nature, 500, 2013, s. 541-546.
29. Murphy E.F., Cotter P.D., Healy S., Marques T.M., O'Sullivan O., Fouhy F., Clarke S.F., O'Toole P.W., Quigley E.M., Stanton C., Ross P.R., O'Doherty R.M., Shanohan F., *Composition and energy harvesting capacity of gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models*, Gut, 59, 2010, s. 1635-1642.
30. de La Serre C.B., Ellis C.I., Lee J., Hartman A.L., Rutledge J.C., Raybould H.E., *Propensity to high -fat diet induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation*, American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver, 299, 2010, s. 440-448.
31. Kim K.A., Gu W., Lee L.A., Jon E.H., Kim D.H., *High fat diet-induced gut microbiota exacerbates inflammation and obesity in mice via the TLR 4 signaling pathway*, PLoS One, 7, 2012, s. 47713.
32. Kim M.S., Hwang S.S., Park E.J., Bae J.W., *Strict vegetarian diet improves the risk factors associated with metabolic diseases by modulating gut microbiota and reducing intestinal inflammation*, Environmental Microbiology Reports, 5, 2013, s. 765-775.
33. Hildebrandt M.A., Hoffmann C., Sherrill-Mix S.A., Keilbaugh S.A., Hamady M., Chen Y.Y., Knight R., Ahima R.S., Bushman F., Wu G.D., *High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity*, Gastroenterology, 137, 2009, s. 1716-1724.
34. Backhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A., Semenkovich C.F., Gordon J., *The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 101, 2004, s. 1518-1523.
35. den Besten G., van Eunen K., Groen A.K., Venema K., Reijngoud D., Bakker B.M., *The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota and host energy metabolism*, Journal of Lipid Research, 54, 2013, s. 2325-2340.
36. Agus A., Clement K., Sokol H., *Gut microbiota derived metabolites as central regulators in metabolic disorders*, Gut, 70, 2021, s. 1174-1182.
37. Murugesan S., Ulloa-Martinez M., Martinez-Rojano H., Galvan-Rodriguez F.M., Miranda-Brito C., Romano M.C., Pina Escobedo A., Pizano-Zarate M.L., Hoyo Vadilo C., Garcia-Mena J., *Study of the diversity and short-chain fatty acids production by the bacterial community in overweight and obese Mexican children*, European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease, 34, 2015, s. 1337-1346.

38. Khan M.J., Gerasimidis K., Edwards C.A., Shaikh M.G., *Role of gut microbiota in the etiology of obesity: proposed mechanism and review of the literature*, Journal of Obesity, 15, 2016.
39. Tremaroli V., Backhed F., *Functional interaction between the gut microbiota and host metabolism*, Nature, 489, 2012, s. 242-249.
40. Priyadashini M., Kotlo K.U., Dudeja P.K., Layden B.T., *Role of short chain fatty acid receptors in intestinal physiology and pathophysiology*, Comprehensive Physiology, 8, 2018, s. 1091-1115.
41. Lin H.V., Frassetto A., Kowalik Jr E.J., Nawrocki A.R., Lu M.M., Kosinski J.R., Hubert J.A., Szeto D., Yao X., Forrest G., March D.J., *Butyrate and propionate protect against diet-induced obesity and regulate gut hormones via free fatty acid receptor 3-independent mechanism*, PloS One, 7, 2012, s. 35240.
42. Koh A., de Vadder F., Kovatcheva-Datchary P., Backhed F., *From dietary fiber to host physiology: short chain fatty acids as key bacterial metabolites*, Cell, 165, 2016, s. 1332-1345.
43. Cuesta-Martinez M.C., del Campo R., Garcia-Garriga M., Pelaez C., Requena T., *Taxonomic characterization and short-chain fatty acids production of the obese microbiota*, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11, 2021.
44. Cani P.D., Amar J., Iglesias M.A., Poggi M., Knauf C., Bastelica D., Neyrinck A.M., Fara F., Tuohy K.M., Chabo C., Waget A., Delmee E., Cousin B., Sulpice T., Chamontin B., Tanti I.F., Gibson G.R., *Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance*, Diabetes, 56, 2007, s. 1761-1772.
45. Yoo S.R., Kim Y.J., Park D.Y., Jung U.J., Jeon S.M., Ahn Y.T., Huh C.S., McGregor F., Choi M.S., *Probiotics L. plantarum and L. curvatus in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet-induced obesity*, Obesity, 21, 2013, s. 2571-2578.
46. Park D.Y., Ahn Y.T., Park S.H., Huh C.S., Yoo S.R., Yu R., Sung M.K., McGregor R.A., Choi M.S., *Supplementation of Lactobacillus curvatus HY7601 and Lactobacillus plantarum KY 1032 in diet – induced obese mice is associated with gut microbial changes and reduction on obesity*, PloS One, 8, 2013, s. 59470.
47. Fak F., Backhed F., *Lactobacillus reuteri prevents diet-induced obesity but not atherosclerosis in a strain dependent fashion in apoe-I- mice*, PloS One, 7, 2012, s. 1-8.
48. Miyoshi M., Ogawa A., Higurashi S., Kadooka Y., *Anti-obesity effect of Lactobacillus gasseri SBT2055 accompanied by inhibition of pro-inflammatory gene expression in the visceral adipose tissue in diet-induced obese mice*, Eur J Nutr, 53, 2014, s. 599-606.
49. Wang J., Tang H., Zhang C., Zhao Y., Derrien M., Rocher E., Strissel K., Zhao L., Obin M., Shen J., *Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice*, The ISME Journal, 9, 2015, s. 1-15.
50. An H.M., Park S.Y., Lee D.K., Kim J.R., Cha M.K., Lee S.W., Lim H.T., Jim K.J., Ha N.J., *Antiobesity and lipid-lowering effects of Bifidobacterium spp. In high fat diet-induced obese rats*, Lipids in Health and Disease, 10, 2011, s. 116.
51. Chen J., Wang R., Li X.F., Wang R.L., *Bifidobacterium adolescentis supplementation ameliorates visceral fat accumulation and insulin sensitivity in an experimental model of the metabolic syndrome*, British Journal of Nutrition, 107, 2012, s. 1429-1432.
52. Kondo S., Xiao J., Satoh T., Odamaki T., Takahashi S., Sugahara H., Yaeshima T., Iwatsuki K., Kamei A., Abe K., *Antiobesity effects of Bifidobacterium breve strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity*, Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 74, 2010, s. 1656-1661.
53. Gauffin Cano P., Santacruz A., Moya A., Sanz Y., *Bacteroides uniformis CECT 7771 ameliorates metabolic and immunological dysfunction in mice with high-fat-diet induced obesity*, PloS One, 7, 2012, s. 41079.

