

Antagonistyczne działanie bakterii fermentacji mlekowej w stosunku do wybranych drobnoustrojów

BARBARA KOT, ANTONI JAKUBCZAK*, KAZIMIERZ BUKOWSKI

Katedra Mikrobiologii Wyższej Szkoły Rolniczo-Pedagogicznej w Siedlcach, ul. Prusa 12, 08-110 Siedlce

*Zakład Higieny Weterynaryjnej – Oddział w Łomży, ul. Nowogrodzka 160, 18-400 Łomża

Kot B., Jakubczak A., Bukowski K.

The antagonistic activity of lactic acid bacteria against selected bacteria

Summary

Nine strains of lactic acid bacteria isolated from raw pork and beef were the subject of the study. The antagonistic activity of the tested strains was determined against pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus* (MRSA and MSSA), enteropathogenic *E. coli* and *Listeria monocytogenes*.

A modified Spelhaugh and Harlander method was used. The research was carried at anaerobic conditions and with the solid medium MRS-0.2. The lactic acid bacteria strains, which showed the largest antibacterial activity on the solid medium, were used for research in MRS-0.2 broth and minced beef. *Pediococcus pentosaceus* W24, *Lactobacillus* sp. W27, *Lactobacillus brevis* F4 strains showed the largest antibacterial activity against enteropathogenic *E. coli* strains on the solid medium. In MRS-0.2 broth in the presence of *Lactobacillus* sp. W27 (10^6 CFU/ml) the growth of *E. coli* 6BO124:K72 was completely inhibited after five days of incubation.

The number of *Listeria monocytogenes* cells in the presence of *Pediococcus pentosaceus* F50 (10^6 CFU/ml) was lower than that of the control sample during the first two days. Incubation during the next four days resulted in an increase of the number of *Listeria monocytogenes* cells (6×10^7 CFU/ml) but the number of cells did not exceed the number of cells in the control sample (10^9 CFU/ml). The antagonistic activity of these strains under investigation in minced beef was restricted. The growth of total of MRSA strains and majority of MSSA strains was inhibited by *Pediococcus pentosaceus* F50 and *Lactobacillus brevis* F14 strains on the solid medium MRS-0.2.

In MRS-0.2 broth in the presence of *Pediococcus pentosaceus* F50 (10^6 CFU/ml) the growth of MRSA 3 strain was completely inhibited after four days of incubation.

Keywords: lactic acid bacteria, antagonism, antibacterial activity, food pathogens.

Bakterie fermentacji mlekowej używane są jako szczepy starterowe w wytwarzaniu różnorodnych produktów przy udziale procesu fermentacji. Rozwój bakterii mlekowych jest istotny zarówno dla jakości smaku produktu, jak i dla jego ochrony przed rozwojem drobnoustrojów stanowiących mikrobiologiczne zanieczyszczenie surowca (17). Antagonistyczne właściwości tych bakterii w stosunku do innych drobnoustrojów są rezultatem wytwarzania szeregu metabolitów, takich jak: kwas mlekowy, kwas octowy, aldehydy, diacetyl, nadtlenuk wodoru oraz syntezy specyficznych substancji antybiotycznych i bakteriocyn (1-3, 8, 10, 14-16, 18).

Bakteriocyny stanowią dużą grupę heterogennych związków, różniących się ciężarem cząsteczkowym, budową chemiczną, właściwościami biochemicznymi, jak i zakresem aktywności. Zainteresowanie bakteriocynami wynika z faktu, że są naturalnymi substancjami

antybiotycznymi, które działają bakteriobójczo na różne drobnoustroje, tj. na te, które stanowią mikrobiologiczne zanieczyszczenie żywności powodując psucie produktów spożywczych lub też są chorobotwórcze.

