

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **239868**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **432920**

(22) Data zgłoszenia: **17.02.2020**

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

C12R 1/25 (2006.01)

A61K 35/747 (2015.01)

A61P 31/10 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 15/00 (2006.01)

(54)

Nowy szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 i jego zastosowanie

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

23.08.2021 BUP 21/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

17.01.2022 WUP 03/22

(73) Uprawniony z patentu:

**EMERGOPHARM SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ SPÓŁKA
KOMANDYTOWA, Konstancin-Jeziorna, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**PIOTR HECZKO, Kraków, PL
MAGDALENA STRUS, Kraków, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Alina Magońska

PL 239868 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowy szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 i jego zastosowanie w leczeniu zakażeń bakteryjnych i grzybiczych.

Patogenne grzyby i chorobotwórcze bakterie są częstą przyczyną poważnych stanów zapalnych przewodu pokarmowego i dróg rodnych człowieka. Z drugiej strony, ludzki przewód pokarmowy i drogi rodne zasiedlone są przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus spp.*, które znane są ze swoich właściwości antagonistycznych wobec chorobotwórczych bakterii i grzybów, dzięki pozakomórkowej produkcji kwasów takich jak: kwas mlekowy, octowy, piroglutaminowy, cyklicznych dipeptydów, bakleriocyn i nadtlenu wodoru. Niektóre szczepy takich bakterii są wykorzystywane w medycynie jako tzw. bakterie probiotyczne. Z drugiej strony, nadtlenek wodoru stanowi bardzo silną i czynną biologicznie substancję, która reaguje z lipidami, białkami, kwasami nukleinowymi oraz innymi czynnikami powodując oksydacyjne uszkodzenie komórek i stan zapalny. Duże ilości nadtlenu wodoru na nabłonku, które mogą zapoczątkowywać i podtrzymywać stany zapalne pochodzą albo z pobudzonych komórek układu immunologicznego, albo z niektórych gatunków bakterii z rodzaju *Lactobacillus spp.* W pewnych okolicznościach produkcja nadtlenu wodoru przez bakterie z rodzaju *Lactobacillus spp.* może być tak wysoka, że jest równa ilościom produkowanym przez pobudzone komórki układu immunologicznego w toku toczącego się miejscowego stanu zapalnego.

Okazuje się, że niektóre szczepy bakterii kwasu mlekowego wytworzyły mechanizm ochronny przed nadtlaniem wodoru oparty na syntezie heksamerycznej lub tetramerycznej katalazy. Mechanizm ten może zostać wykorzystany jako sposób wygaszania stanów zapalnych będących wynikiem znacznej nadwyżki reaktywnych form tlenu, a w szczególności nadtlenu wodoru, przez zastosowanie takich szczególnych szczepów jako bakterii probiotycznych.

Ponadto niektóre szczepy bakterii kwasu mlekowego posiadają silne właściwości anagonistyczne wobec patogennych grzybów drożdżopodobnych powodujących grzybicę pochwy i sromu, a także skóry i przewodu pokarmowego. Głównym czynnikiem patogennych takich grzybic jest gatunek *Candida albicans*.

Najczęstsze stany zapalne pochwy, takie jak bakteryjna waginoza i bakteryjne zapalenie pochwy są powodowane przez tlenowe lub beztlenowe bakterie nadmiernie namnażające się na nabłonku pochwy: *Gardnerella vaginalis* i inne beztlenowce oraz *Streptococcus agalactiae* i *Escherichia coli*. Za pomocą szczególnych szczepów bakterii probiotycznych można uzyskać kontrolę nad nadmiernym przerośnięciem takich bakterii.

Dlatego poszukując nowych alternatywnych sposobów leczenia rozważa się możliwość stosowania preparatów, zawierających szczepy bakterii z rodzaju *Lactobacillus spp.*, wpływających na wygaszanie stanów zapalnych wywołanych przez nadmierny wzrost chorobotwórczych bakterii oraz grzybów szczególnie z rodzaju *Candida spp.*, jak i przez nadprodukcję nadtlenu wodoru przez niektóre bakterie kwasu mlekowego.

Znane jest z opisu patentowego PL203824 zastosowanie szczepu *Lactobacillus plantarum* zapewniającego zwiększoną ilość kwasu propionowego lub kwasu octowego w okrężnicy do wytwarzania leku zmniejszającego jeden lub większą ilość czynników ryzyka związanego z zespołem metabolicznym. Szczep ujawniony w wynalazku to *Lactobacillus plantarum* 299v, który wykazuje zdolność do przylegania do błony śluzowej jelit.

Znana jest z opisu patentowego USRE 44400 kompozycja zawierająca jeden lub więcej szczepów *Lactobacillus plantarum* wytwarzających tanazę, enzym degradujący taninę, w połączeniu z samą taniną i farmaceutycznie dopuszczalnym nośnikiem. Szczepy wchodzące, w skład kompozycji są to nowe szczepy *Lactobacillus plantarum* wyizolowane z błony śluzowej okrężnicy człowieka. Kompozycja wykazuje właściwości przeciwzapalne dzięki działaniu produktów rozkładu taniny. Kompozycja przeznaczona jest do wytwarzania leku do leczenia chorób układu pokarmowego i układu naczyniowo-sercowego.

Znany jest z opisu patentowego US20120200943 szczep *Lactobacillus plantarum* CMU995, który posiada doskonałą zdolność do przylegania do komórek przewodu pokarmowego i dróg oddechowych. Ta właściwość szczepu *Lactobacillus plantarum* CMU995 zgodnie z wynalazkiem, powoduje hamowanie przylegania patogenów do nabłonka przewodu pokarmowego i moczowego.

Znany jest z opisu patentowego EP 3405263 szczep *Lactobacillus plantarum* GOS42 DSM 3231 i jego kompozycje przeznaczone do leczenia stanów zapalnych w szczególności jamy ustnej. Opisany szczep posiada zdolność do zmniejszania lub hamowania uwalniania czynników zapalnych takich jak

interleukina IL-1, IL-6, IL-8, czynniki martwicy nowotworów TNF. Wynalazek zilustrowany jest przykładem przedstawiającym stymulację ludzkich monocytów probiotykami.

Dotychczas znane szczepy *Lactobacillus plantarum* za względu na poznane, swoiste właściwości stosowane były w biegunkach infekcyjnych i stanach zapalnych przewodu pokarmowego.

Celem wynalazku było wyselekcjonowanie z kolekcji szczepów bakterii z rodzaju *Lactobacillus spp.* nowego szczepu, który oprócz cech charakterystycznych dla tego gatunku i właściwości probiotycznych posiadałby, zdolność do wygaszania stanów zapalnych w drogach rodnych i w przewodzie pokarmowym.

Istotą wynalazku jest nowy szczep *Lactobacillus plantarum* oznaczony symbolem PL5, który został zdeponowany, zgodnie z traktatem budapeszteńskim o międzynarodowym uznawaniu depozytu drobnoustrojów dla celów postępowania patentowego, w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu (53-114 Wrocław, ul. Rudolfa Weigla 12). Nowy szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 został zdeponowany w dniu 06.07.2016 r. i otrzymał numer B/00110. Nowy szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 posiada wysoką zdolność do wytwarzania katalazy, enzymu rozkładającego nadtlenek wodoru.

Nowy szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 posiada zdolność hamowania wzrostu grzybów drożdżopodobnych powodujących zakażenia dróg rodnych i przewodu pokarmowego.

Nowy szczep *Lactobacillus plantarum* posiada zdolność hamowania rozwoju patogennych bakterii powodujących stany zapalne pochwy.

Nowy szczep *Lactobacillus plantarum* posiada w pełni poznaną sekwencję genomową odróżniająca go od innych szczepów bakterii.

Wynalazek obejmuje również zastosowanie nowego szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 zdeponowanego w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów pod numerem B/00110 w produkcie do leczenia stanów zapalnych w drogach rodnych i w przewodzie pokarmowym.

Niniejszy wynalazek przedstawiono na rysunku, na którym:

Fig. 1 przedstawia wynik testu API 50 CH dla szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5.