54. Kadooka Y., Sato M., Imaizumi K., Ogawa A., Ikuyama K., Akai Y., Okano M., Kagoshima M., Tsuchida T., *Regulation of abdominal adiposity by probiotics (Lactobacillus gasseri SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial*, Eur J Clin Nutr, 64, 2010, s. 636-643.
55. Jung S.P., Lee K.M., Kang J.H., Yun S.I., Park H.O., Moon Y., Kim J.Y., *Effect of Lactobacillus gasseri BNR17 on overweight and obese adults. A randomized, double-blind clinical trial*, Korean Journal of Family Medicine, 34, 2013, s. 80-89.
56. Sharafedinov K.K., Plotnikova O.A., Alexeeva R.I., Sentsova T.B., Songisepp E., Stsepetova J., Smidt I., Mikelsean M., *Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients-a randomized double-blind placebo-controlled pilot study*, Nutrition Journal, 12, 2013, s. 138.
57. Zarrati M., Shidfar F., Nourijelyani K., Mofid V., Hosseinzadeh-Attar M.J., Bidad K., Najafi F., Gheflati Z., Chamari M., Salehi E., *Lactobacillus acidophilus La5, Bifidobacterium BB12, Lactobacillus Casei DN001 modulate gene expression of subset specific transcription factors and cytokines in peripheral blood singlenuclear cells of obese and overweight people*, BioFactors, 39, 2013, s. 633-643.
58. Luoto R., Kalliomaki M., Laitinen K., Isolauri E., *The impact of perinatal probiotic intervention on the development of overweight and obesity: follow-up study from birth to 10 years*, International Journal Obesity, 34, 2010, s. 1531-1537.
59. Omar J.M., Chan Y.M., Jones M.L.J., Prakash S., Jones P.J.H., *Lactobacillus fermentum and Lactobacillus amylovarus as probiotic alter body adiposity and gut microflora in healthy persons*, Journal of Functional Food, 5, 2013, s. 116-123.
60. Mazloom Z., Yousefinajad A., Dabbaghmanesh M.H., *Effect of probiotics on lipid profile, glycemic control, insulin action, oxidative stress and inflammatory markers in patients with type 2 diabetes. A clinical trial*, Iranian Journal of Medical Sciences, 38, 2013, s. 38-43.

Udział bakterii jelitowych w regulacji masy ciała

Streszczenie

Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań wskazują na istotny udział bakterii jelitowych w regulacji procesu odżywiania, trawienia, metabolizmu oraz modulacji odporności gospodarza. Wyniki badań z ostatnich lat wykazały ponadto różnice w składzie mikrobioty jelitowej u osób otyłych oraz osób z prawidłową masą ciała i tym samym potwierdziły udział bakterii jelitowych w rozwoju otyłości. Szczególnie interesujące wydają się wyniki najnowszych badań, które wskazują na możliwość wykorzystania pewnych gatunków bakterii w leczeniu otyłości.

