

AKTYWNOŚĆ PRZECIWDROBNOUSTROJOWA MIKROBIOTY FERMENTOWANYCH PRODUKTÓW MLECZNYCH

Anna Sip, Anna Dobrowolska, Katarzyna Zarobkiewicz, Katarzyna Czaczyk
Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

WPROWADZENIE

Dominującą mikrobiotą serów wytwarzanych na drodze spontanicznych fermentacji są bakterie fermentacji mlekowej (LAB). Bakterie te kształtują ich specyficzne cechy sensoryczne i organoleptyczne. Pełnią one także ważną funkcję konserwującą. Jest ona wypadkową ich zdolności do syntezy związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Szczególnie silną aktywność względem drobnoustrojów chorobotwórczych wykazują kwasy organiczne, H₂O₂, związki systemu laktoperoksydazy i bakteriocyny. Dlatego też postanowiono ocenić potencjał przeciwdrobnoustrojowy mikrobioty serów wytwarzanych w naszym kraju metodami rzemieślniczymi. Jako przedmiot badań wybrano twarde sery podpuszczkowe z masy parzonej, - gołki (pucokoki) i oscopyki oraz miękkie sery podpuszczkowe – bundz i bryndzę. Dostarczenie dowodów naukowych wskazujących na obecność w badanych serach bakterii niszczących drobnoustroje chorobotwórcze może być ważnym elementem ich promocji jako żywności mikrobiologicznie bezpiecznej. LAB scharakteryzowane pod kątem aktywności przeciwdrobnoustrojowej mogą zostać ponadto wykorzystane do produkcji biopreparatów o działaniu konserwującym. Obecnie szczególnie potrzebne są biopreparaty do zwalczania patogenów zoonotycznych, które według raportów EFSA stanowią największe zagrożenie dla konsumentów takich jak: *Listeria*, *Salmonella*, *Yersinia*, verotoksyczne *E. coli*, *Campylobacter*, a także innych bakterii chorobotwórczych wykrywanych w produktach mlecznych (*S. aureus*, *C. sakazakii*). Z powyższych względów wymienione bakterie użyto jako wskaźniki do oceny potencjału przeciwbakteryjnego LAB uczestniczących w produkcji wybranych serów rzemieślniczych.

CEL BADAŃ

Ocenić potencjał przeciwdrobnoustrojowy bakterii fermentacji mlekowej (LAB) będących dominującą mikrobiotą serów rzemieślniczych wytwarzanych w naszym kraju na drodze fermentacji spontanicznych.

METODYKA

Oznaczenie potencjału przeciwdrobnoustrojowego

Izolaty LAB rozmrażano i pasażowano dwukrotnie w bulionie MRS (temp. 37°C, 24h). Takim materiałem (2% v/v) zaszczepiano hodowle testowe, które prowadzono w bulionie MRS (temp. 37°C, 24h) bez regulacji pH. Otrzymane płyny hodowlane (ang. *culture fluid*, CF) badano w kierunku zdolności do antagonistycznego oddziaływania na szczepy wskaźnikowe o różnej etiologii (izolaty z żywności, izolaty kliniczne i szczepy kolekcyjne). Testy aktywności wykonywano metodą punktową. Analogicznym badaniom poddawano pozbawione komórek supernatanty płynów hodowlanych (ang. *cell-free supernatant*, CFS). Aktywność CFS traktowano jako wyznacznik zdolności badanych szczepów do syntezy i sekrecji metabolitów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. Dodatkowo oznaczano aktywność zneutralizowanych CFS, tj. CFS o pH 6,5, a następnie potraktowanych katalazą (500 U/ml, temp. 25°C, 30 min, Sigma) – tzw. ekstraktów aktywnych (ang. *active extract*, EA). W EA oznaczano aktywność innych metabolitów, niż kwasy organiczne i ditlenek wodoru. W celu ustalenia czy badane szczepy produkują również bakteriocyny CFS poddawano działaniu trypsyny (1 mg/ml, 25°C, 2h, Sigma) oraz ogrzewaniu w temp. 80°C przez 30 min. Utratę aktywności EA po takiej obróbce uznawano za potwierdzenie obecności w EA bakteriocyn lub bakteriocynopodobnych związków białkowych (BLIS).

