

ELŻBIETA KLEWICKA, ZDZISŁAWA LIBUDZISZ,
DANUTA CZAJKA, KARINA KUC

ANTAGONISTYCZNA AKTYWNOŚĆ BAKTERII FERMENTACJI MLEKOWEJ *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

Streszczenie

W pracy określono aktywność antagonisticzną 20 szczepów *L. acidophilus* w stosunku do mikroflory patogennej i zanieczyszczającej żywność: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, jak również w odniesieniu do dwóch szczepów bakterii mlekowych: *L. acidophilus* ATCC 4356 i *L. rhamnosus* GG ATCC 53105. Stwierdzono, iż wszystkie badane szczepy *L. acidophilus* wykazują zdolność hamowania organizmów wskaźnikowych. Spośród 20 kultur bakterii mlekowych wytypowano 11, które charakteryzowały się najwyższą aktywnością przeciwbakteryjną.

Porównanie 5 metod oznaczania antagonizmu pozwoliło ponadto na dobranie odpowiedniej metody badawczej. Najlepsze wyniki uzyskano stosując metodę: słupkową i kropelkową. Metody te pozwalają na zachowanie dobrych warunków dyfuzji związków antagonisticznych.

Wstęp

Bakterie fermentacji mlekowej powszechnie wykorzystywane są do biokonserwacji żywności pochodzenia roślinnego i zwierzęcego. Biologiczna konserwacja żywności poprzez niedopuszczenie do rozwoju mikroorganizmów zanieczyszczających żywność, w tym również patogennych, jest możliwa między innymi dzięki produktom przemiany materii bakterii fermentacji mlekowej, takim jak:

- **kwasy organiczne:** kwas mlekowy, kwas octowy, kwas 2-pirolidono-5-karboksyłowy,
- **enzymy:** układ laktoperoksydaza + nadtlenek wodoru, lizozym (w przypadku mutantów otrzymanych na drodze rekombinacji DNA),
- **niskocząsteczkowe produkty przemiany materii:** reuteryna, diacetyl, kwasy tłuszczowe,

- bakteriocyny,
- nadtlenek wodoru.

Przeciwdrobnoustrojowe działanie wymienionych produktów metabolizmu LAB często wynika z ich synergizmu, jak również zależy od czynników środowiskowych, do których należą: temperatura, uwodnienie, skład chemiczny i pH środowiska.

Biokonserwacja surowców spożywczych na drodze fermentacji pozwala ponadto na rezygnację lub zmniejszenie stosowanych konserwantów chemicznych [3]. Za szczególnie cenne należy uznać zastosowanie do fermentacji żywności kultur LAB o uzdolnieniach probiotycznych.

Bakterie kwasu mlekowego zastosowane jako probiotyki są nową alternatywą w stabilizacji mikroflory jelitowej, gdzie poprzez kolonizację nabłonka jelit zabezpieczają organizm gospodarza przed niektórymi mikroorganizmami wywołującymi zatrucia pokarmowe. Ponadto bakterie te dzięki regulacji mikroflory błony śluzowej jelit ograniczają (hamują) aktywność tzw. enzymów fekalnych - β -glukuronidazy, reduktazy tlenu azotu czy reduktazy azotynowej, katalizujących przemianę związków prokancerogennych do kancerogennych [2, 4].

W żywności fermentowanej bakterie mlekowe odpowiedzialne są za kształtowanie cech sensorycznych, przedłużenie trwałości, oraz zwiększenie wartości odżywczej i dietetycznej. Od probiotycznych bakterii kwasu mlekowego stosowanych w przetwórstwie żywności wymaga się bezpieczeństwa zdrowotnego, odporności na działanie soku żołądkowego i żółci, tworzenia niewielkich ilości kwasu D(-)-mlekowego, adhezji do błony śluzowej jelit oraz wysokiej aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Celem podjętych badań była charakterystyka posiadanej kolekcji bakterii *Lactobacillus acidophilus* i wybór szczepów o wysokiej aktywności hamowania wzrostu mikroorganizmów odpowiedzialnych za psucie się żywności oraz chorobotwórczych dla człowieka. Zmierzano również do wyboru metody kontroli aktywności antagonisticznej bakterii mlekowych.

Materiały i metody

Materiałem badawczym było 20 szczepów *Lactobacillus acidophilus*. Szczepy oznaczone symbolami: Ros, 172, H-1, Ch-2, In3, Cz-1, 343, 336, Ind1, 20T1 otrzymano z zakładu Biolacta - Texel w Olsztynie; Bauer, Ch-5, A92, Diat, Nestle pochodzą z Prague Technical University, Dept. Milk Fat Technology; szczepy NCAINB 1075, NCAINB 1152 pochodzą z National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms w Budapeszcie, natomiast szczepy 1, 03, B należą do kolekcji LOCK 105 w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej. Badaniami również objęto dwa szczepy referencyjne - *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 oraz *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53105 otrzymane z Collegium Medicum Uniwer-

sytetu Jagiellońskiego w Krakowie, które służyły zarówno jako materiał antagonizujący i kontrolny. Jako mikroorganizmy wskaźnikowe stosowano oprócz referencyjnych bakterii mlekowych, szczepy bakterii wzorcowych otrzymane z Państwowego Zakładu Higieny: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 oraz szczepy *Escherichia coli* i *Pseudomonas fluorescens* z kolekcji własnej Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii PŁ.

Bakterie uaktywniano z zamrożonych 24-godzinnych hodowli (zawierających 20% glicerolu), poprzez dwukrotny pasaż w podłożu płynnym MRS (bakterie mlekowe) lub w bulionie wzbogaconym (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*). Bakterie mlekowe hodowano w inkubatorze w obecności 5% (v/v) CO₂, w temperaturze 37°C, pozostałe w kulturze hodowano warunkach tlenowych, w temperaturze 37°C.

W badaniach antagonizmu międzyszczepowego zastosowano 5 metod.

Metoda kropelkowa polega na równoległym wzroście szczepu wskaźnikowego i badanego. Na podłoże MRS nanoszono w formie kropli 5 µl hodowli bakterii antagonizujących, po 24-godzinnej inkubacji powierzchnię zalewano murawą zawierającą szczep wskaźnikowy w ilości 10⁵–10⁶ jtk/ml. Płytki ponownie inkubowano przez 24 godziny. Wyniki odczytywano jako strefy zahamowania wzrostu szczepu wskaźnikowego, mierzone w mm, odejmując średnicę hodowli szczepu antagonizującego.

Metoda słupkowa [5] oparta jest również na równoległym wzroście szczepów badanych (wskaźnikowego i antagonizującego). Z przerośniętego bakteriami mlekowymi (24 h) stałego podłoża MRS wycinano słupki o średnicy 10 mm i umieszczano je na płytkach z murawą zaszczepioną szczepem wskaźnikowym (10⁵–10⁶ jtk/ml). Po 24 godzinach inkubacji odczytywano strefy przejaśnienia murawy wokół słupków. Wynik podawano w mm po odjęciu średnicy słupka.

Metoda studzienkowa A – w podłożu stałym zaszczepionym szczepem wskaźnikowym (10⁵–10⁶ jtk/ml) wycinano studzienki o średnicy 10 mm. Następnie do studzienek wprowadzano 24-godzinne hodowle płynne szczepów antagonizujących, które następnie zestalano w studzienkach poprzez dodatek agaru, w ilości 1% (v/v). Po dobowej inkubacji mierzono średnice hamowania wzrostu organizmu wskaźnikowego. Wynik podawano w mm, jako różnicę pomiędzy średnicą hamowania wzrostu szczepu wskaźnikowego a średnicą studzienki.

Metoda studzienkowa C [1] – murawę zawierającą szczep wskaźnikowy przygotowano jak poprzednio. Do studzienek wprowadzano odwirowaną i przefiltrowaną przez filtr bakteriologiczny o średnicy porów 0,2 µm, ciecz po 24-godzinnej hodowli szczepu antagonizującego, w ilości 60 µl. Po 24 godzinach inkubacji odczytywano strefy hamowania wzrostu szczepu wskaźnikowego, po uwzględnieniu (odjęciu) średnicy studzienki. Wynik podawano w mm.

Metoda krążkowa – w metodzie tej również zastosowano ciecz po hodowli szczepów antagonisticznych (przygotowanej w identyczny sposób jak w metodzie studzienkowej C). Na murawie zawierającej szczep wskaźnikowy, umieszczano bibułowe krążki o średnicy 5 mm, nasączone cieczą po hodowli szczepów antagonisticznych. Po 24 godzinach inkubacji odczytywano strefy hamowania wzrostu mikroorganizmu wskaźnikowego. Wyniki podawano w mm, jako różnicę średnicy hamowania wzrostu organizmu wskaźnikowego i średnicy bibułowego krążka.

Wyniki i dyskusja

Metody szybkiego wykrywania antagonisticznych właściwości mikroorganizmów oparte są na mechanizmie dyfuzji substancji hamujących w żelu. Produkty przemiany materii bakterii mlekowych, zarówno kwasy organiczne, ich pochodne jak i niskocząsteczkowe produkty takie jak diacetyl, reuteryna, a nawet bakteriocyny mają możliwość równomiernego rozprzestrzeniania się w środowisku żelowym.

Należy jednak pamiętać, że skład i ilość wytwarzanych metabolitów jest cechą bardzo indywidualną czyli szczepową. W obrębie jednego gatunku mogą występować organizmy o szerokim spektrum działania antagonisticznego, jak i takie które nie posiadają takich właściwości lub są one bardzo słabo zaznaczone. Ponadto wpływ na jakość i ilość wytwarzanych metabolitów mają czynniki środowiskowe: skład podłoża wzrostowego, jak i warunki hodowli - temperatura, napowietrzanie, wiek hodowli (faza wzrostu mikroorganizmu).

W oparciu o uzyskane wyniki stwierdzono, że zdolność hamowania wzrostu bakterii wskaźnikowych posiadają wszystkie badane szczepy bakterii fermentacji mlekowej *Lactobacillus acidophilus*. Wykazano jednak istotne zróżnicowanie (tab. 1) tej cechy, a efektywność inhibicji wzrostu wyraźnie zależała od wrażliwości szczepu wskaźnikowego na wybrane produkty przemiany bakterii fermentacji mlekowej, jak i od zastosowanej metody badawczej. Spośród 5 kultur kontrolnych będących mikroflorą zanieczyszczającą żywność, najwrażliwszy na metabolity LAB okazał się szczep bakterii *P.aeruginosa* ATCC 27853, natomiast znacznie mniejszą wrażliwością charakteryzował się szczep *S.aureus* ATCC 25923.

Spośród zastosowanych 5 metod oznaczania antagonizmu międzyszczepowego, efektywne okazały się metody, gdzie możliwy był wzrost zarówno szczepu antagonisticznego jak i wskaźnikowego, tzn. metoda słupkowa, kropelkowa i studzienkowa A. Metody gdzie stosowano ciecz po hodowli bakterii mlekowych, jako czynnik przeciwdrobnoustrojowy (metoda krążkowa i studzienkowa C) były mało efektywne (rys. 1). Wyniki antagonizmu międzyszczepowego, badane różnymi metodami nie wykazywały korelacji. Metoda studzienkowa C mogłaby znaleźć zastosowanie w przypadku zateżenia cieczy po hodowli, co jednak znacznie wydłuża czas procedury i może po-

wodować niekorzystne zmiany składu metabolitów LAB o właściwościach antagonicznych, np. usunięcie aldehydu octowego poprzez odparowanie.

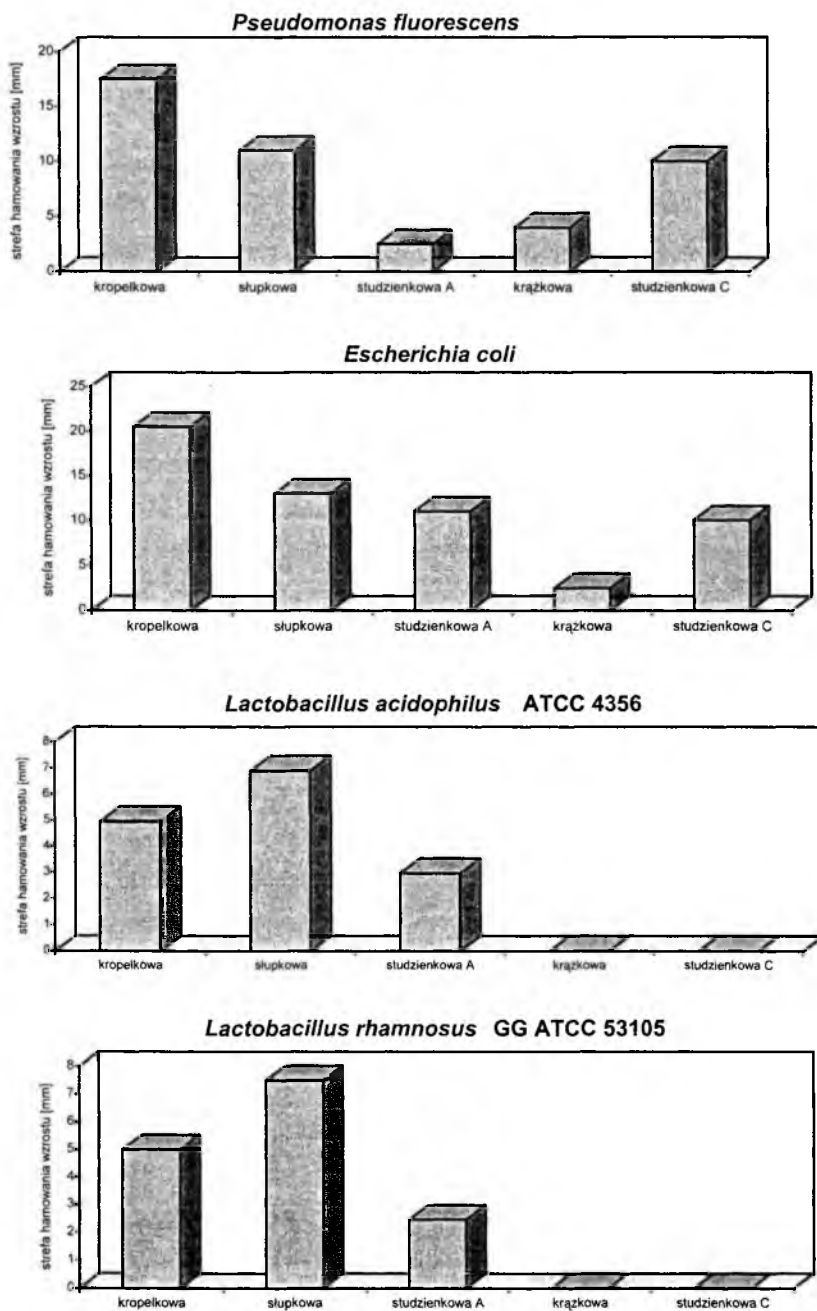
Tabela 1

Aktywność antagonistyczna *Lactobacillus acidophilus*.

Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus*.

Szczep antagonistyczny	Strefa hamowania szczepu wskaźnikowego (wartość średnia) [mm]						
	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aerugi-</i> <i>nosa</i> ATCC 27853	<i>P. flu-</i> <i>orescens</i>	<i>L. acido-</i> <i>philus</i> ATCC 4356	<i>L. rhamno-</i> <i>sus</i> GG ATCC 53105
<i>L. acidophilus</i> Cz-1	6,7	10,0	3,0	9,0	10,0	-	-
<i>L. acidophilus</i> Diat	10,0	9,7	3,0	12,3	10,3	-	-
<i>L. acidophilus</i> Ind1	5,8	12,0	6,3	13,0	11,7	5,7	8,3
<i>L. acidophilus</i> 336	6,3	12,0	2,0	13,5	10,3	7,3	8,0
<i>L. acidophilus</i> H-1	7,5	14,0	5,8	14,5	10,8	6,3	9,0
<i>L. acidophilus</i> In3	9,5	10,7	8,0	11,0	9,0	-	-
<i>L. acidophilus</i> Ch-2	8,0	12,7	3,0	11,0	9,7	7,3	7,7
<i>L. rhamnosus</i> GG ATCC 53105	4,0	8,0	4,0	7,0	10,0	Nd	Nd
<i>L. acidophilus</i> Ros	6,8	10,7	6,0	11,0	10,7	-	-
<i>L. acidophilus</i> 172	11,0	14,3	9,5	11,0	11,7	8,0	8,0
<i>L. acidophilus</i> A 92	10,0	13,3	10,0	12,8	10,0	8,0	6,0
<i>L. acidophilus</i> Ch-5	7,5	10,7	4,8	11,5	11,0	-	-
<i>L. acidophilus</i> 1	2,0	10,7	2,0	11,5	10,7	3,4	2,3
<i>L. acidophilus</i> 0,3	10,5	12,7	9,5	11,5	10,7	6,8	6,0
<i>L. acidophilus</i> ATCC 4356	5,8	9,8	11,0	12,0	10,0	Nd	Nd
<i>L. acidophilus</i> NCAINB 1075	13,5	12,7	19,0	18,5	11,0	6,3	6,3
<i>L. acidophilus</i> Bauer	7,3	13,7	17,0	16,8	10,3	9,0	8,3
<i>L. acidophilus</i> Nestle	7,8	-	12,8	17,8	-	-	-
<i>L. acidophilus</i> 343	8,5	12,3	14,8	18,0	10,7	7,3	8,7
<i>L. acidophilus</i> B	7,8	10,7	16,0	17,0	10,0	-	-
<i>L. acidophilus</i> 20T1	14,0	12,0	14,0	17,0	10,0	7,0	8,3
<i>L. acidophilus</i> NCAINB 1152	11,0	10,0	16,3	18,25	11,7	Nd	Nd

Nd - nie oznaczano, - brak aktywności antagonistycznej, aktywność antagonistyczną oznaczano metodą słupkową



Rys. 1. Aktywność antagonistyczna LAB wobec szczepów wskaźnikowych w zależności od stosowanej metody oznaczania.

Fig. 1. Influence of assay methods on assessment of LAB antagonistic activity.

Najlepsze i przejrzyste wyniki uzyskano stosując metodę kropelkową i słupkową, pomijając metodę studzienkową A, której wadą było wysychanie hodowli bakterii antagonistycznych w studzienkach, co miało niekorzystny wpływ na efektywność wzrostu, a w konsekwencji również produktywność metabolitów o aktywności antagonyzującej.

Podsumowanie

Prezentowane w pracy wyniki badań należą do wstępnych prac zmierzających do wytypowania z posiadanej kolekcji bakterii *L. acidophilus* kultur o właściwościach probiotycznych. W następnym etapie badań zostaną skonstruowane szczepionki do produkcji mlecznych preparatów probiotycznych, np. mleka acidofilnego.

Badane szczepy *L. acidophilus*, hodowane w podłożu MRS, wykazują aktywność antagonistyczną przynajmniej w stosunku do 5 z 7 szczepów wskaźnikowych, z wyjątkiem jednego szczepu *L. acidophilus* Nestle, który hamował tylko 3 z nich, tzn. *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 i *P. aeruginosa* ATCC 27853. Spośród analizowanej grupy mikroorganizmów wytypowano 11 szczepów *L. acidophilus* charakteryzujących się wysoką aktywnością przeciwdrobnoustrojową (zdolność hamowania wzrostu wszystkich 7 szczepów wskaźnikowych). Właściwościami takimi cechowały się kultury: Ind1, 336, H-1, Ch-2, 172, A92, 0,3, NCAINB 1075, Bauer, 343, 20T1. Wymienione szczepy charakteryzują się również aktywnością antagonistyczną w stosunku do mikroorganizmów tego samego rodzaju a nawet gatunku. Efektywnie hamują wzrost 21 szczepów badanych *L. acidophilus*, ponadto inhibują wzrost 5 szczepów innych gatunków bakterii mlekowych, uznanych jako kultury referencyjne: *L. thermophilus* 094 11.78 NCDO 489, *L. crispatus* NCFB 2752, *L. casei* NCDO 206, *L. casei* Shirota oraz *L. gasseri* (niepublikowane badania własne), co jest niezmiernie ważne podczas komponowania szczepionek.

LITERATURA

- [1] Harris L.J., Daeschel M.A., Stiles M.E., Klaenhammer T.R.: Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes*, *J. Food Prot.*, **52**, 1989, 384-387.
- [2] Hudault S., Bernet - Camard M.F., Coconier M.H., Lievin V., Servin A.L.: Newsletters of the International Dairy Federation, **145**, 1996, 25-27.
- [3] Klewicka E., Libudzisz Z.: Przeciwdrobnoustrojowa aktywność bakterii mlekowych, *Przegląd Mleczarski*, **12**, 1998, 411-416.
- [4] Salminen S., Isolauri E., Salminen E.: Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges, *Antonie van Leeuwenhoek*, **70**, 1996, 347-358.
- [5] Strus M.: Nowa metoda oceny antagonistycznego działania bakterii kwasu mlekowego (LAB), na wybrane, chorobotwórcze bakterie wskaźnikowe, *Met. Dośw. Mikrobiol.*, **50**, 1998, 123-130.

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* –
LACTIC ACID BACTERIUM****S u m m a r y**

Antimicrobial activity of 20 strains of *L.acidophilus* against important food borne pathogens: *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, and 2 strains lactic acid bacteria *L.acidophilus* ATCC 4356 and *L.rhamnosus* GG ATCC 53105 was estimated. All the *L. acidophilus* strains revealed inhibition activity against indicator organisms. Eleven strains with highest antagonistic activity were screened from this group of *L. acidophilus*.

Antagonistic activity of *L. acidophilus* was tested in accordance with five different methods. The best results were obtained with double layer methods and agar slab techniques, which gave good diffusion conditions of antagonistic factors. ☒