Potencjalne mechanizmy, poprzez które bakterie jelitowe mogą wpływać na masę ciała nie są jeszcze dokładnie poznane i opisane. Prawdopodobnie wpływ ten wynika ze złożonego oddziaływania metabolitów, produkowanych przez bakterie, na metabolizm gospodarza. Metabolity te mogą między innymi indukować proces lipogenezy, syntezy triglicerydów oraz wpływać na uwalnianie hormonów żołądkowo-jelitowych zaangażowanych w procesy regulacji łaknienia. Pewne gatunki bakterii jelitowych mogą także wpływać na zdolność organizmu do przyswajania większej ilości energii ze spożywanego pożywienia, a tym samym sprzyjać gromadzeniu tkanki tłuszczowej. Ponadto istotny także wydaje się wpływ bakterii jelitowych na rozwój stanu zapalnego, co z kolei wpływa na odkładanie się tkanki tłuszczowej, nietolerancję glukozy, insulinooporność i ostatecznie na masę ciała.

Celem pracy jest opisanie obecnie proponowanych mechanizmów poprzez które bakterie jelitowe mogą uczestniczyć w regulacji masy ciała oraz przedstawienie wyników najnowszych badań naukowych, które wskazują na możliwości terapeutycznego wykorzystania wybranych bakterii w regulacji masy ciała.

Słowa kluczowe: mikrobiota jelitowa, otyłość, dysbioza, probiotyki

The participation of intestinal bacteria in the regulation of body weight

Abstract

The results of the previous research indicate on the participation of intestinal bacteria in the nutrition, digestion, metabolism processes and modulation of host immunity. So far, differences between the composition of gut microbiota among healthy and obese people have been shown and the influence of intestinal bacteria in development of obesity was confirmed. Especially interesting seem to be the results of studies which indicate on the possibility of therapeutic use of certain bacteria species.

Potential mechanisms through which the intestinal bacteria can influence on the body mass are still unclear. Probably, the effects are present due to the complex interactions of metabolites produced by bacteria on host metabolism. These metabolites may induce the lipogenesis processes, triglyceride synthesis and releases of gastrointestinal hormones involved in the appetite regulation. Certain species of gut bacteria can also affect the body's ability to absorb more energy from the food it consumes, thereby promoting the accumulation of body fat. In addition, the influence of intestinal bacteria on the development of inflammation also appears to be important, which in turn affects the accumulation of adipose tissue, glucose intolerance, insulin resistance. The aim of this paper is to describe the currently proposed mechanism by which intestinal bacteria can participate in the regulation of body weight and presents the results of the latest study which indicate the possibility of using some bacteria to regulate body mass.

Keywords: gut microbiota, obesity, dysbiosis, probiotics

Rola mikrobioty jelitowej i osi mózg–jelita w patogenezie chorób cywilizacyjnych zdrowia psychicznego

1. Wstęp

Wpływ mikrobioty jelitowej i przekaźnictwa w osi jelita–mózg na rozwój chorób psychicznych bądź ich podtrzymywanie badany jest od niespełna 20 lat, ale już daje szereg odpowiedzi, jak duża jest to zależność. To, w jaki sposób jesteśmy w stanie zadbać o mikroflorę i jej absolutnie optymalny adaptacyjnie stan, kształtuje nasze funkcjonowanie w patogenezie chorób cywilizacyjnych i mamy tu na myśli również nowotwory, chorobę Parkinsona, oraz zaburzenia ze spektrum autyzmu (ICD-11). Obserwując najnowsze badania kliniczne można zauważyć, że mikrobiota jelitowa może również odpowiadać za kształtowanie trudności osobowościowej, wyróżnionego w nowej klasyfikacji ICD-11 czynnika, który u pacjenta może powodować trudności w budowaniu relacji i koreluje dodatnio ze stanem zdrowia. Jak ważny to proces? Jak istotne są badania nad psychobiotykami, które elementarnie i holistycznie wspierają ludzki stan psychiczny i powinny być wprowadzane w procesie psychoterapii i farmakoterapii? Na te pytania warto odpowiedzieć.

2. Psychobiotyki i ich znaczenie dla zdrowia psychicznego człowieka

Mikrobiom jelitowy, który u każdego człowieka jest unikalny, pełni, wspomnianą przeze mnie, rolę w kształtowaniu się zdrowia psychicznego. Najnowsze badania na tym polu wskazują liczne dowody na powiązania mikrobiomu jelitowego z funkcjonowaniem ośrodkowego układu nerwowego OUN, a przez to z fenotypem zachowania: funkcjonowaniem poznawczym, osobowością, nastrojem, snem oraz zachowaniami związanymi z odżywianiem. Zmiany składu mikrobiomu jelitowego obserwowane są nie tylko w dysfunkcjach ze strony przewodu pokarmowego, ale także w zaburzeniach psychicznych, w tym zaburzeniach nastroju, a także w innych zaburzeniach związanych z obniżeniem funkcjonowania poznawczego, jak np. encefalopatia cukrzycowa i choroba Alzheimera. Do opisywania tych zależności poszukiwano odpowiedniej ramy teoretycznej, która ułatwiałaby analizy i interpretację wyników.