Klasycznym przykładem takich substancji jest nizyna (16), wytwarzana przez *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, która wykazuje bakteriobójcze działanie w stosunku do bakterii Gram-dodatnich oraz hamuje kiełkowanie zarodników *Clostridium* i *Bacillus*. Jest ona powszechnie używana do produkcji serów w celu zabezpieczenia ich przed bakteriami z rodzaju *Clostridium*. Innymi bakteriocynami, które próbowano zastosować do mięsa i przetworów mięsnych były: pediocyny produkowane przez różne szczepy z rodzaju *Pediococcus* (9, 16), sakcyna produkowana przez *Lactobacillus sake* (19, 20), helwetycyna produkowana przez *Lactobacillus helveticus* (13) i laktacyny produkowane przez *Lactobacillus lactis* (17).

Celem pracy było określenie właściwości antagonicznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej w różnych warunkach, tj. na podłożu stałym, płynnym oraz w mięsie w stosunku do wybranych bakterii mających znaczenie w higienie uboju.

Materiał i metody

Przedmiotem badań było 9 szczepów bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z surowych farszów wieprzowo-wołowych (*Lactobacillus paracasei* – szczepy W31, W32, W35, W37, W38, *Pediococcus pentosaceus* – szczepy W24, F50, *Lactobacillus brevis* – szczep F4, *Lactobacillus sp.* – szczep W27), które wykazywały hamującą aktywność w stosunku do szczepów *Yersinia enterocolitica* O:3/4 izolowanych od świń oraz w stosunku do *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6749 i *Staphylococcus aureus* NCTC 4/63 (11, 12). Metodę izolacji oraz identyfikacji, a także sposób selekcji aktywnych szczepów opisano wcześniej (11).

Badanie właściwości antagonistycznych tych szczepów wykonano w stosunku do:

- 20 szczepów *Staphylococcus aureus* metycylinowrażliwych (MSSA) i 15 szczepów *Staphylococcus aureus* metycylinoopornych (MRSA), wyizolowanych w Pracowni Bakteriologicznej ZOZ w Siedlcach,
- 20 enteropatogennych szczepów *Escherichia coli* wyizolowanych z kału od klinicznie zdrowych cieląt, krów, kur i lisów. Szczepy wyizolowano i typowano serologicznie w Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w Łomży wykorzystując surowice do serologicznej identyfikacji chorobotwórczych dla ludzi szczepów *E. coli*,
- *Listeria monocytogenes* – szczep wyizolowany w Pracowni Bakteriologicznej Woj. Szpitala w Łomży.

Badanie właściwości antagonistycznych szczepów bakterii fermentacji mlekowej wykonano wg metody zaproponowanej przez Spelhaug i Harlander (23) w modyfikacji własnej. Badanie przeprowadzono na podłożu stałym MRS-0,2 (2 g/l glukozy + 3 g/l CaCO₃) w warunkach beztlenowych z użyciem zestawów Gas generating box – H₂ + CO₂ firmy BioMerieux. Warunki beztlenowe stworzono w celu zahamowania syntezy kwasu mlekowego oraz nadtlenu wodoru. Na powierzchnię płytki z podłożem MRS-0,2 posiewano w czterech miejscach oddalonych od siebie co najmniej 3 cm po 5 µl – 10-krotnego rozcieńczenia całodobowej hodowli szczepu donatorowego inkubowanego w temperaturze 30°C. Po 18-24 godzinnej hodowli w temperaturze 30°C w warunkach beztlenowych szczepy donatorowe poddawano działaniu chloroformu przez 20 minut. Następnie hodowlę zalewano agarem Mueller-Hintona zawierającym szczep wskaźnikowy. Szczep wskaźnikowy przygotowano przez dodanie 0,25 ml 10⁻¹ rozcieńczenia całodobowej hodowli do 10 ml agaru Mueller-Hintona schłodzonego do 45°C i po dokładnym wymieszaniu zalewano płytki z wyrosłymi szczepami donatorowymi. Płytki inkubowano w warunkach tlenowych w temperaturze 37°C przez 48 godz. Aktywność szczepu donatorowego oceniano na podstawie pomiaru średnicy zahamowania wzrostu wskaźnika. W drugiej części doświadczenia zastosowano tylko te szczepy bakterii fermentacji mlekowej, które wykazywały największą aktywność przeciwbakteryjną na sta-