Fig. 2 przedstawia zdjęcie produktów reakcji PCR w kierunku *Lactobacillus plantarum*; ścieżki: 1 (szczep *Lactobacillus plantarum* PL5); 2 – kontrola negatywna; 3 – kontrola pozytywna (szczep *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014); M – marker wielkości.

Fig. 3 przedstawia strefy zahamowania wzrostu szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 wokół krążków z antybiotykami.

Fig. 4 przedstawia oporność szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 na sole żółci w stężeniach: 1, 2, 5, 10, 20 g/l.

Fig. 5 przedstawia adherencję szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 do ludzkiej linii tkankowej A431.

Fig. 6 przedstawia test obrazujący produkcję nadtlenu wodoru przez szczep *Lactobacillus plantarum* PL5.

Fig. 7 przedstawia antagonistyczne działanie szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 wobec *Candida albicans* ATCC 10231 z wykorzystaniem metody półilościowej.

Fig. 8 przedstawia antagonistyczne działanie szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 wobec wybranych gatunków grzybów drożdżopodobnych z wykorzystaniem metody ilościowej.

Fig. 9 Antagonistyczne działanie szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 wobec wybranych bakterii wskaźnikowych, przy zastosowaniu metody ilościowej. „***” całkowita redukcja liczebności bakterii.

Wynalazek ilustrują wyniki badań opisujące identyfikację i charakterystykę właściwości szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5.

I. Fenotypowa identyfikacja szczepu *Lactobacillus plantarum* FL5 z wykorzystaniem zestawu API@50 CH firmy bioMerieux.

Identyfikację fenotypową przeprowadzono za pomocą zestawu API 50 CH zgodnie z zaleceniami producenta. Jest to wystandaryzowany zestaw zawierający 50 testów biochemicznych do badania sposobu metabolizmu węglowodanów przez drobnoustroje. API 50 CH firmy bioMerieux wykorzystuje się do identyfikacji bakterii z rodzaju *Lactobacillus spp.* i rodzajów spokrewnionych w połączeniu z API 50 CUL Medium (bioMerieux; USA).

Wynik testu API 50 CH dla badanego szczepu z rodzaju *Lactobacillus spp.* przedstawia Tab. 1 i Fig. 1.

Tabela 1

Wynik testu API 50 CH dla szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5.

| Probówka | TEST | Wynik |
|----------|-----------------------------------|---------------|
| | | Szczep PL5 |
| 0 | KONTROLA | - |
| 1 | Glicerol | - |
| 2 | Erytrotol | - |
| 3 | D-arabinoza | - |
| 4 | L-arabinoza | - |
| 5 | D-ryboza | + |
| 6 | D-ksyloza | - |
| 7 | L-ksyloza | - |
| 8 | D-adonitol | - |
| 9 | Metylo- β D-ksylopiranozyd | - |
| 10 | D-galaktoza | + |
| 11 | D-glukoza | + |
| 12 | D-fruktoza | + |
| 13 | D-mannoza | + |
| 14 | L-sorboza | - |
| 15 | L-ramnoza | - |
| 16 | Dulcytol | - |
| 17 | Inozytol | - |
| 18 | D-mannitol | + |
| 19 | D-sorbitol | + |
| 20 | Metylo- α D-mannopiranozyd | - |
| 21 | Metylo- α D-glukopiranozyd | - |

| | | |
|----|------------------------------|---|
| 22 | N-acetylo-glukozamina | + |
| 23 | Amigdalina | + |
| 24 | Arbutyna | + |
| 25 | Eskulina Cytrynian żelaza | + |
| 26 | Salicyna | + |
| 27 | D-celobioza | + |
| 28 | D-maltoza | + |
| 29 | D-laktoza (wołowa) | + |
| 30 | D-melibioza | + |
| 31 | D-sacharoza | + |
| 32 | D-trehaloza | + |
| 33 | Inulina | - |
| 34 | D-melezytoza | - |
| 35 | D-rafinoza | - |
| 36 | Skrobia | - |
| 37 | Glikogen | - |
| 38 | Ksylitol | - |
| 39 | Genjobioza | + |
| 40 | D-turanoza | + |
| 41 | D-liksoza | - |
| 42 | D-tagatoza | - |
| 43 | D-fukoza | - |
| 44 | L-fukoza | - |
| 45 | D-arabitol | - |
| 46 | L-arabitol | - |
| 47 | Glukonian potasu | - |
| 48 | 2-ketoglukonian potasu | - |
| 49 | 5-ketoglukonian potasu | - |

Fig. 1 przedstawia wynik testu API 50 CH dla szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5. Na podstawie otrzymanego profilu biochemicznego program *apiWeb* zidentyfikował szczep PL5 jako *Lactobacillus plantarum*.

II. Identyfikacja szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 z wykorzystaniem metody PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*).

II.1. Izolacja genomowego DNA bakterii:

Do izolacji genomowego DNA zastosowano zestaw DNA GeneMATRIX Basic DNA Purification Kit (EURx) wykorzystujący zdolność wiązania się DNA do ziół krzemionkowych w wysokich stężeniach soli chaotropowych. Procedura izolacji DNA przebiegała w następujący sposób:

1. 24-godzinną hodowlę komórek bakteryjnych prowadzoną w płynnym podłożu MRS (Oxoid) odwirowywano w objętości 1 ml (2 min, 12 000 rpm).
2. Supernatant usuwano, a osad dokładnie zawieszano w 250 μ l buforu do zawieszania Cell R (w zestawie) z dodatkiem 200 μ l niebieskiego buforu lizującego Lysis Blue (w zestawie), aż do uzyskania jednolitej, niebieskiej zawiesiny.
3. Do zawiesiny komórek dodawano 350 μ l buforu neutralizującego Neutral B (w zestawie). Dokładnie i powoli mieszano zawartość probówek przez kilkukrotne odwracanie, aż do całkowitego zaniku niebieskiej barwy zawiesiny.
4. Po zakończeniu lizy mieszaninę odwirowywano (7 min, 12 000 rpm), a przesącz nakładano na minikolumnę ze specjalnym złożem krzemionkowym i ponownie wirowano (1 min, 12 000 rpm).
5. Złoże dwukrotnie przepłukiwano: najpierw 500 μ l buforu płuczącego Wash UX1, a następnie 650 μ l buforu płuczącego Wash UX2 (w zestawie).
6. Oczyszczone DNA eluowano ze złoża za pomocą 50 μ l buforu Elution (w zestawie), ogrzanego do temperatury 80°C.
7. Wyizolowane DNA przechowywano w probówce typu Eppendorf w temperaturze 4°C do czasu dalszych analiz.

II.2. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR):

W Tabeli 2 przedstawiono sekwencje użytych starterów oraz wielkość poszczególnych ampikonów.

Tabela 2

Sekwencje starterów i wielkość ampikonów poszukiwanego, gatunku bakterii.

| Starter | Skwencja 5'→3' | Gatunek | Wielkość ampikonu |
|---------|-----------------------------|---------------------|-------------------|
| Lfpr | GCC GCC TAA GGT GGG ACA GAT | <i>L. plantarum</i> | 283 pz. |
| PlanII | TTA CCT AAC GGT AAA TGC GA | | |

Program amplifikacji dla gatunku *Lactobacillus plantarum* prowadzony był w termocyklerze S 1000 (BioRad) i przedstawiał się następująco:

1. 92°C – 2 min
 2. 95°C – 30 sek
 3. 55°C – 30 sek
 4. 72°C – 30 sek
 5. 72°C – 1 min
- } 30x

Amplifikację prowadzono zgodnie z metodą Walter i wsp. (Walter J, Taonock GW, Tilsala-Timisjarvi A, Rodtong S, Loach DM, Munro K, Alatossava T. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers., Appl Environ Microbiol. 2000; 66(1):297–303). Z publikacji tej pochodzą również użyte sekwencje starterów.

Po skończonej reakcji PCR produkty amplifikacji były analizowane w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny. Próbkę nakładano do kieszonek żelu w objętości 7 μ l z dodatkiem 3 μ l buforu obciążającego. Elektroforezę prowadzono w buforze TBE o stężeniu 0,5x, przez 1,5 godziny, pod napięciem 80 V, w aparacie do elektroforezy (BioRad).