Każdy człowiek posiada unikalny skład mikrobiomu, który rozwija się i zmienia w trakcie życia, jednocześnie pozostając na względnie stabilnym poziomie, chyba że zafundujemy mu radykalną zmianę diety, ewentualnie klimatu, w którym będzie żyć. Mądry mózg i OUN da o tych zmianach znać w sposób fizjologiczny, ale i psychiczny. Zmiany w obrębie mikrobiomu wychwytywane są przez neurony zlokalizowane na całej długości jelita i przesyłane do mózgu, tworzą tzw. oś mózgowo-jelitową, której głównym szlakiem jest nerw błędny – wspaniale opisany w terapii poliwalgalnej S. Porges'a. Poza wpływem na wymienione funkcjonowanie układu trawiennego i odpornościowego, mikrobiom jelitowy powiązany jest z funkcjonowaniem osi HPA, a przez to z regulacją

¹ Polsko-Japońska Akademia Technik Komputerowych w Warszawie.

pobudzenia i emocji. Ten główny szlak komunikacyjny to w 80% komunikacja jelita => mózg. Z kolei na drodze mózg => jelita przekazywanych jest 20% komunikatów. Warto wskazać jest więc, że na całej długości jelita znajduje się ponad 100 milionów neuronów o różnej modalności, tworzących złożone łuki odruchowe, które wpływają na regulację funkcji pracy jelit. Kryją się one pod nazwą jelitowego układu nerwowego (ang. *enteric nervous system*, ENS) i stanowią – słusznie nazwany – „drugi mózg” człowieka. Co istotne, można wpływać na niego poprzez stosowanie psychobiotyków (Dinan, 2013), czyli żywych organizmów, które spożywane w odpowiedniej ilości przyczyniają się do poprawy zdrowia psychicznego pacjentów pozostających w leczeniu klinicznym lub psychoterapii (oczywiście w połączeniu obydwu także).

Probiotyki, a raczej psychobiotyki, wpływają na aktywność osi podwzgórze–przysadka–nadnercza (HPA), wykazując działanie hamujące wobec uwalniania kortyzolu. W badaniach na myszach jałowych (*germ-free mice*) wykazano, że terapia psychobiotykami reguluje adaptacyjnie aktywność osi HPA w odpowiedzi na stres poprzez obniżenie poziomu kortykosteronu, hormonu adrenokortykotropowego, oraz ekspresji czynnika uwalniającego kortykotropinę w podwzgórze. W szczególności w badaniach wskazywane są szczepy bakterii *Coprococcus* (marker depresji), *Bifidobacterium longum* R0175 oraz *Lactobacillus helveticus*. U osób je przyjmujących zaobserwowano istotne zmniejszenie objawów lękowych, a także łatwiejsze radzenie sobie w sytuacjach stresowych. Istotnie korelowało to ze zmniejszeniem wydzielania cytokin prozapalnych w organizmie ludzkim. Istotne wyniki zostały otrzymane w badaniach Messaoudi, Lalonde i in. (2010), którzy w badaniu wpływu tych samych bakterii na zdrowie psychiczne człowieka zaobserwowali niższy stopień poczucia winy i większe predyspozycje do rozwiązywania problemów, obniżenie intensywności objawów depresji i doświadczanego lęku w skali HADS, poprawiły się objawy związane z doświadczaniem stresu w skali HSCL-90, doszło do istotnego obniżenia dobowego wydalania kortyzolu z moczem [1, 2].

Psychobiotyki wpływają także na stan psychiczny poprzez zwiększanie dostępności tryptofanu (prekursora serotoniny), zwiększanie syntezy serotoniny – potocznie nazywanej „hormonem szczęścia” oraz redukcję jej metabolizmu. Dodatkowo psychobiotyki zawierające wskazane wyżej bakterie przyczyniają się do produkowania neuroaktywnych związków, takich jak m.in. kwas gamma-aminomasłowy (GABA), katecholaminy i acetylocholino [3]. Są one niezbędne do adaptacyjnego i w miarę symbiotycznego holistycznie działania organizmu człowieka. W badaniach Bailey’a i wsp., przeprowadzonych na myszach jałowych, wykazano zmniejszenie liczebności bakterii z rodzaju *Bacteroides* oraz zwiększenie liczebności bakterii rodzaju *Clostridium* po ekspozycji zwierząt na działanie czynników stresogennych. Obserwowane zmiany były najwyraźniejsze, kiedy składowa mikrobiomu oceniana była bezpośrednio po ekspozycji. Wykazano wpływ LPS na aktywację obszarów centralnego układu nerwowego związanych z kontrolą emocjonalną, w szczególności ciała migdałowatego. Zauważa się więc zdolność psychobiotyków do zmniejszania przepuszczalności jelita i modulowania reakcji zapalnych jako jednego z kluczowych mechanizmów ich terapeutycznego działania w zaburzeniach psychicznych. Seo i wsp. dowiedli także wpływu dysbiozy jelitowej (niefizjologiczny stan mikrobioty) na rozwój stanu zapalnego, co w konsekwencji może prowadzić do powstania neurozapalnych zmian w mózgu, zwiększenia przepuszczalności bariery krew–mózg oraz umożliwienia wnikania czynników zapalnych i fragmentów bakterii do