Testy aktywności

Na pożywkę Mueller-Hinton agar (Graso) zaszczepioną 10⁵ jtk/ml bakterii wskaźnikowych наносono 20 μl CF, CFS i EA. Płytki z naniesionymi próbkami inkubowano w warunkach optymalnych dla wzrostu użytych szczepów chorobotwórczych. Po inkubacji mierzono w milimetrach (mm) średnice powstałych stref zahamowania wzrostu. Na podstawie ich wielkości orzekano o sile oddziaływania badanych szczepów oraz ich metabolitów na badane szczepy. Drobnoustroje dające strefy zahamowania wzrostu o średnicy od 2 do 14 mm klasyfikowano jako wykazujące słabą aktywność, natomiast dające strefy przejścia o średnicy większej niż 14 mm klasyfikowano jako wykazujące silną aktywność.

MATERIAŁY

PRZEDMIOT BADAŃ: 800 SZCZEPÓW LAB



POTENCJAŁ PRZECIWBAKTERYJNY LAB OCENIANO WZGLĘDEM PATOGENÓW O RÓŻNEJ ETIOLOGII

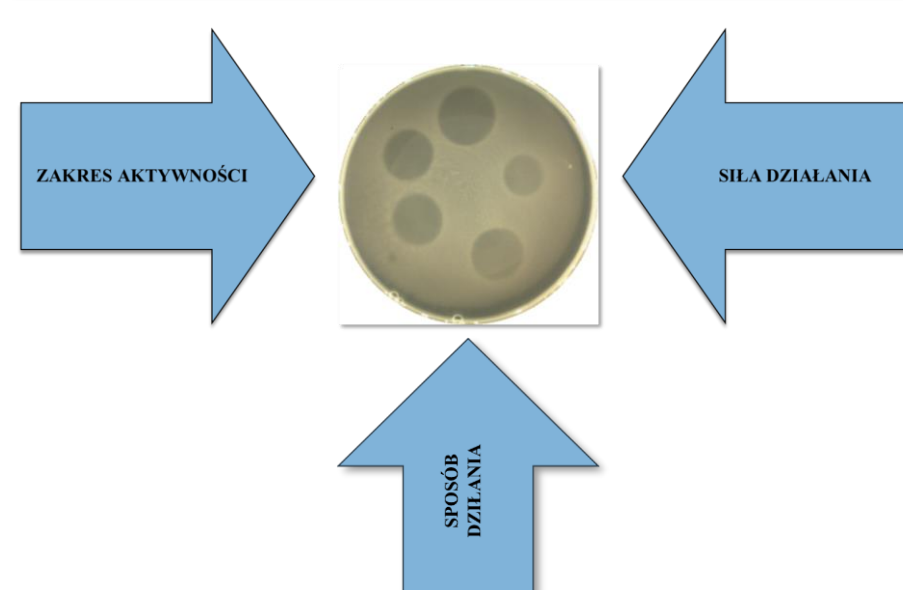


INNE SZCZEPY STOSOWANE W BADAANIACH

Szczepy	Pochodzenie	Pożywka	Temp. (°C)
Inne bakterie G(+)			
<i>Listeria monocytogenes</i> 19111	ATCC	NB	37
<i>Listeria innocua</i> 33090	ATCC	NB	37
<i>Listeria ivanovii</i> 19119	ATCC	NB	37
<i>Staphylococcus aureus</i> 25923	ATCC	NB	37
Bakterie G(-)			
<i>Campylobacter jejuni</i> 29428	ATCC	NB ¹	42
<i>Escherichia coli</i> 10/21	KBiMŻ	NB	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 5442	ATCC	NB	30
<i>Salmonella</i> Enteritidis 05/07	KBiMŻ	NB	37
<i>Yersinia enterocolitica</i> 9610	ATCC	NB	37