Obraz żelu oglądano przy użyciu systemu GelDoc XR + (BioRad), w skład którego wchodził transiluminator UV, kamera zbierająca obraz oraz program komputerowy do dokumentacji i analizy obrazu Image Lab (BioRad).

Obecność produktu PCR o odpowiedniej ilości par zasad uznawany była za pozytywny wynik reakcji. Na każdym żelu umieszczano ponadto kontrolę negatywną, którą stanowiła woda destylowana dodawana do buforu reakcyjnego zamiast genomowego DNA bakterii oraz kontrolę pozytywną, jaką był produkt amplifikacji otrzymany z użyciem DNA szczepu wzorcowego oraz marker wielkości prążków (GeneRuler 100bp, Axygen).

Na podstawie testu PCR szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 zidentyfikowano jako *Lactobacillus plantarum*.

Fig 2. przedstawia zdjęcie produktów reakcji PCR w kierunku *Lactobacillus plantarum*; ścieżki: 1 (szczep PL5); 2 – kontrola negatywna; 3 – kontrola pozytywna (szczep *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014); M – marker wielkości.

III. Oznaczenie wrażliwości na antybiotyki szczepu *Lactobacillus plantarum* PL

W celu zbadania lekooporności szczepu *L. plantarum* PL5 metodą dyfuzyjno-krążkową, zawiesinę hodowli (OD = 0,5 w skali McFarlanda) rozprowadzono na podłożu agarowym MRS (Oxoid) na płytce Petriego. Następnie podłoże z naniesioną zawiesiną pozostawiono w temperaturze pokojowej na 15 minut w celu jej wysuszenia. Po tym czasie na płytkę naniesiono za pomocą jałowej pęsety krążki nasączone odpowiednimi antybiotykami. Inkubację prowadzono w warunkach beztlenowych, przez 24 h w temp. 37°C. Po inkubacji zmierzono strefy zahamowanego wzrostu szczepu bakteryjnego wokół krążka z antybiotykiem (w mm). Odczytu lekooporności różnicującego szczep *L. plantarum* PL5 na wrażliwy i oporny, dokonano zgodnie z EUCAST. W doświadczeniu wykorzystano następujące antybiotyki: penicylina, ciprofloksacyna, cefaklor, doksacyklina, oksacylina, kotrymoksazol, erytromycyna, ampicylina, klindamycyna, wankomycyna, gentamycyna, metronidazol (Oxoid).

Tabela 3

Wielkość stref zahamowania wzrostu otrzymanych dla badanego szczepu *L. plantarum* PL5 oraz szczepu wzorcowego *L. plantarum* ATCC 8014.

| Antybiotyk Stężenie | <i>L. plantarum</i> PL5 | <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Penicylina (P) 1 µg | 14 mm | 13 mm |
| Ciprofloksacyna (CIP) 5 µg | 12 mm | 11 mm |
| Cefaklor (CEC) 30 µg | 32 mm | 32 mm |
| Doksycyklina (DO) 30 µg | 27 mm | 26 mm |
| Oksacylina (OX) 1 µg | 12 mm | 11 mm |
| Kotrymoksazol (SXT) 25 µg | 16 mm | 25 mm |
| Erytromycyna (E) 15 µg | 29 mm | 26 mm |
| Ampicylina (AMP) 2 µg | 32 mm | 32 mm |
| Klindamycyna (DA) 2 µg | 18 mm | 18 mm |
| Gentamycyna (CN) 30 µg | 17 mm | 18 mm |
| Wankomycyna (VA) 30 µg | 6 mm | 6 mm |
| Metronidazol (MTZ) 5 µg | 6 mm | 6 mm |

Strefy zahamowania wzrostu szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 wokół krążków z antybiotykami przedstawiono na Fig. 3.

Zakres wrażliwości/oporności badanego szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 jest zgodny z opisem gatunku.

IV. Oznaczenie oporności szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 na sztuczny sok żołądkowy.

Celem badania było oznaczenie przeżywalności w sztucznym soku żołądkowym nowego szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5. W celu oznaczenia stopnia oporności bakterii z rodzaju *Lactobacillus* spp. na pH soku żołądkowego posłużono się metodą Clarka, którą zmodyfikowano w ten sposób, iż zamiast stężonego kwasu solnego zastosowano sztuczny sok żołądkowy o pH równym 1,2 według następującego przepisu: 2.0 g NaCl, 3.2 g pepsyny w 7 ml 36% HCl o pH 1.2 rozpuszczono w 1000 ml wody destylowanej. Jałowy (po przesączeniu) sztuczny sok żołądkowy rozlewano po 1 ml do jałowych probówek, a następnie do każdej, z nich kolejno dodawano po 100 μ l świeżej (24 godzinnej) hodowli szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 o znanej gęstości. Mieszaninę inkubowano przez 20 min w 37°C w warunkach ściśle beztlenowych. Po upływie wyznaczonego czasu mieszaninę starannie mieszano i wykonywano posiew dziesiętny w celu określenia otrzymanej gęstości końcowej.

Tabela 4

Przeżywalność szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 w sztucznym soku żołądkowym.

| | | Gęstość bakterii probiotycznych podana w j.t.k./ml | |
|------------------------------------|-------------------|---|--|
| Nazwa szczepu | Czas wyjściowy | Po 20 min. inkubacji w sztucznym soku żołądkowym o pH 2.5 | |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> PL5 | $1,3 \times 10^8$ | $8,0 \times 10^7$ | |

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 ma bardzo dobrą przeżywalność: spadek populacji po inkubacji jest w granicach błędów pomiaru.

V. Oznaczenie oporności szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 na sole żółci.

Celem badania było oznaczenie oporności na sole żółci nowego szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5. Oporność na sole żółci wyznaczono w oparciu o metodę Dashkevicz'a i Feighner'a (Dashkevicz M.P., Feighner S.D. 1989. Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. Applied and Environmental Microbiology. 55(1), 1–16). Metoda ta polegała na dodaniu do agaru MRS lub BL barwnika wskaźnikowego – purpury bromokrezolowej (POCH) w ilości 0,17 g/l oraz soli żółci (OXGAL Difco), w pięciu kolejnych stężeniach: 1 g/l, 2 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l. Na tak przygotowane stałe podłoża posiewano metodą redukcyjną po 100 μ l hodowli szczepu *L. plantarum* PL5, który następnie inkubowano w standardowych warunkach beztlenowych przez 48 godz. Po zakończonej inkubacji kolonie szczepów opornych na dane stężenie soli żółci nabierały koloru jasno żółtego, jak również podłoże wzrostowe zmieniało swoje zabarwienie z fioletowego na żółte. Intensywność wzrostu badanego szczepu i zabarwienia podłoża na kolor żółty oceniono w skali półilościowej od – do +++.

Tabela 5

Oporność szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 na sole żółci w stężeniach: 1, 2, 5, 10, 20 g/l.

| Stężenie soli żółci | <i>L. plantarum</i> PL5 |
|---------------------|-------------------------|
| 1 g/l | +++ |
| 2 g/l | +++ |
| 5 g/l | +++ |
| 10 g/l | ++ |
| 20 g/l | ++ |

Oporność szczepu PL 5 na sole żółci jest wystarczająca do przejścia dwunastnicy.

Oporność szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 na sole żółci w stężeniach: 1, 2, 5, 10, 20 g/l, przedstawiono na Fig. 4.