mózgu, powodując nadmierną aktywację komórek mikrogleju [4]. Jakież to ważne dla dalszego rozwoju neuropsychologii oraz uwzględnienia podejścia holistycznego do psychoterapii.

3. Badania potwierdzające rolę psychobiotyków w utrzymaniu zdrowia psychicznego

W jednym z badań długotrwała suplementacja bakterii *Lactobacillus rhamnosus* (JB-1) u myszy zaindukowała zlokalizowane zmiany w układzie ekspresji GABAB1b mRNA (zwiększenie w obrębie obręczy oraz kory prelimbiczej, zmniejszenie w obrębie hipokampa, ciała migdałowatego oraz miejsca sinawego) [1]. Psychobiotyki zawierające JB-1, suplementowane codziennie, zmniejszyły nasilenie zachowań związanych ze stresem i depresją, regulowanych przez wydzielanie kortykosteronu. Te informacje mogą mieć istotne znaczenie dla naszego myślenia o zaburzeniach psychicznych [5]. Suplementacje probiotykowe, psychobiotykowe są obecnie coraz częściej wskazywane jako terapia uzupełniająca psychoterapię oraz profilaktykę zaburzeń nastroju i zaburzeń poznawczych, związanych np. z procesami starzenia się czy chorobami wpływającymi na aktywność mózgu.

Należałoby przytoczyć tu jeszcze jedno ważne badanie z punktu widzenia klinicznego wpływu mikrobioty jelitowej na procesy afektywne, poznawcze i depresję. Zostało ono przeprowadzone przez Kelly'ego i wsp. (2016), a wykorzystano w nim metodę przeszczepu mikrobioty jelitowej FMT (ang. *fecal microbiota transfer*) od pacjentów ze zdiagnozowaną depresją do organizmu myszy jałowych. Poddane FMT zwierzęta miały zachowania lękowe i odczuwały anhedonię. Wskazywało na to unikanie przez myszy otwartych przestrzeni (lęk) oraz rzadszy wybór roztworu wody z sacharozą (wywołującą przyjemność), a częstszy wody bez dodatków (anhedonia). W jelitach myszy jałowych wytworzył się stan zapalny. W etiologii depresji kluczową rolę odrywają właśnie czynniki zapalne, które powodują nadmierną aktywację indoloamino-2,3-dioksygenazy (IDO), przekształcającej dostępne zasoby tryptofanu w kinureninę. Kinurenina ma wpływ toksyczny na OUN, a tryptofan, który wykorzystywany jest do jej wytworzenia, nie może tym samym zostać przekształcony w serotoninę, której niedobór odgrywa kluczową rolę w patofizjologii tej choroby (Müller i Schwarz, 2007). Wzrost cytokin prozapalnych, takich jak interleukina-1 (IL-1) i interleukina-6 (IL-6), modulujących wydzielanie kortykoliberyny (ang. *corticotropin-release factor*, CRF), powoduje jej podwyższenie, a następnie reakcję osi HPA i wzrost stężenia kortyzolu [2].

Z perspektywy psychologicznej istotne jest badanie relacji pomiędzy rozwojem depresji, reakcją immunologiczną organizmu oraz mikrobioty jelitowej łącznie. Na połączenie to ma wpływ tzw. zespół nieszczelnego jelita. Badania pokazały, że pod wpływem stresu znacznemu osłabieniu ulegają *tigh junctions*, czyli szczelne połączenia pomiędzy komórkami nabłonka jelitowego, w wyniku czego dochodzi do translokacji bakterii jelitowych przez barierę jelitową do układu krążenia człowieka.

Jak uwidoczniło w kolejnych badaniach Zareie i wsp. – myszy laboratoryjne, które poddawano przewlekłemu stresowi, miały zwiększony wychwytywanie bakterii jelitowych w węzłach chłonnych jelit. Wskazuje to na osłabienie bariery jelitowej, a co za tym idzie na przedostawanie się drobnoustrojów poza światło jelita i prowadzenie do stanu zapalnego w organizmie. Taka relacja między podwyższonymi markerami stanu zapal-

nego a stanami depresyjnymi lub stanami obniżonego nastroju obserwowana jest w badaniach klinicznych na modelach zwierzęcych od wielu lat [6].

W oparciu o analizy wynikające z badań na myszach laboratoryjnych rozwinęła się także gałąź badań, dzięki którym można dowiedzieć się, jak wybrane probiotyki wpływają na stany psychiczne człowieka. Mając na uwadze działanie osi jelito–mózg, opisano nieliczne, jak do tej pory, badania na populacji ludzkiej – polegające na wprowadzeniu probiotyku uczestnikom badania i ocenie zmian nastroju, nasilenia lęku, stanów depresyjnych, pogorszeniu stanu ogólnego adaptacji do stresora za pomocą przedstawionych skal takich jak *General Health Questionnaire* (GHQ, Kwestionariusz Ogólnego Zdrowia), *Depression Anxiety and Stress Scale* (DASS, Skala Depresji, Lęku i Stresu), *Leiden Index of Depression Sensitivity-Revised* (LEIDS-r), *State-Trait Anxiety Inventory* (STAI, Inwentarz Stanu i Cechy Lęku), *Development Behavior Checklist* (DBC), *Beck Depression Inventory* (BDI, Skala Depresji Becka), *Beck Anxiety Inventory* (BAI), *Hopkins Symptom Checklist* (HSCL-90, Lista Objawów Hopkinsa), *Hospital Anxiety and Depression Scale* (HADS, Szpitalna Skala Lęku i Depresji), *Perceived Stress Scale* (PSS, Skala Odczuwanego Stresu), *Coping Checklist* (CCL), *Profile of Mood State* (POMS, Test Profilu Nastrojów). Część badań oceniała również markery stanu zapalnego i BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*, białko, najważniejszy czynnik wzrostu neuronów w mózgu) w surowicy krwi, a także wskazywała na wahanie poziomu kortyzolu w odpowiedzi organizmu na stres. Dwa badania weryfikowały zmiany stopnia aktywacji mózgu w badaniu fMRI po zastosowaniu probiotyków [7].

I tak na przykład w badaniu Messaoudiego i wsp. 55 zdrowym ochotnikom podawano mieszanę bakterii probiotycznych zawierającą *Lactobacillus helveticus* R0052 i *Bifidobacterium longum* R0175 lub placebo przez 30 dni roboczych (próba podwójnie ślepa). Uczestnicy próby badawczej byli oceniani za pomocą wymienionych skal: HSCL-90, HADS, PSS i CCL zarówno przed, jak i po dokonaniu badania (30 dni), dodatkowo badano u nich poziom kortyzolu w próbce moczu. Dowiedziono, że przyjmowanie tychże szczepów bakterii, które można nazywać psychobiotykami (bakteriami wpływającymi na stan psychiczny człowieka, a przynajmniej pozytywnie z nim korelującymi) wpłynęło na zmniejszenie poziomu lęku, stanów depresyjnych i somatyzacji, a także współczynnika agresji – wrogości w skali HSCL-90 oraz na poprawę w skali HADS. Widoczny był również spadek poziomu kortyzolu. Powtórzone przez badaczy doświadczenia na zmniejszonej próbie 25 pacjentów z tej samej grupy ochotników, u których stwierdzono najniższy poziom stresu w próbce sprawdzającej poziom kortyzolu w moczu na początku badania, wykazało utrzymującą się poprawę w skalach HSCL-90 i HADS [8].

Ważne wydaje się również przypomnienie kilku istotnych informacji na temat depresji, którą już teraz możemy nazywać chorobą cywilizacyjną, prowadzącą w stanach ciężkich, przewlekłych i nieleczonych do śmierci. U większości pacjentów można wyszczególnić objawy takie jak obniżenie nastroju, ubytek energii, zmniejszenie aktywności oraz energii życiowej, trudności z koncentracją oraz utrzymaniem uwagi i skupienia, motywacji, a także zmęczenie pojawiające się nawet po niewielkim wysiłku. Mogą pojawiać się również zaburzenia snu oraz brak apetytu (zamiennie z napadami objadania się). Samoocena i pewność siebie u osób ze zdiagnozowaną depresją są znacznie obniżone, pojawia się: poczucie winy, krzywdy osobistej, niezrozumienia, a także bezwartości-

wości. Obniżony nastrój nie ulega większym zmianom w kolejnych dniach, nawet pod wpływem bieżących wydarzeń [9].

U pacjentów z depresją wykazano zwiększoną aktywność reakcji zapalnych IgA- i IgM-zależnych w jelitach, skierowanych przeciwko lipopolisacharydom enterobakterii. Można więc wysunąć wnioski, że translokacja bakteryjna z jelit jest zwiększona u tych pacjentów, a odpowiedź zapalna może się przyczyniać do zaburzeń nastroju. Istotnie zwrócono uwagę na zwiększoną liczbę bakterii z gatunku *Alistipes*. Podwyższona liczba tych mikroorganizmów została wykryta również u osób chorujących na inne choroby, którym towarzyszy stan zapalny, w tym także na schizofrenię czy jadłowstręt psychiczny (anoreksja, zaburzenia odżywiania) [10]. Sugeruje to, że gatunek ten ma związek z występowaniem w organizmie procesu zapalnego, który odgrywa rolę w patogenezie zaburzeń depresyjnych. To bardzo ważne dla perspektywy dalszych badań i wsparcia leczenia chorych na depresje bądź inne zaburzenia psychiczne [9].