łym podłożu MRS-0,2. Badanie przeprowadzono w płynnym podłożu MRS-0,2 oraz w zmielonym, pasteryzowanym mięsie wołowym w temp. 22°C przez 6 dni. Badano przeżywalność komórek *Staphylococcus aureus* 3 MRSA i *Listeria monocytogenes* w obecności szczepu *Pediococcus pentosaceus* F50 (10⁶ CFU/ml) oraz przeżywalność *E. coli* 6BO124:K72 w obecności *Lactobacillus sp.* W27 (10⁶ CFU/ml). Liczba komórek poszczególnych szczepów wskaźnikowych posiewanych do płynnego podłoża MRS-0,2 wynosiła ok. 10⁵ CFU/ml oraz do zmielonego mięsa – ok. 10⁵ CFU/g. W ciągu sześciu dni, każdego dnia inkubacji sprawdzano liczbę komórek szczepów wskaźnikowych posiewając odpowiednio rozcieńczone próbki poszczególnych hodowli na podłoża agarowe: *Staphylococcus aureus* 3 MRSA na podłożu Chapmana, *E. coli* 6BO124:K72 na podłożu MacConkeya, *Listeria monocytogenes* na podłożu tryptonowo-sojowe (TSA) z dodatkiem 2 g/l tellurynu potasu. Po 18-24-godzinnej inkubacji *Listeria monocytogenes* w temp. 30°C, *Staphylococcus aureus* 3 MRSA i *E. coli* 6BO124:K72 w 37°C liczono wyrosłe kolonie.

Wyniki i omówienie

Badane szczepy bakterii fermentacji mlekowej wykazywały zróżnicowaną aktywność hamującą w stosunku do enteropatogennych bakterii *E. coli* na podłożu stałym MRS-0,2. Największą antybakteryjną aktywność w stosunku do enteropatogennych *E. coli* wykazywały *Pediococcus pentosaceus* W24, *Lactobacillus sp.* W27, oraz *Lactobacillus brevis* F4. Aktywność tych szczepów określono na podstawie liczby szczepów wrażliwych i wielkości stref zahamowania wzrostu. Średnice stref zahamowania wzrostu wahały się od 10 mm do 33 mm. *Lactobacillus paracasei* W32 nie wykazywał aktywności przeciwbakteryjnej w stosunku do badanych szczepów *E. coli*, a *Lactobacillus paracasei* W38 hamował wzrost tylko jednego szczepu (tab. 1). W płynnym podłożu MRS-0,2 w obecności *Lactobacillus sp.* W27 (10⁶ CFU/ml) wzrost szczepu *E. coli* 6BO124:K72 był całkowicie zahamowany po 5 dniach inkubacji w temp. 22°C. W próbie kontrolnej liczba komórek wynosiła ok. 4 × 10⁸ CFU/ml (ryc. 1). Aktywność antagonistyczna tego szczepu była jednak ograniczona podczas hodowli w zmielonym mięsie wołowym (ryc. 2). Liczba komórek szczepu *Listeria monocytogenes* w obecności *Pediococcus pentosaceus* F50 (10⁶ CFU/ml) w płynnym podłożu MRS-0,2 znacznie się obniżyła w ciągu dwóch pierwszych dni inkubacji (4 × 10⁴ CFU/ml). Inkubacja przez cztery następne dni prowadziła do wzrostu liczby komórek *Listeria monocytogenes* (6 × 10⁷ CFU/ml), ale była ona niższa niż w próbie kontrolnej (10⁹ CFU/ml) (ryc. 3). Antagonistyczne działanie szczepu *Pediococcus pentosaceus* F50 w stosunku do *Listeria monocytogenes* było bardzo ograniczone podczas hodowli w zmielonym mięsie wołowym (ryc. 4).

Wzrost wszystkich badanych szczepów *Staphylococcus aureus* MRSA oraz większość szczepów MSSA był hamowany przez *Pediococcus pentosaceus* F50 i *Lactobacillus brevis* F4 na stałym podłożu MRS-0,2.

Tab. 1. Antagonistyczne działanie bakterii fermentacji mlekowej w stosunku do enteropatogennych szczepów *E. coli* na podłożu stałym MRS-0,2

Szczepy indykatorowe (<i>E. coli</i>)	Średnice stref inhibicji indykatorów (mm)								
	Szczepy donatorowe								
	W ₂₄	W ₂₇	W ₃₁	W ₃₂	W ₃₅	W ₃₇	W ₃₈	F ₄	F ₅₀
25B0125:K70	11	15	-	-	-	-	-	22	-
62B0125:K70	12	23	-	-	-	-	-	25	-
17B0125:K70	-	-	-	-	-	-	-	22	-
3B0125:K70	13	25	-	-	-	-	-	25	-
88B0125:K70	-	20	17	-	-	-	-	22	-
20B0124:K72	15	27	-	-	-	-	-	-	-
67B0125:K70	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85C0124:K72	-	11	-	-	-	-	-	31	-
260125:K70	13	-	10	-	-	-	-	32	-
30CA026:K60	15	13	-	-	-	-	-	30	-
16 019:K69	10	-	-	-	-	-	-	29	-
69 0124:K72	11	-	30	-	-	-	-	27	-
91B0125:K70	-	33	27	-	17	-	-	-	10
6B0124:K72	15	30	23	-	18	24	-	-	9
72B0125:K70	15	32	-	-	13	25	-	-	-
68B0125:K70	15	30	26	-	-	25	-	-	10
71B0125:K70	18	12	-	-	-	25	16	-	-
72CB0128:K67	16	26	-	-	-	18	-	-	-
52B0125:K70	20	23	15	-	-	20	-	-	-
24B0126:K71	20	11	-	-	-	20	-	-	-

Objaśnienia: – brak strefy inhibicji wzrostu indykatora, *Lactobacillus paracasei* (W31, W32, W35, W37, W38), *Pediococcus pentosaceus* (W24, F50), *Lactobacillus brevis* (F4), *Lactobacillus sp.* (W27).

Dużą aktywność inhibitującą wykazał także szczep *Lactobacillus sp.* W27, który hamował wzrost 90% szczepów opornych na metycylinę (ryc. 5). W płynnym podłożu MRS-0,2 w obecności szczepu *Pediococcus pentosaceus* F50 (10^6 CFU/ml) wzrost szczepu *Staphylococcus aureus* 3 MRSA był całkowicie zahamowany po 4 dniach inkubacji w 22°C. W próbie kontrolnej liczba komórek wynosiła ok. 10^9 CFU/ml (ryc. 6).

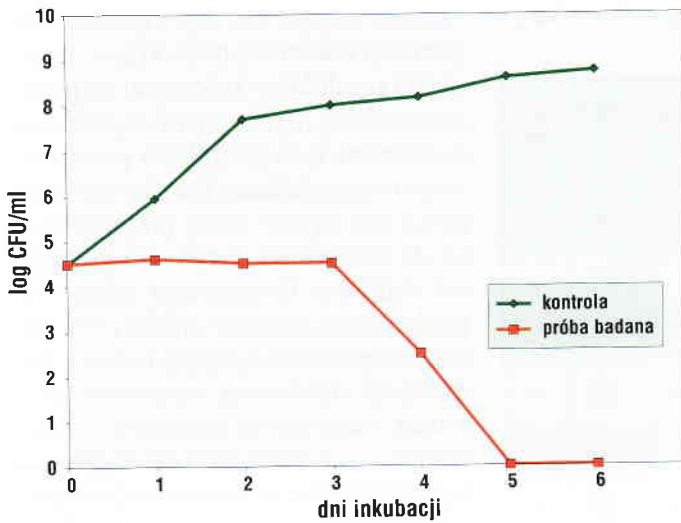
Badania ostatnich lat wskazują na coraz większe spektrum hamującego działania bakterii fermentacji mlekowej w stosunku do drobnoustrojów mających wpływ na jakość zdrowotną, trwałość mięsa i jego prze-