VI. Oznaczenie właściwości adherencyjnych szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 do ludzkiej linii tkankowej A431

Właściwości adherencyjne szczepu *L. plantarum* PL5 zostały przeprowadzone w odniesieniu do ludzkiej linii komórkowej nabłonka pochwy – A431. W celu zbadania adherencji badanego szczepu, hodowlę ludzkiej linii komórkowej nabłonka pochwy A431 prowadzono w atmosferze zawierającej 10% CO₂ oraz w temperaturze 37°C, w podłożu hodowlanym DMEM (Gibco) z dodatkiem 10% surowicy wołowej (FBS, Sigma-Aldrich). Płyny hodowlane wymieniano regularnie co 48 godzin. Po osiągnięciu zlewnego wzrostu hodowli jednowarstwowej, komórki przepłukiwano dwukrotnie PBS (IITD, Wrocław) i przeprowadzono badanie adherencji bakterii probiotycznych. Hodowlę tkankową linii A431 prowadzono dalej na powierzchni jałowych szkiełek podstawowych umieszczonych na dnie 24-dołkowych płytek do osiągnięcia na powierzchni szkiełek podstawowych zlewnego wzrostu. Następnie komórki przepłukiwano PBS bez jonów Ca²⁺ i Mg²⁺ (IITD PAN; Wrocław) i dodawano do kolejnych dołków po 600 µl odpowiednio przygotowanej próbki. Szczep *L. plantarum* PL5 hodowano w 10 ml płynnego podłoża MRS (Oxoid) przez 24 godziny w warunkach beztlenowych w temperaturze 37°C. Po upływie tego czasu, sprawdzano gęstość hodowli za pomocą rozcieńczeń dziesiętnych. Do każdego dołka zawierającego wyhodowaną tkankę dodawano po 100 µl płynnej hodowli bakterii probiotycznych i uzupełniano 900 µl świeżego podłoża DMEM. Końcowa gęstość populacji badanej bakterii wynosiła w 1 ml około 1 x 10⁸ j.t.k. Następnie komórki linii tkankowych wraz z badanym szczepem inkubowano w temp. 37°C w atmosferze o zwiększonej wilgotności i przy 10% zawartości CO₂ przez okres 1 godziny. Po tym czasie komórki przepłukiwano PBS w celu usunięcia nie przywartych bakterii, a następnie całość utrwalało 3.7% paraformaldehydem w temperaturze 4°C przez okres 3 godzin. Następnie szkiełka płukano PBS i przeprowadzono ich barwienie metodą Grama. Preparat był oceniany w mikroskopie świetlnym pod powiększeniem 1000x. Komórki badanego szczepu *L. plantarum* PL5, które zaadherowały do linii, tkankowej były zliczane w 5 polach widzenia preparatu, a następnie wyliczono wynik średni, któremu przyporządkowano odpowiedni, stopień adherencji zgodnie z zakresem podanym poniżej:

+++ bardzo wysoki stopień adherencji (powyżej 80 komórek bakteryjnych w polu widzenia)

++ wysoki stopień adherencji (od 60 do 80 komórek bakteryjnych w polu widzenia)

- + średni stopień adherencji (od 40 do 60 komórek bakteryjnych w polu widzenia)
- słaby stopień adherencji (poniżej 40 komórek bakteryjnych w polu widzenia).

T a b e l a 6

Wyniki adherencji szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 do ludzkiej linii tkankowej A431.

| Nazwa szczepu | Stopień adherencji | Średnia liczba komórek bakteryjnych w polu widzenia |
|-------------------------|--------------------|---|
| <i>L. plantarum</i> PL5 | ++ | 60-80 |

Adherencja szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 do nabłonka pochwy jest bardzo efektywna.

Adherencję szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 do ludzkiej linii tkankowej A431 przedstawiono na Fig.5.

VII. Badanie właściwości antyoksydacyjnych szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5

VII.1. Pomiar produkcji nadtlenu wodoru.

W celu dokonania pomiaru produkcji nadtlenu wodoru przez badany szczep wykorzystano test paskowy firmy Merck, który zmienia intensywność zabarwienia w zależności od ilości nadtlenu wodoru uwalnianego do płynnych hodowli lej bakterii (od 0 do 100 mg/ml). Barwę porównywano z odpowiednią skalą kolorymetryczną pozwalającą jednocześnie na wyliczenie przybliżonej wartości wyprodukowanego nadtlenu wodoru (wynik podano w mg/L). Zdolność produkcji nadtlenu wodoru w płynnym podłożu wzrostowym przez szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 badano przez zawieszenie bakterii w 2 ml płynnego podłoża MRS Broth (Oxoid). Gęstość wyjściowa bakterii wyniosła średnio 1×10^6 j.t.k./ml. Następnie hodowlę inkubowano w warunkach tlenowych w 37°C, intensywnie wytrząsając na wytrząsarce w celu zwiększenia natlenienia komórek bakteryjnych. Pomiar wykonywano dwukrotnie, tj. po upływie 4 i 24 godzin od rozpoczęcia badania.

Gęstość populacji badanych bakterii po 4 godzinach utrzymywała się na poziomie średnio 1×10^6 j.t.k./ml. zaś po 24 godzinach wzrosła do poziomu średnio 1×10^7 j.t.k./ml. Kontrolnie produkcję H₂O₂ mierzono również w tym samym podłożu bez bakterii. Wyniki zestawiono w Tabeli nr 7.

T a b e l a 7

Produkcja nadtlenu wodoru (mg/L) przez szczep *Lactobacillus plantarum* PL5.

| Szczep | 4 godziny | 24 godziny |
|------------------------------------|-----------|------------|
| <i>Lactobacillus plantarum</i> PL5 | 0 mg/L | 0 mg/L |

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 nie produkuje nadtlenu wodoru.

Fig.6. przedstawia test obrazujący produkcję nadtlenu wodoru przez szczep *Lactobacillus plantarum* PL5.

VII.2. Pomiar kinetyki rozkładu nadtlenu wodoru przez szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 w oparciu o test paskowy firmy Merck.

Do probówek zawierających 2 ml podłoża MRS Broth (Oxoid) dodawano po jednym oczku ezy kalibrowanej (1 µl) hodowli badanego szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 (pobranego z sektora świeżej hodowli na agarze MRS). Następnie probówkę inkubowano przez 24 godziny w temp. 37°C w warunkach tlenowych. Po upływie tego czasu hodowlę mieszano z czystym chemicznie nadtlakiem wodoru, aby jego końcowe stężenie wyniosło 30 mg/L. Jako kontroli używano nieposianego podłoża MRS, do którego również dodawano po 30 mg/L nadtlenu wodoru. Pomiar kinetyki rozkładu nadtlenu wodoru przeprowadzono czterokrotnie w odpowiednich odstępach czasu.

wych. W celu sprawdzenia liczby mikroorganizmów uzyskanych w hodowli wykonywano posiewy kontrolne na płytce z podłożem MRS (Oxoid). Liczba komórek; bakteryjnych w zawiesinie wyjściowej kształtowała się na poziomie 1×10^8 j.t.k./ml.

Wyniki pomiaru kinetyki rozkładu H_2O_2 w oparciu o test paskowy zestawiono w Tabeli nr 8.

T a b e l a 8

Wyniki pomiarów kinetyki rozkładu nadtlenu wodoru przez szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 w oparciu o metodę paskową.

| Badany szczep | 0 min. | 30 min. | 60 min. | 90 min. | 120 min. | 150 min. | 180 min. | 210 min. | 24 godz. |
|--|-----------|------------|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Ilość nadtlenu wodoru (mg/L) | | | | | | | | | |
| <i>Lactobacillus plantarum PL5</i> | 100 | 10 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 rozkłada całkowicie 30 mg/L nadtlenu wodoru w ciągu 90 min.

Jak wykazano, szczep bakterii *Lactobacillus plantarum* PL5 wykazuje aktywny rozkład nadtlenu wodoru. Efekt rozkładu jest związany z produkcją nie tylko katalazy, ale także pseudokatalazy tj. białka które zamiast hemu zawiera jon manganu i wykazuje znaczną aktywność wobec substratu w różnych warunkach środowiskowych. Aktywny rozkład nadtlenu wodoru przez katalazę wyprodukowaną przez *L. plantarum* PL5 prowadzi do wygaszenia reakcji Fentona, która przebiega w następujący sposób: $Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow *OH + OH^- + Fe^{3+}$

VIII. Antagonistyczne działanie szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 wobec grzybiczych czynników etiologicznych, powodujących zakażenia pochwy i sromu.

VIII.1. Zmodyfikowana metoda półilościowa wg Fitzsimmons i Berry.