Wykazano także, że u pacjentów z obniżonym nastrojem oraz depresją w jelitach występuje nadmiar mikroorganizmów, tj. *Oscillibacter*, których końcowym produktem metabolizmu jest kwas walerianowy. W swej strukturze cząstkowej podobny jest do kwasu GABA, w rezultacie więc jest zdolny do wiązania się z receptorami GABA. Zwiększone stężenie kwasu walerianowego w organizmie ludzkim powoduje, że organizm reaguje tak, jakby w jego krwi występował nadmiar kwasu γ -aminomasłowego. Powoduje to typowe dla depresji stany takie jak ospałość oraz spadek motywacji. Wynika z tego, że skład mikrobioty jelitowej i jej bakterii zaangażowanych w wytwarzanie lub metabolizm kwasu walerianowego przyczynia się do występowania objawów typowych dla depresji [10].

Należy dodać, że psychobiotyki są w stanie – poprzez zawarte w nich wymienione szczepy bakterii – modulować fizjologiczny stan mikroflory jelitowej i utrzymywać mikrobiom na najlepszym (a może wystarczająco odpowiednim) poziomie, nie dopuszczając do dysbiozy i stanu zapalnego. Jest to fascynujący mechanizm, który sami możemy regulować poprzez odpowiednią suplementację. W zależności od liczby i rodzaju mikroorganizmów, a także pewnej korelacji między nimi, do mózgu wysyłane są liczne sygnały na drodze endokrynej, immunologicznej i neuronalnej. Oczywiście komunikacja ta odbywa się za pośrednictwem osi jelitowo-mózgowej. Wyniki analizowanego piśmiennictwa i badań klinicznych, prowadzonych również w polskich laboratoriach, wykazują, że skład mikrobioty bakteryjnej w wybranych zaburzeniach i chorobach psychicznych jest odmienny od składu mikrobioty kolonizującej jelita osób, u których tych zaburzeń i chorób nie wykazano.

4. Podsumowanie

Psychobiotyterapia powinna być prowadzona na równi z psychoterapią i farmakoterapią. Wyniki badań i ich ewidentne efekty w poprawie zdrowia psychicznego po odpowiedniej suplementacji nie pozostawiają wątpliwości: jest to gałąź nauki, która absolutnie będzie rozwijana na potrzeby poprawy zdrowia psychicznego pacjentów.

Literatura

1. Jiang H., Ling Z., Zhang Y., Mao H., Ma Z., Yin Y., Wang W., Tang W., Tan Z., Shi J., Li L., Ruan B., *Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder*, Brain Behav Immun., 48, 2015, s. 186-194.
2. Kleiman S.C., Watson H.J., Bulik-Sullivan E.C., Huh E.Y., Tarantino L.M., Bulik C.M., Carroll I.M., *The intestinal microbiota in acute anorexia nervosa and during renourishment. Relationship to depression, anxiety, and eating disorder psychopathology*, Psychosom. Med., 77, 2015, s. 969-998.
3. Hansen A.K., Hansen C.H., Krych L., Nielsen D.S., *Impact of the gut microbiota on rodent models of human disease*, World J Gastroenterol., 20(47), 2014, s. 17727-17736, doi: 10.3748/wjg.v20.i47.17727, indexed in Pubmed: 25548471.
4. Foster J.A., Rinaman L., Cryan J.F. *Stress & the gut-brain axis. Regulation by the microbiome*, Neurobiol. Stress, 7, 2017, s. 124-136.
5. Heitzman J., *Zaburzenia depresyjne*, Edra Urban & Partner, Wrocław 2017.
6. Naseribafrouei A., Hestad K., Avershina E., Sekelja M., Linløkken A., Wilson R., Rudi K., *Correlation between the human fecal microbiota and depression*, Neurogastroenterol. Motil., 26, 2014, s. 1155-1162.
7. Nguyen T.T., Kosciółek T., Maldonado Y., Daly R.E., Martin A.S., McDonald D., Knight R., Jeste D.V., *Differences in gut microbiome composition between persons with chronic schizophrenia and healthy comparison subjects*, Schizophr. Res., 204, 2019, s. 23-29, 50-61.
8. Olszewska J., Jagusztyn-Krynicka E.K., *Human Microbiome Project. Mikroflora jelit oraz jej wpływ na fizjologię i zdrowie człowieka*, Post Mikrobiol., 51(4), 2012, s. 243-256.
9. Szajewska H., *Praktyczne zastosowanie probiotyków*, Gastroenterologia Kliniczna. Postępy i Standardy, 2014.
10. Maes M., Kubera M., Leunis J.C., *The gut-brain barrier in major depression. Intestinal mucosal dysfunction with an increased translocation of LPS from gram negative enterobacteria (leaky gut) plays a role in the inflammatory pathophysiology of depression*, Neuro Endocrinol. Lett., 29, 2008, s. 117-124.

Rola mikrobioty jelitowej i osi mózg–jelita w patogenezie chorób cywilizacyjnych zdrowia psychicznego

Streszczenie

Stres upośledza funkcje naszej bariery jelitowej, co w szybkim tempie prowadzi do zaburzeń żołądkowo-jelitowych oraz powstawania, najpierw miejscowego, a potem uogólnionego stanu zapalnego. Przewlekły stan zapalny jest prekursorem wielu różnych chorób, które już teraz można określać mianem cywilizacyjnych. Podwyższony poziom cytokin prozapalnych, czyli białek dbających o odporność ludzkiego organizmu, obserwuje się także w zaburzeniach psychicznych: depresji, stanach lękowych czy chorobach neurodegeneracyjnych. Jak już wiadomo – jelita dysponują własnym układem nerwowym. To właśnie ENS (ang. *enteric nervous system* – jelitowy układ nerwowy) jest jednym z ważniejszych elementów osi mózgowo-jelitowej. Przewód pokarmowy komunikuje się z mózgiem, wysyłając do niego sygnały poprzez nerw błędny oraz mnogość substancji wytwarzanych przez bakterie jelitowe (neurotransmitery i neuromodulatory: serotoninę, melatoninę, kwas gamma-aminomasłowy – GABA, acetylocholinę), układ immunologiczny, wytwarzający m.in. wspomniane cytokiny, a także układ dokrewny produkujący hormony. Między przewodem pokarmowym a mózgiem dochodzi do nieustannej wymiany informacji. Liczne badania dowodzą, że mamy o wiele większy wpływ na zdrowie, niż nam się wydaje. Przedmiotem obecnej pracy jest przegląd aktualnych badań na temat technik badawczych stosowanych do analizy mikrobioty, wpływu czynników środowiskowych na jej zróżnicowanie oraz oddziaływania mikrobioty na nasze zdrowie i pracę mózgu.

Słowa kluczowe: mikrobiota, mikroflora jelitowa, stres, zaburzenia lękowe, jelitowy układ nerwowy, zdrowie psychiczne oś mózgowo-jelitowa, psychobiotyki

The role of the gut microbiota and the brain-gut axis in the pathogenesis of mental health lifestyle diseases

Abstract

The role of the gut microbiota and the brain-gut axis in the pathogenesis of mental health lifestyle diseases. Stress impairs the functions of our intestinal barrier, which quickly leads to gastrointestinal disorders and the formation of local and then generalized inflammation. Chronic inflammation is a precursor to many different diseases, which we can already call civilization. Increased levels of proinflammatory cytokines, i.e. proteins that care for the immunity of the human body, are also observed in mental disorders: depression, anxiety or neurodegenerative diseases. As we already know, the intestines have their own nervous system. It is the ENS (enteric nervous system) that is one of the most important elements of the cerebral and intestinal axis. The digestive tract communicates with the brain, sending signals to it through the vagus nerve, as well as a multitude of substances produced by intestinal bacteria (neurotransmitters and neuromodulators: serotonin, melatonin, gammaaminobutyric acid – GABA, acetylcholine), the immune system, producing, among others, the mentioned cytokines, and the endocrine system that produces hormones. There is a constant exchange of information between the digestive tract and the brain. Numerous studies show that we have a much greater impact on our health than we think. The subject of the present work is a review of current research on research techniques used to analyze microbiota, the influence of environmental factors on its diversity and the impact of microbiota on our brain health and work.

Keywords: microbiota, intestinal microflora, stress, anxiety disorders, intestinal nervous system, mental health, brain and intestinal axis, psychobiotics

Indeks Autorów

Andrzejak R.....	44
Andrzejczak-Grządko S.	36
Bełkot Z.....	18
Ciszkowicz E.....	70
Dwojaczny B.....	104
Fajdek-Bieda A.....	55
Gołofit-Szymczak M.	80
Górny R.L.....	80
Gritskevich S.	7
Guz-Regner K.	7
Janowska B.....	44
Jeske A.	93
Kaczmarek A.....	93
Kaźmierczak K.....	93
Kępowicz J.....	7
Konkol O.....	36
Krzywińska I.....	93
Lecka-Szlachta K.	70
Miłoś A.....	70
Nowotnik P.....	93
Stobnicka-Kupiec A.	80
Świątek M.	93
Wojtas N.....	18
Wołoszyn M.	18
Wójcik-Fatla A.....	80
Wróblewska A.....	55
Zapała L.....	70
Ziamba-Domańska S.....	113