tworów (5, 14, 16, 22). Bakterie fermentacji mlekowej pochodzące z mięsa lub produktów mięsnych są prawdopodobnie najlepszymi czynnikami do ochrony tych produktów przed rozwojem niepożądanego flory bakteryjnej, ponieważ są one lepiej przystosowane do bytowania w tym środowisku, niż bakterie fermentacji mlekowej pochodzące z innego źródła (20). Badaniom poddano szczepy bakterii fermentacji mlekowej wyizolowane z mięsa wieprzowo-wołowego, które opisano wcześniej jako działające antagonistycznie w stosunku do szczepów *Yersinia enterocolitica* O:3/4 oraz *Pseudomonas aeruginosa* NCTC6749 i *Staphylococcus aureus* NCTC 4/63 (11).

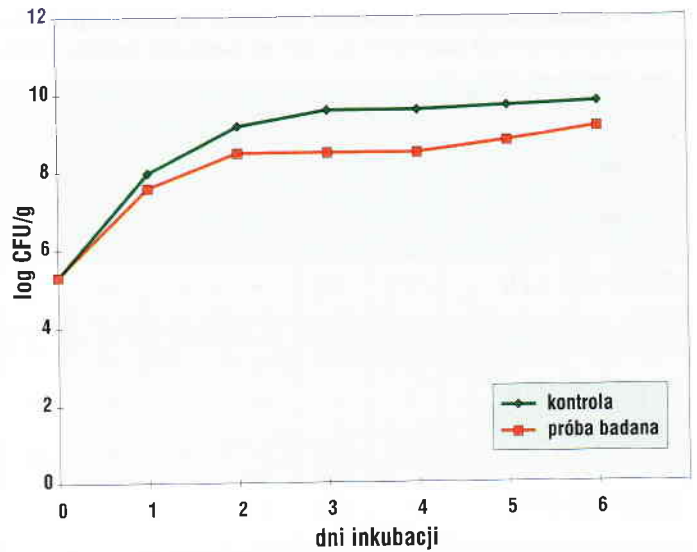
Wśród tych szczepów w wyniku aktualnych badań uzyskano takie, które wykazywały antagonistyczne działanie w stosunku do enteropatogennych *E. coli*, *Staphylococcus aureus* MRSA, MSSA i *Listeria monocytogenes*. Należy przypuszczać, że hamująca aktywność tych szczepów związana jest z wytwarzaniem substancji o charakterze bakteriocyn, gdyż produkcja kwasu mlekowego i nadtlenu wodoru została ograniczona przez niską zawartość glukozy w podłożu MRS-0,2 (2 g/l) oraz hodowlę w warunkach beztlenowych ($H_2 + CO_2$). Daeschel i Klaenhammer (7) zaobserwowali, że pediocyna A wytwarzana przez szczep *Pediococcus pentosaceus* była aktywna w stosunku do bakterii Gram-dodatnich: *Clostridium botulinum*, *Cl. sporogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* oraz *Listeria monocytogenes*. Natomiast szczep *Pediococcus acidilactici* wyizolowany z mięsa wytwa-

rzał bakteriocynę (pediocynę AcH), która hamowała wzrost Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii występujących w żywności (4). Pediocyna AcH hamowała wzrost bakterii powodujących psucie się produktów spożywczych, np. *Pseudomonas putida* oraz bakterii patogennych przenoszonych przez pokarm, tj. *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* i *Staphylococcus aureus*.

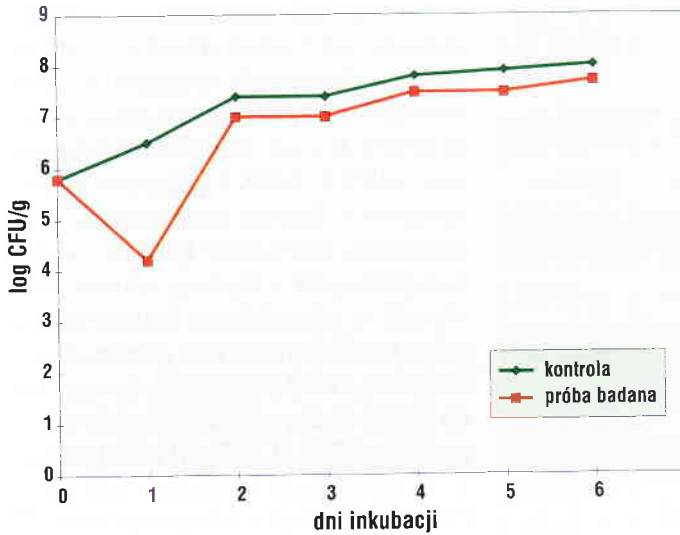
Hamującą aktywność szczepu *Lactobacillus sake* wyizolowanego z mięsa w stosunku do *Listeria monocytogenes* na podłożu stałym MRS, w płynnym MRS oraz w mięsie wołowym wykazał Schillinger (21).



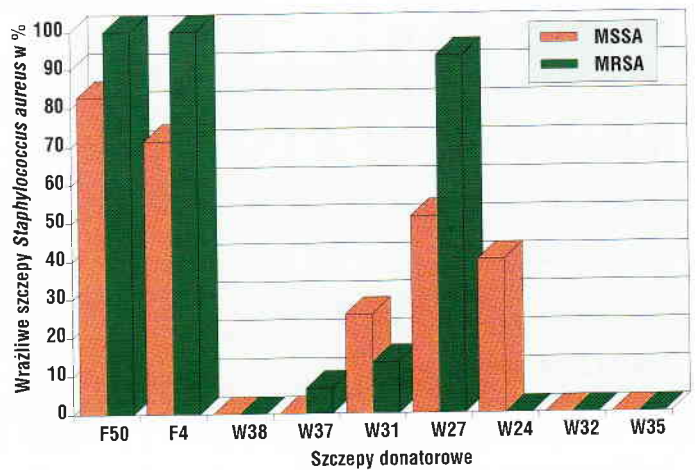
Ryc. 1. Przeżywalność komórek *E. coli* 6BO124:K27 w obecności *Lactobacillus sp.* W27 w płynnym podłożu MRS-0,2 w temp. 22°C



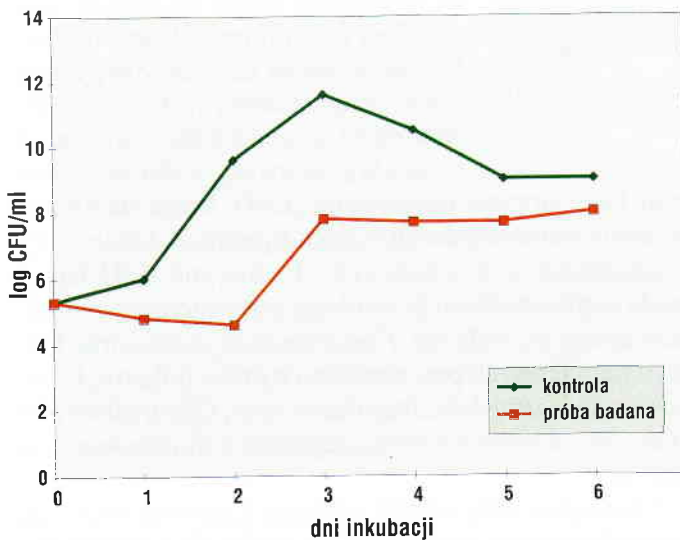
Ryc. 4. Przeżywalność komórek *Listeria monocytogenes* w obecności *Pediococcus pentosaceus* (F50) w zmielonym mięsie wołowym w temp. 22°C



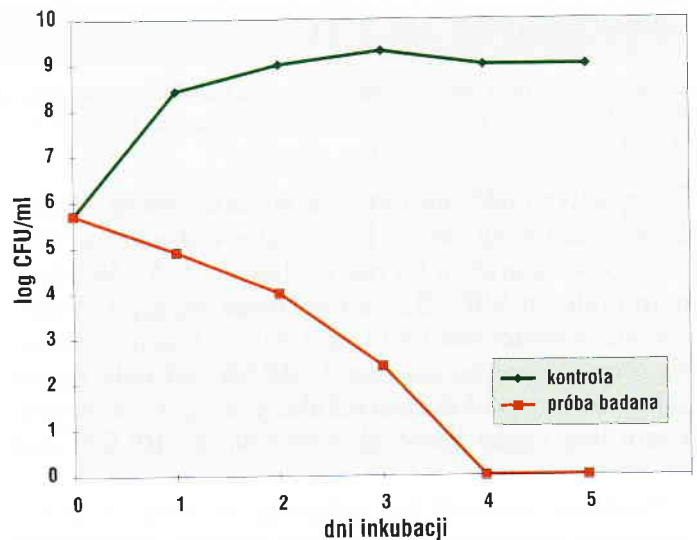
Ryc. 2. Przeżywalność komórek *E. coli* 6BO124:K27 w obecności *Lactobacillus sp.* W27 w zmielonym mięsie wołowym w temp. 22°C



Ryc. 5. Antagonistyczne działanie bakterii fermentacji mlekowej w stosunku do *Staphylococcus aureus* MSSA i MRSA na podłożu stałym MRS-0,2



Ryc. 3. Przeżywalność komórek *Listeria monocytogenes* w obecności *Pediococcus pentosaceus* (F50) w płynnym MRS-0,2 w temp. 22°C



Ryc. 6. Przeżywalność komórek szczepu *Staphylococcus aureus* 3 MRSA w obecności *Pediococcus pentosaceus* (F50) w płynnym MRS-0,2 w temp. 22°C

W przeprowadzonych badaniach szczepy fermentacji mlekowej wykazywały ograniczoną aktywność w mięsie. Mniejszą aktywność *Lactobacillus sake* w mięsie w porównaniu z płynnym podłożem MRS uzyskał także Schillinger (21). Należy przypuszczać, że produkcja bakteriocyn w mięsie może być zmniejszona. Ponadto wiązanie przez bakteriocyny komponentów substratowych, takich jak cząstki tłuszczu lub powierzchni białek powoduje, że w obecności tych substancji znacznie obniża się aktywność bakteriocyn (6). Prowadzone są jednak badania nad wprowadzeniem pediocyny PA-1 i pediocyny AcH do konserwowania mleka, mięsa i jego produktów (6). W nowoczesnej technologii bakteriocyny mają niszczyć bakterie przeżywające procesy przetwórcze, co daje możliwość wydłużenia czasu przechowywania produktów oraz ograniczenia ilości dodawanych substancji chemicznych. Poza tym poszukuje się mikroorganizmów w celu ich zastosowania jako kultur ochronnych, czyli takich, które nie wywierają wpływu na jakość sensoryczną produktu, ale przyczyniają się do zmniejszenia zagrożeń natury higienicznej łatwo psującej się żywności, jaką jest mięso i jego przetwory. Dlatego też dalsze badania w kierunku poszukiwań nowych szczepów bakterii fermentacji o szerokim zakresie aktywności przeciwdrobnoustrojowej działających w różnych warunkach wydaje się być bardzo uzasadnione.