W badaniu posłużono się zmodyfikowaną metodą półilościową według Fitzsimmons i Berry (Strus M. Kucharska A., Kukla G, Brzychczy-Włoch M., Maresz K., Heczko P.B., The in vitro activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida*. Infect. Dis. Obstet. Gynecol. 2005; 13:69–75).

Do badania wybrano szczepy wzorcowe pochodzenia ludzkiego z kolekcji ATCC:

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Candida glabrata* ATCC 15126
- *Candida krusei* ATCC 34135
- *Candida tropicalis* ATCC 750
- *Candida kefyr* ATCC 4135.

Metoda polegała na zastosowaniu podłoży dwuwarstwowych. Pierwszą warstwę stanowiło podłoże dla wzrostu bakterii z rodzaju *Lactobacillus spp.* oparte na związkach chemicznych o składzie:

- Ekstrakt drożdżowy (Argenta)
- Bezwodny octan sodu (Argenta)
- Cytrynian sodu (Argenta)
- Siarczan magnezu (Argenta)
- Chlorek manganu (Argenta)
- Siarczan amonu (Argenta)
- Glukoza (Argenta)

Na podłoże to posiewano w formie paska o szerokości 2 cm badany szczep *Lactobacillus plantarum* PL5. Po posiewie płytki inkubowano w temp. 37°C, w warunkach beztlenowych przez 48 godzin, a po upływie tego czasu na wierzch wylewano drugie, lekko przestudzone, płynne podłoże Sabouraud Dextrose (Biocorp) w kierunku wzrostu grzybów wskaźnikowych. Po zastygnięciu, na podłoże wysiewano grzyba z rodzaju *Candida spp.* o gęstości 0,5 MacFarlanda. Następ-

nie płytki umieszczano na 4 godziny w lodówce (temperatura 4°C), a po upływie tego czasu dalszą inkubację prowadzono już w warunkach tlenowych, w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Uzyskane wyniki oceniono według następującego wzoru:

- Brak działania antagonistycznego *Lactobacillus* wobec szczepu *Candida* (nie zaobserwowano żadnej strefy zahamowania wzrostu *Candida* wzdłuż paska z wymazanym szczepem probiotycznym),
- + Częściowe działanie antagonistyczne *Lactobacillus* wobec szczepu *Candida* (obserwuje się lekkie zahamowania wzrostu *Candida* jedynie nad paskiem z wymazanym szczepem probiotycznym),
- ++ Wyraźne działanie antagonistyczne *Lactobacillus* wobec szczepu *Candida* (obserwuje się wyraźne zahamowania wzrostu *Candida* nad paskiem z wymazanym szczepem probiotycznym czasami wyraźniej w jego górnej i dolnej części),
- +++ Bardzo silne działanie antagonistyczne *Lactobacillus* wobec szczepu *Candida* (obserwuje się wyraźne zahamowania wzrostu *Candida* nad paskiem i poza jego powierzchnię wzdłuż całej linii posiewu szczepu probiotycznego).

Tabela 9

Antagonistyczne działanie szczepu bakterii *Lactobacillus plantarum* PL5 wobec grzybów z rodzaju *Candida* spp. przy zastosowaniu metody półilościowej.

| Szczep bakterii z rodzaju <i>Lactobacillus</i> | <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 | <i>Candida glabrata</i> ATCC 15126 | <i>Candida krusei</i> ATCC 34135 | <i>Candida tropicalis</i> ATCC 750 | <i>Candida kefir</i> ATCC 4135 |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| PL 5 | +++ | - | +/- | +++ | +++ |

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 wykazuje silne działanie antagonistyczne wobec gatunków *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefir*, zaś słabe wobec *C. krusei* i żadne wobec *C. glabrata*.

Fig. 7 przedstawia antagonistyczne działanie szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 wobec *Candida albicans* AICC 10231 z wykorzystaniem metody półilościowej.

VIII.2. Metoda ilościowa.

W metodzie ilościowej szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 oraz szczepy z rodzaju *Candida* spp. hodowano w tej samej próbówce zawierającej po 900 mikrolitrów 24-godzinnej hodowli *Lactobacillus* o średniej gęstości 1×10^9 j.t.k./ml oraz 100 mikrolitrów 24-godzinnej hodowli grzyba wskaźnikowego o średniej gęstości 1×10^6 j.t.k./ml. Całość dalej hodowano, a po upływie 8 i 24 godzin od rozpoczęcia badania materiał posiewano ilościowo na stałe podłoże przeznaczone do wzrostu *Lactobacillus* oraz na stałe podłoże Sabouraud'a przeznaczone do wzrostu chorobotwórczych grzybów wskaźnikowych. Obliczano liczebność obu populacji, a wynik podawano w jednostkach tworzących kolonie w przeliczeniu na 1 ml (j.t.k./ml).

Antagonistyczne działanie szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 wobec wybranych gatunków grzybów drożdżopodobnych z wykorzystaniem metody ilościowej przedstawiono na Fig. 8.

Wynika z niej, że szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 jest w stanie hamować wzrost badanych gatunków grzybów drożdżopodobnych w wymaganym zakresie 2 log w ciągu 24 godzin. Dla gatunku *C. albicans* hamowanie wzrostu jest bardzo silne.

IX. Antagonistyczne działanie szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 wobec wybranych bakteryjnych czynników etiologicznych, powodujących zakażenia pochwy i sromu.

Do badania wybrano następujące szczepy wskaźnikowe:

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Streptococcus agalactiae* ATCC 13813
- *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 zawieszano w 10 ml bulionu MRS, a następnie hodowano, przez 24 godziny w warunkach beztlenowych, w temperaturze 37°C. Po upływie tego czasu sprawdzano gęstość hodowli za pomocą metody, rozcieńczeń dziesiętnych, a następnie z hodowli bakterii pobierano po 0,9 ml i dodawano do nich po 0,1 ml próbek zawierających 24-godzinne, świeże hodowle szczepów bakterii wskaźnikowych. Całość inkubowano w warunkach tlenowych, jedynie w przypadku antagonistycznego działania szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 na beztlenowy szczep *Gardnerella vaginalis* ATCC 14018, mieszaninę umieszczano w warunkach ściśle beztlenowych. Po upływie 8 i 24 godzin z każdej z mieszanych hodowli wykonywano rozcieńczenia dziesiętne, wysiewając kolejno po 0,1 ml mieszaniny równolegle na odpowiednie dwa podłoża, zarówno w kierunku bakterii *Lactobacillus*, jak i bakterii wskaźnikowych. Liczbę kolonii zliczano, a wyniki podano w jednostkach tworzących kolonie w przeliczeniu na 1 ml (j.t.k./ml).

Tabela 10

Antagonistyczne działanie szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 wobec wybranych bakterii wskaźnikowych, przy zastosowaniu metody ilościowej.

| Szczep | 0 godz. j.t.k./ml | 8 godz. j.t.k./ml | 24 godz. j.t.k./ml |
|---|----------------------|----------------------|-----------------------|
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | $7,0 \times 10^7$ | 0 | 0 |
| <i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i> ATCC 13813 | $2,0 \times 10^7$ | 0 | 0 |
| <i>Gardnerella vaginalis</i> ATCC 14018 | $6,0 \times 10^6$ | 0 | 0 |
| Kontrola hodowli <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 | $7,0 \times 10^7$ | 1,0 x 10^8 | $1,0 \times 10^8$ |
| Kontrola hodowli <i>Streptococcus</i> <i>agalactiae</i> ATCC 13813 | $2,0 \times 10^7$ | 3,0 x 10^6 | $3,0 \times 10^8$ |
| Kontrola hodowli <i>Gardnerella vaginalis</i> ATCC 14018 | $6,0 \times 10^6$ | 1,0 x 10^8 | $1,0 \times 10^8$ |

Antagonistyczne działanie szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 wobec wybranych bakterii wskaźnikowych, przy zastosowaniu metody ilościowej przedstawiono na Fig. 9, („***” całkowita redukcja liczebności bakterii).

Szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 wykazuje wybitne działanie wobec najważniejszych czynników patogennych powodujących stany zapalne pochwy.

X. Sekwencjonowanie NGS (next generation sequencing) genomu szczepu bakterii *Lactobacillus plantarum* PL5.

Z uwagi na duże podobieństwo pomiędzy szczepami bakterii probiotycznych pochodzenia ludzkiego metodą, która pozwala na ich zróżnicowanie jest sekwencjonowanie pełnego genomu metodą NGS (*next generation sequencing*).

Metoda ta opiera się o równoległe, masowe sekwencjonowanie od kilku tysięcy do kilkuset milionów różnych matryc tzw. bibliotek. Tym samym charakteryzuje ją bardzo wysoka przepustowość oraz analiza ogromnej ilości danych w stosunkowo krótkim czasie.

W celu przeprowadzenia sekwencjonowania NGS genomu szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 wykonano izolację genomowego DNA z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody opartej na zestawie Genomic Midi AX (A&A Biotechnology), Stężenie genomowego DNA zostało, zmierzone przed procedurą przygotowania bibliotek metodą fluorymetryczną z użyciem odczynnika PicoGreen (Life Technologies, PI 1496, LOT 1597051). Pomiar wykonano na aparacie Infinite firmy Tecan. W Tabeli 11 zestawiono parametry wyizolowanego DNA.

Tabela 11

Charakterystyka wyizolowanego DNA szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5.

| Szczep | Stężenie wyizolowanego DNA | A _{260/280} |
|------------------------------------|----------------------------|----------------------|
| <i>Lactobacillus plantarum</i> PL5 | 377 µg/ml | 1.84 |

Genomowe DNA zostało po fragmentowane metodą sonikacji używając Covaris E210 (Covaris, numer seryjny E210-220), zgodnie z parametrami zalecanymi do przygotowania bibliotek do sekwencjonowania w technologii Illumina. Biblioteki zostały przygotowane z użyciem zestawu NEBNext® DNA Library Prep Master Mix Set for Illumina® (New England Biolabs, E6040L, data ważności 06/16) zgodnie z zaleceniami producenta.

Sekwencjonowanie wykonano z użyciem sekwenatora MiSeq, w technologii parowanych końców (ang.: paired-end; PE), 2 x 250 nt, z użyciem kitu v2 Illuminy, zgodnie z protokołem „Preparing Libraries for Sequencing on the MiSeq” (15039740 rev. D).

Odczyty przefiltrowano programem Cutadapt w wersji 1.16. Mapowanie do genomu referencyjnego *Lactobacillus plantarum* strain HFC8 (CP012650.1) oraz generowanie sekwencji konsensusową dla badanej próbki przeprowadzono przy pomocy programu CLCGenomicWorkbench.

W wyniku sekwencjonowania uzyskano pliki danych z odczytami sekwencji DNA – po dwa odczyty na każdy sekwencjonowany fragment. Dane zostały automatycznie rozdzielone na próbki z użyciem oprogramowania MiSeq Reporter (wersja 2.3), dostępnego na aparacie MiSeq. Informacje na temat liczby odczytanych surowych, sekwencji i zasad dla badanego szczepu znajdują się w Tabeli 12. Sekwencję genomową szczepu *L. plantarum* PL5 prezentuje Załącznik w postaci elektronicznej.

Tabela 12

Liczba odczytanych surowych sekwencji i zasad dla szczepu *L. plantarum* PL5.

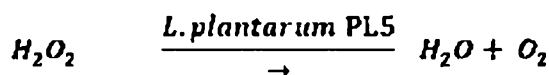
| Nazwa szczepu | Odczyty surowe | Odczyty przycięte | Zasady surowe [mln] | Zasady przycięte [mln] |
|------------------------------------|----------------|-------------------|---------------------|------------------------|
| <i>Lactobacillus plantarum</i> PL5 | 2168528 | 2163966 | 544.300528 | 502.852599 |

Za pomocą sekwencjonowania całego genomu szczepu PL5 uzyskano pełny wgląd w strukturę genetyczną potwierdzającą jego funkcjonalność. Ponadto poznanie indywidualnych sekwencji umożliwia pełne zabezpieczenie jego tożsamości do celów patentowych.

Podsumowanie wyników badań.

Przeprowadzone badania wykazały, że szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 posiada specyficzne, indywidualne cechy różniące go od pozostałych szczepów probiotycznych:

- posiada wyjątkową cechę jaką jest zdolność do wytwarzania znacznych ilości antyoksydacyjnego enzymu: katalazy, rozkładającej nadtlenek wodoru. Badania jednoznacznie wykazały, że szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 należy do nielicznych szczepów bakterii probiotycznych posiadającej tą pożądaną dla probiotyków zdolność, która ma kluczowe znaczenie w wygaszaniu stanów zapalnych wynikłych z nadprodukcji nadtlenu wodoru pochodzącego z aktywowanych komórek układu immunologicznego bądź będącego wynikiem produkcji przez inne bakterie z rodzaju *Lactobacillus spp.* szczególnie w drogach rodnych (zjawisko to obserwowane jest w przypadkach np. zapalenia pochwy związanego z przerostem gatunków *Lactobacillus* produkujących nadtlenek wodoru określanego jako *Lactobacillosis*):



- jako jeden z pierwszych szczepów pochodzenia ludzkiego, wyizolowanego w Polsce, posiada w pełni poznaną sekwencję genomową wyznaczoną przy pomocy NGS (*next generation sequencing*) – w chwili obecnej najnowocześniejszej technologii sekwencjonowania,
- został wyizolowany z tylnego sklepienia pochwy zdrowej kobiety w wieku rozrodczym i stąd wykazuje wysoki stopień adherencji do ludzkiej linii tkankowej nabłonka pochwy dzięki czemu może blokować adherencję innych bakterii i grzybów chorobotwórczych,
- dodatkowo wykazuje dużą oporność na niskie pH i działanie sztucznego soku żołądkowego. Szczep ten po upływie 20 min zredukował swoją populację tylko o 1 log, co może świadczyć o jego doskonałym przystosowaniu do niesprzyjających warunków panujących w ludzkim przewodzie pokarmowym, czy niskiego pH w drogach rodnych, stąd może być z powodzeniem stosowany w preparatach doustnych czy dopochwowych,
- wykazuje bardzo silne działanie wobec patogennych grzybów z rodzaju *Candida spp.* (*Calbicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*). Taki efekt działania szczepu *Lactobacillus plantarum* PL5 może wskazywać na możliwość zastosowania go do zapobiegania i wspomagania leczenia stanów zapalnych dróg rodnych określanych jako grzybi-ca pochwy i sromu,
- wykazuje wysoką skuteczność wobec patogennych bakterii powodujących stany zapalne pochwy (*Streptococcus agalactiae*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis*) i może być wykorzystany jako składnik czynny preparatu probiotycznego do dietetycznego postępowania w zaburzeniach flory układu moczowo-płciowego u kobiet.

Przeprowadzone badania uzasadniają wykonanie preparatu w postaci środka spożywczego lub w postaci żelu/maści do użytku miejscowego.

Zastrzeżenia Patentowe

1. Nowy szczep *Lactobacillus plantarum* oznaczony symbolem PL5, zdeponowany zgodnie z traktatem budapeszteńskim o międzynarodowym uznawaniu depozytu drobnoustrojów dla celów postępowania patentowego, w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów (PCM) w Instytucie Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu pod numerem depozytowym B/00110 charakteryzujący się wysoką zdolnością do wytwarzania katalazy, enzymu rozkładającego nadtlenek wodoru.
2. Nowy szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 według zastrz. 1, **znamienny tym**, że posiada zdolność hamowania wzrostu grzybów drożdżopodobnych powodujących zakażenia dróg rodnych i przewodu pokarmowego.

3. Nowy szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 według zastrz. 1, **znamienny tym**, że posiada zdolność hamowania rozwoju patogennych bakterii powodujących stany zapalne pochwy.
4. Nowy szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 według zastrz. 1, **znamienny tym**, że posiada w pełni poznaną sekwencję genomową odróżniającą go od innych szczepów bakterii.
5. Nowy szczep *Lactobacillus plantarum* PL5 zdeponowany w Polskiej Kolekcji Mikroorganizmów pod numerem B/00110 do zastosowania w produkcie do leczenia stanów zapalnych dróg rodnych i przewodu pokarmowego.

Rysunki

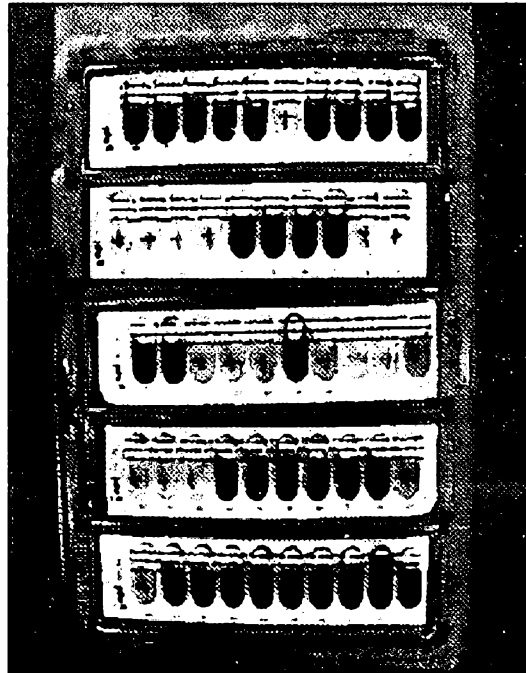


Fig. 1

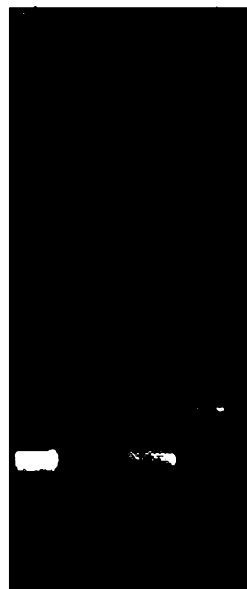


Fig. 2

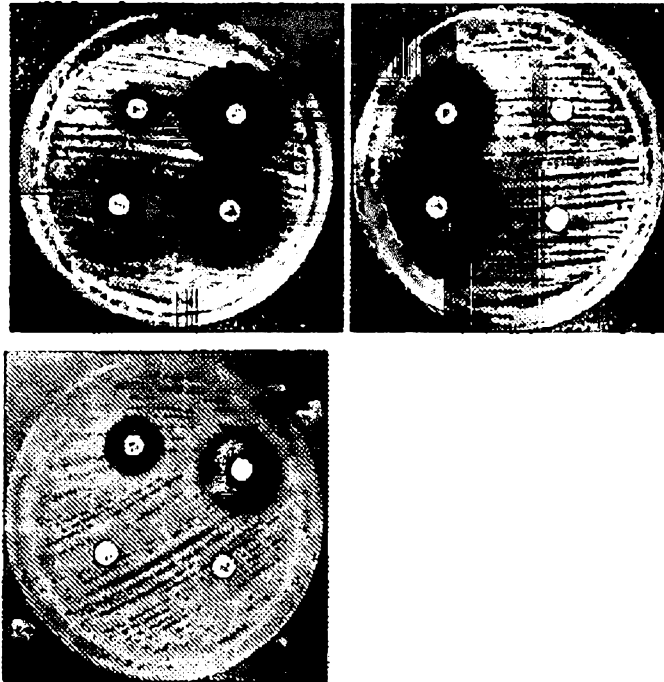


Fig 3.



Fig. 4

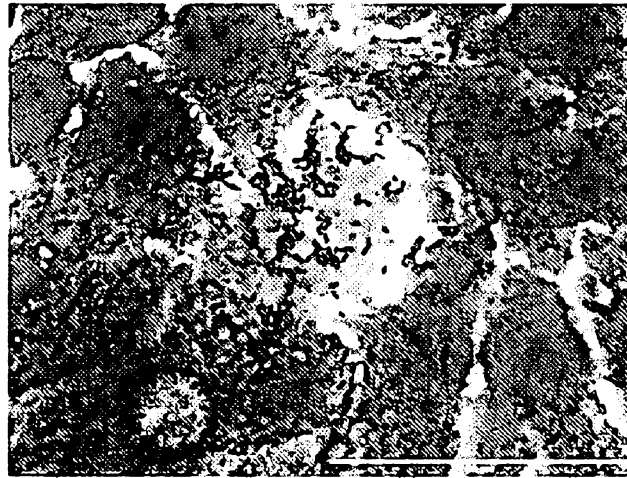


Fig. 5

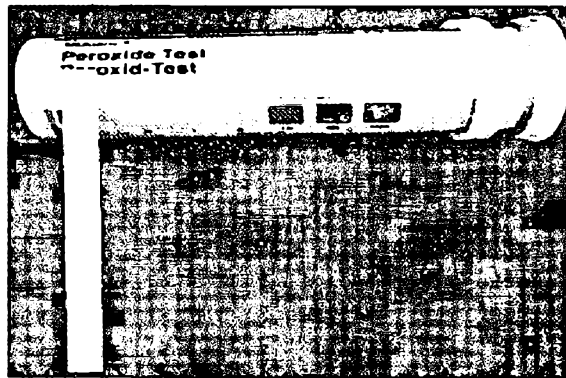


Fig.6

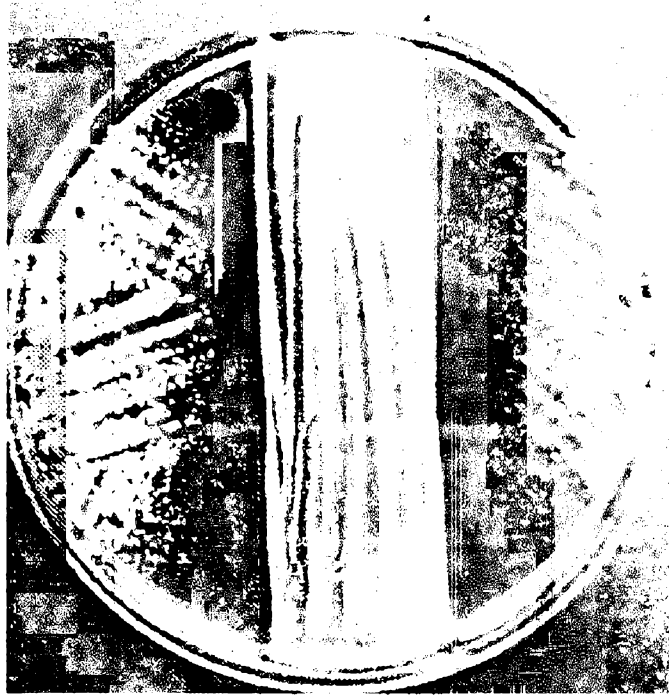


Fig. 7

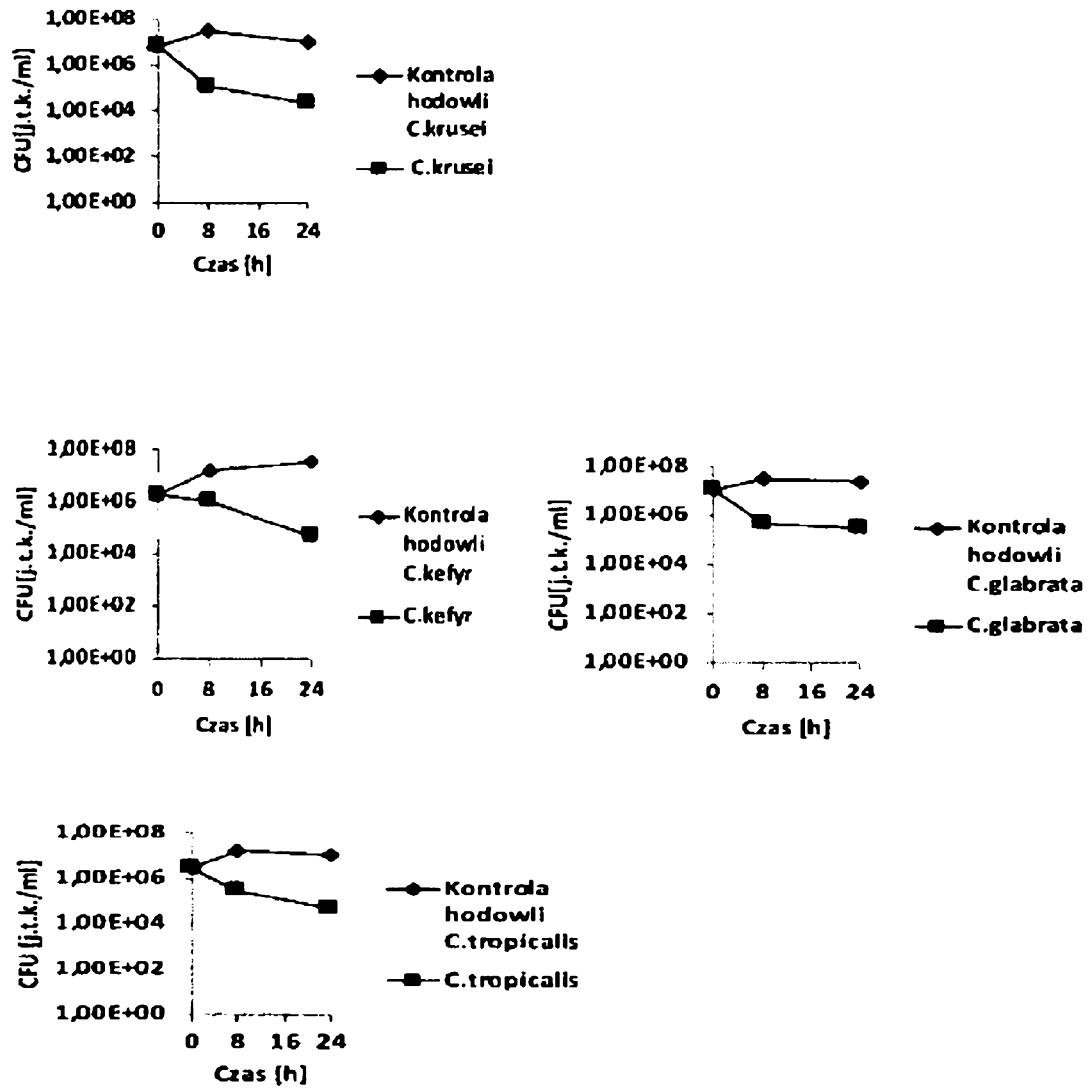


Fig. 8

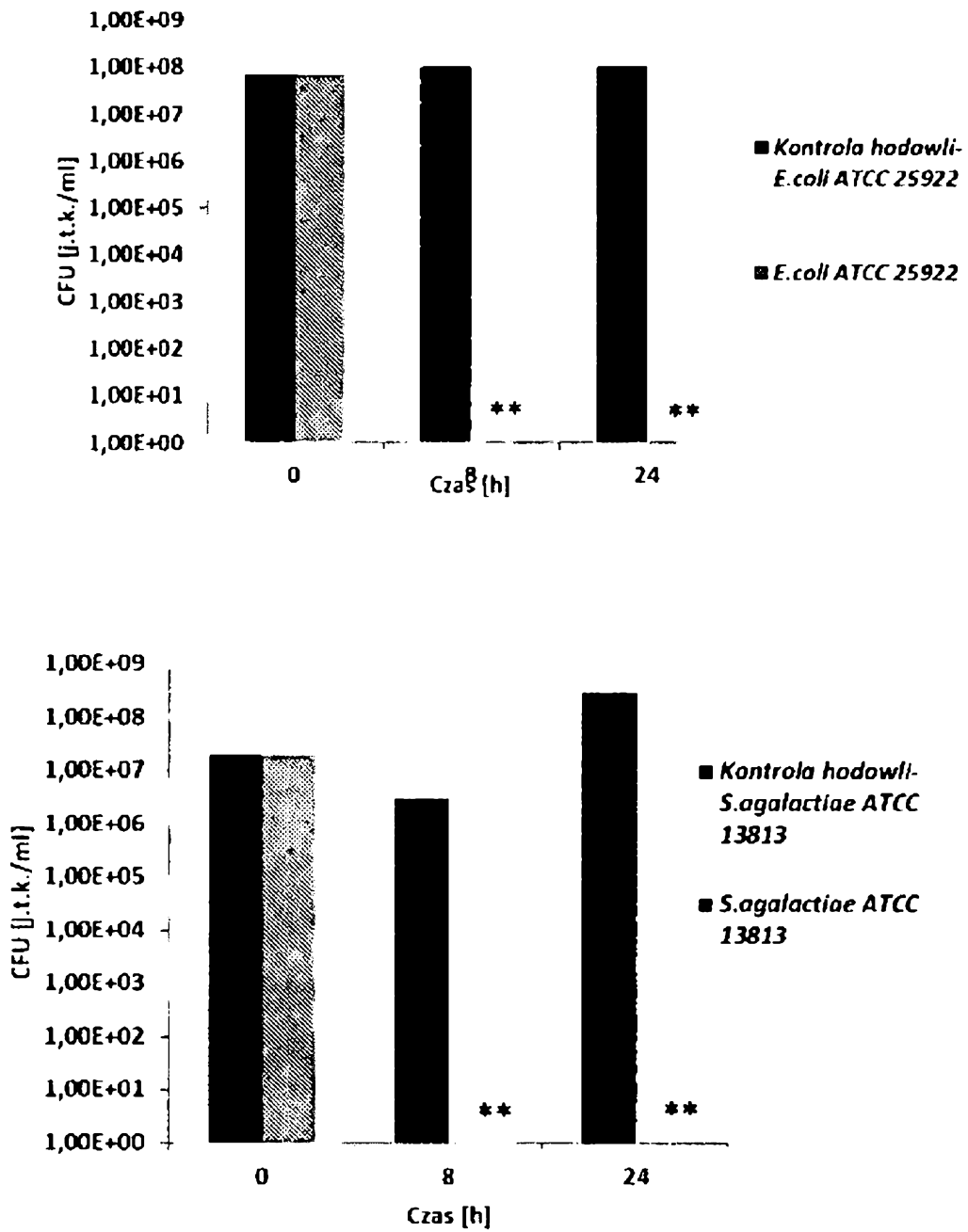


Fig. 9

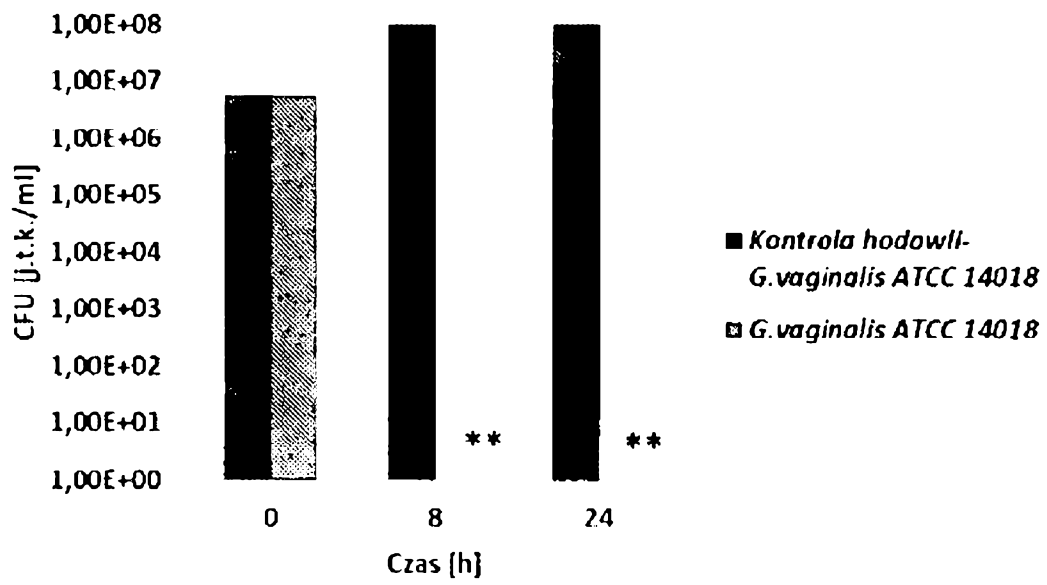


Fig. 9 (kontynuacja)