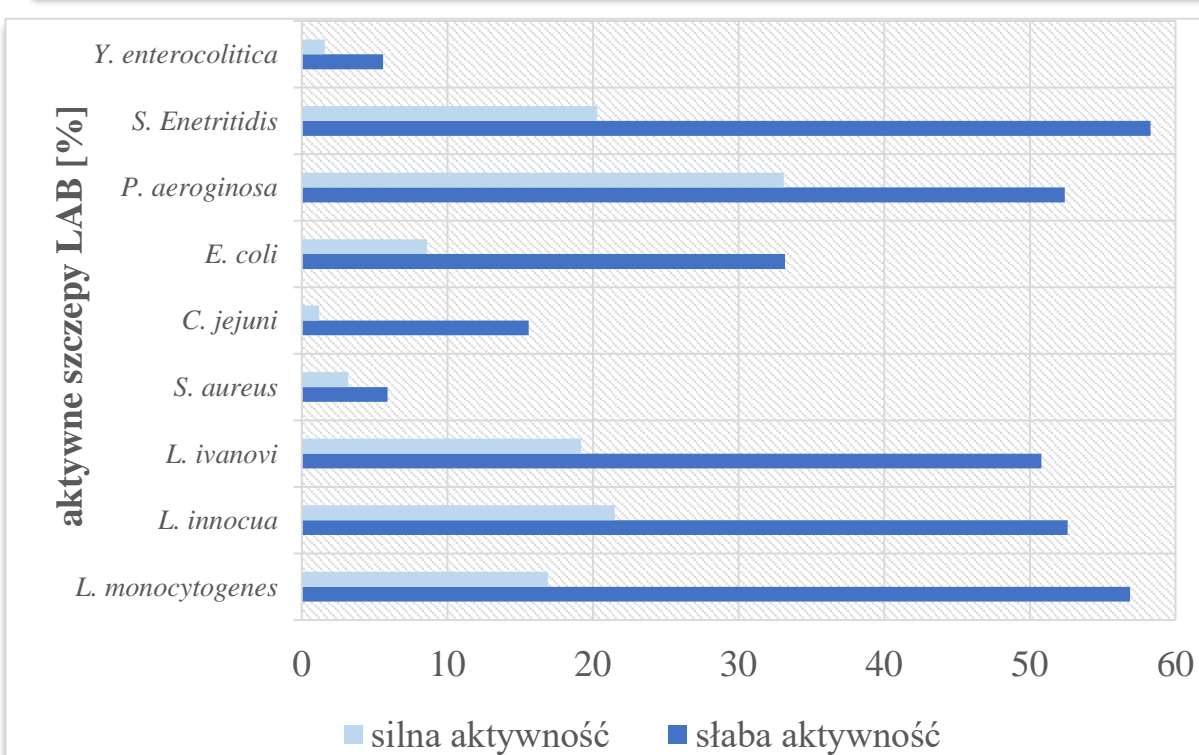
NB: bulion wzbogacony, BTL i Biomaxima
KBiMŻ: Kolekcja Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Polska
¹ warunki mikroaerofilne (8-10% CO₂, 5-6% O₂) wytwarzane za pomocą wkładów Anaerocult™ C (Thermo Scientific™)

KRYTERIA SELEKCJI



AKTYWNOŚĆ CF BADANYCH SZCZEPÓW

odsetek szczepów LAB działających antagonistycznie na bakterie chorobotwórcze



ZAKRES AKTYWNOŚCI BADANYCH SZCZEPÓW LAB

Pochodzenie szczepów LAB	Liczba badanych szczepów LAB	Liczba szczepów LAB aktywnych w stosunku do bakterii wskaźnikowych									Łącznie liczba/odsetek aktywnych szczepów
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
izolaty z bundzu	148	0	0	39	36	5	1	0	0	0	81/54,7
izolaty z bryndzy	167	5	8	26	22	1	0	0	0	0	62/37,1
izolaty z gołek	294	0	0	95	80	4	6	0	0	0	185/62,9
izolaty z osypków	189	4	34	38	13	4	3	1	0	0	97/51,3
razem	800	9	42	198	151	14	10	1	0	0	425/53,1

1-9: liczba szczepów wskaźnikowych wrażliwych na działanie CF badanych szczepów LAB

Aktywnością w stosunku do co najmniej jednego szczepu chorobotwórczego cechowało się 425 szczepów LAB - 51,3% badanych
Szeroki zakres aktywności wykazywały: 374 szczepy LAB = 88% szczepów aktywnych

SZCZEPY Z AKTYWNA FRAKCJĄ CFS I EA

- szczepy zdolne do syntezy związków o działaniu bakteriobójczym

Pochodzenie szczepów LAB	Liczba/odsetek szczepów LAB z aktywną frakcją		
	CFS	EA	EAO*
izolaty z bundzu	42/51,9	12/14,8	10/12,3
izolaty z bryndzy	24/38,7	4/6,4	2/3,2
izolaty z gołek	105/56,8	8/4,3	5/2,7
izolaty z osypków	53/54,6	22/22,7	18/18,6
razem	224/52,7	46/10,8	32/7,5

CFS (ang. *cell-free supernatant*) - wyznacznik zdolności szczepów do syntezy i sekrecji metabolitów o działaniu przeciwdrobnoustrojowym;
EA (ang. *active extract*) - wyznacznik zdolności szczepów do syntezy metabolitów, innych niż kwasy organiczne i ditlenek wodoru,
EAO (poddany obróbce EA) - wyznacznik zdolności szczepów do syntezy bakteriocyn lub bakteriocynopodobnych związków białkowych (BLIS), *utrata aktywności