Piśmiennictwo

1. Abdel-Bar N., Harris N.: J. Food Prot. 47, 61, 1984.
2. Andersson R.: Int. J. Food Microbiol. 3, 149, 1986.
3. Andersson R., Daeschel M., Hassan M.: Biochimie 70, 381, 1988.
4. Bhunia A. K., Johnson M. C., Ray B.: J. Appl. Bacteriol. 65, 261, 1988.
5. Bhunia A., Johnson M.: Appl. Environ. Microbiol. 58, 2315, 1992.
6. Czajkowska D.: Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny 12, 11, 1994.
7. Daeschel M. A., Klaenhammer T. R.: Appl. Environ. Microbiol. 50, 1538, 1985.
8. Daeschel M. A.: Food Technol. 43, 164, 1989.
9. Douglas P. C., Hutkins R. W.: Appl. Environ. Microb. 58, 3312, 1992.
10. Gilliland S. E., Speck M. L.: J. Food Prot. 40, 820, 1977.
11. Jakubczak A., Kot B., Bukowski K.: Medycyna Wet. 51, 754, 1995.
12. Jakubczak A., Kot B., Bukowski K.: Adv. Agricult. Scien. V, 31, 1996.
13. Joeger M. C., Klaenhammer T. R.: Appl. Environ. Microbiol. 167, 439, 1986.
14. Juven B. J., Meinersmann R. J., Stern N. J.: J. Appl. Bacteriol. 70, 95, 1991.
15. Khedkar C. D., Dave M. J., Sannabhadti S. S.: Cultured Dairy Prod. J. 12, 29, 1990.
16. Klaenhammer T. R.: Biochimie 70, 337, 1988.
17. Piard J. C., Muriana P. M., Desmazeaud M. J., Klaenhammer T. R.: Appl. Environ. Microbiol. 58, 279, 1992.
18. Raccach M., Henningsen C. E.: J. Food Prot. 47, 354, 1984.
19. Schillinger U., Lucke F. K.: J. Food Microbiol. 4, 199, 1987.
20. Schillinger U., Lucke F. K.: Appl. Environ. Microbiol. 55, 1901, 1989.
21. Schillinger U.: Biotech. Food Safety 4, 55, 1990.
22. Schillinger U., Lucke F. K.: Appl. Environ. Microbiol. 70, 473, 1991.
23. Spelhaug S. R., Harlander S. K.: J. Food Prot. 52, 859, 1989.

Adres autora: dr Barbara Kot, Katedra Mikrobiologii, Wyższa Szkoła Rolniczo-Pedagogiczna w Siedlcach, ul. Prusa 12, 08-110 Siedlce

Studia Specjalistyczne w zakresie weterynaryjnej diagnostyki laboratoryjnej

Katedra Profilaktyki Ogólnej i Chorób Ptaków Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR w Lublinie w porozumieniu z Komisją ds. Specjalizacji Lekarzy Weterynarii oraz Weterynaryjnym Centrum Kształcenia Podyplomowego w Puławach ogłasza nabór na specjalistyczne studia podyplomowe w zakresie weterynaryjnej diagnostyki laboratoryjnej. Zajęcia prowadzić będą specjaliści z wydziałów Medycyny Weterynaryjnej, Państwowego Instytutu Weterynaryjnego oraz Zakładów Higieny Weterynaryjnej, pod kierunkiem Krajowego Kierownika wym. Specjalizacji – prof. dr hab. Jerzego Molendy. Studia trwać będą 4 semestry. Z uwagi na specyfikę studium przewiduje się w programie znaczny udział zajęć praktycznych. Stwarza to konieczność wskazania w zgłoszeniach bliższego kierunku diagnostyki laboratoryjnej, w którym kandydaci chcieliby podnosić swoje kwalifikacje.

Bliższe informacje można uzyskać oraz zgłoszenia kierować na adres:

- | | | |
|--|------|---|
| <p>1. Akademia Rolnicza w Lublinie
Katedra Profilaktyki Ogólnej
i Chorób Ptaków 20-033 Lublin,
ul. Akademicka 12
Prof. dr hab. Jerzy Rzedzicki
tel. 445-68-31, 445-60-80</p> | albo | <p>2. Weterynaryjne Centrum
Kształcenia Podyplomowego
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy
tel./fax. 886-40-04</p> |
|--|------|---|

Zgłoszenia powinny zawierać deklarację pokrycia kosztów przez zainteresowanego lub jego pracodawcę. Orientacyjny koszt jednego semestru wynosi ok. 1200 zł.