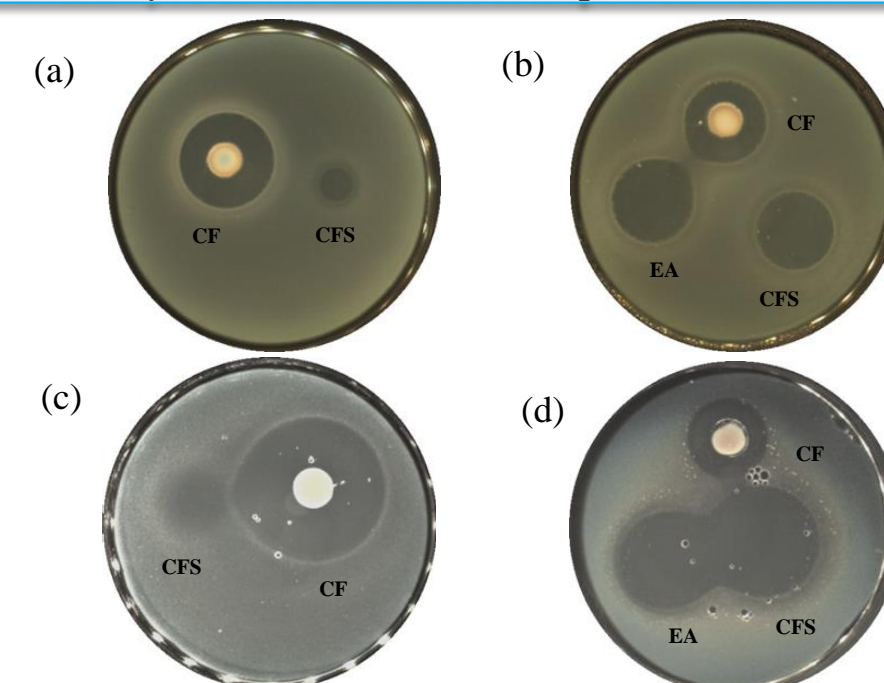
WRAŻLIWOŚĆ RÓŻNYCH SZCZEPÓW SALMONELLA ENTERITIDIS NA DZIAŁANIE CF BADANYCH LAB



NAJBARDZIEJ AKTYWNE SZCZEPY LAB

Szczep	Źródło izolacji	Maksymalna aktywność		Zakres aktywności	Główny czynnik przeciwbakteryjny
		Średnica strefy zahamowania wzrostu [mm]	Szczep chorobotwórczy		
<i>Enterococcus durans</i> 51o	osypki	20	<i>S. Enteritidis</i>	umiarkowany	konkurencja
<i>Enterococcus faecium</i> 111g	gołka	20	<i>L. monocytogenes</i>	szeroki	bakteriocyny/BLIS
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> 19b	bryndza	31	<i>P. aeruginosa</i>	wąski	konkurencja
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> 67g	gołka	28	<i>L. monocytogenes</i>	szeroki	bakteriocyny/BLIS

Aktywność CF, CFS i EA szczepów *E. durans* 51o (a), *E. faecium* 111g (b), *Leu. mesenteroides* 19b (c) oraz *L. plantarum* 67g (d) w stosunku do najbardziej wrażliwych na ich działanie szczepów chorobotwórczych



PODSUMOWANIE

- Ponad połowa szczepów LAB wyizolowanych z serów wytwarzanych metodami rzemieślniczymi wykazywała antagonistyczną aktywność w stosunku do co najmniej jednego drobnoustroju wskaźnikowego (szczepu chorobotwórczego).
- Szczepy chorobotwórcze o różnej etiologii różniły się wrażliwością na działanie metabolitów szczepów LAB.
- Najwięcej szczepów LAB było aktywnych w stosunku *S. Enteritidis*, *P. aeruginosa* i *Listeria*. Najmniej działało natomiast na *Y. enterocolitica* i *S. aureus*.
- Działanie bakteriobójcze w stosunku do więcej niż 3 szczepów chorobotwórczych wykazywało 88% aktywnych szczepów LAB. Zakres aktywności żadnego z nich nie obejmował jednak wszystkich badanych szczepów chorobotwórczych.
- Najsilniejszą aktywnością przeciwbakteryjną cechowały się szczepy *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Leuconostoc mesenteroides* oraz *Lactiplantibacillus plantarum*.
- Szczepy *E. faecium* 111g i *L. plantarum* 67g były m.in. zdolne do syntezy bakteriocyn i/lub innych bakteriocynopodobnych związków. Spektrum ich bakteriobójczego działania było jednocześnie najszersze.

WNIOSEK

Mikrobiota serów wytwarzanych metodami rzemieślniczymi na drodze spontanicznych fermentacji wykazuje potencjał przeciwdrobnoustrojowy, który może być wykorzystany do opracowania biopreparatów służących do poprawy jakości i bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności.