

Skríníng antimikrobiálních účinků bakterií mléčného kvašení a nizinu, pomocí jamkové a diskové difuzní metody

Antimikrobiální působení bakterií mléčného kvašení (BMK) spočívá zejména v produkci organických kyselin, peroxidu vodíku, oxidu uhličitého, diacetylu a bakteriocinů. Kyselina mléčná snižuje pH a v nedisociované formě způsobuje permeabilizaci vnější membrány gram-negativních bakterií a umožňuje tak přístup dalších antimikrobiálních látek k cytoplazmatické membráně bakteriální buňky. Kromě narušení membrány může kyselina mléčná porušovat homeostázu vnitřního prostředí bakteriální buňky. Antimikrobiální efekt peroxidu vodíku je založen na oxidaci sulfhydrylových skupin způsobujících denaturaci mnoha enzymů (tvorba disulfidických skupin) a na peroxidaci membránových lipidů, což vede k zvýšení membránové permeability. Oxid uhličitý se podílí na tvorbě anaerobního prostředí, které inhibuje některé enzymy. Také akumulace oxidu uhličitého ve fosfolipidové dvojvrstvě může způsobit disfunkci v permeabilitě membrány.

Bakteriociny jsou bohatou a rozmanitou skupinou antimikrobiálních látek bakteriálního původu, kterými bakterie mezi sebou soupeří. Jsou to ribosomálně syntetizované, extracelulárně uvolněné peptidy nebo proteiny (obvykle 30 – 60 aminokyselin). Mají baktericidní nebo bakteriostatický účinek na jiné bakterie, buď druhově příbuzné (úzké spektrum působení), nebo bakterie jiného druhu (široké spektrum působení). Bakteriociny jsou produkovány jak grampozitivními tak i gramnegativními bakteriemi, včetně mnoha druhů bakterií mléčného kvašení. Cílem jejich aktivity je většinou plazmatická membrána bakterií. Bakteriociny jsou aktivní hlavně proti grampozitivním bakteriím, protože vnější membrána gramnegativních bakterií je před jejich účinky chráněná. V posledních letech se dostává zvláštní pozornosti bakteriocinům produkovaným BMK díky jejich potenciální aplikaci v potravinářském průmyslu. Lze je použít jako přírodní konzervační látky působící proti patogenním bakteriím a bakteriím způsobujícím kažení, čímž poskytují mikrobiologicky stabilní potraviny.

Nejnámějším komerčně využívaným bakteriocinem je nizin. Jde o antimikrobiální polypeptid izolovaný z *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Tento bakteriocin se skládá z 34 AMK a obsahuje jeden lanthioninový kruh a čtyři β -methyllanthioninové kruhy. Bylo objeveno a charakterizováno 6 různých forem nizinu (označeny jako nizin A až E a nisin Z). Nizin působí především proti grampozitivním bakteriím, jako jsou např. *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus luteus* a *Micrococcus flavus*.

K stanovení citlivosti mikroorganismů k antimikrobiální látce se běžně používá disková difuzní a jamková difuzní metoda. **Disková difuzní metoda** je založena na difuzi antimikrobiální látky z papírového disku do agarové půdy, kdy je agar naočkován stanovenou koncentrací mikroorganismu. Suspenze testovaného kmene musí být v takovém množství, aby po nanesení a odstranění přebytku z povrchu rostly kolonie v těsném dotyku. Absorpce vody z půdy dochází k uvolňování látky, která následně difunduje do média. Během inkubace dochází k růstu bakterií až do inhibiční koncentrace gradientu difuze antimikrobiální látky. Jakmile je jí dosaženo, přestává viditelný růst bakterií a dochází k vytvoření tzv. inhibiční zóny v okolí zdroje antimikrobiální látky.

Princip **jamkové difuzní metody** je podobný jako u diskové difuzní metody. Rozdílná je pouze aplikace antimikrobiální látky, kdy se místo přikládání papírových disků pipetuje antimikrobiální látka přímo do jamek hloubených v agarovém médiu.

Úkol 1 – Skrining antimikrobiálních účinků vybraných BMK a nizinu, pomocí jamkové difuzní metody

Testované mikroorganismy: *Enterococcus durans*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis*, *Lb. plantarum*.

Testované BMK na antimikrobiální aktivitu: *Enterococcus faecium* CCDM 945, *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CDM 686, *Lc. lactis* biovar. *diacetylactis* CDM 689, *Lactobacillus acidophilus* CCDM 79.

Postup:

a) Příprava supernatantu:

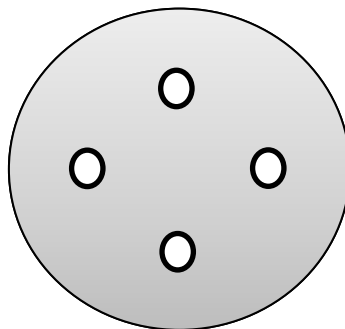
- Kultivační médium po 72 hodinové kultivaci testovaných BMK (*Enterococcus faecium* CCDM 945, *Lactococcus lactis* biovar. *diacetylactis* CDM 686, *Lc. lactis* biovar. *diacetylactis* CDM 689 a *Lactobacillus acidophilus* CCDM 79) zcentrifugujte při 10 000 g 15 min. Získaný supernatant odeberte do sterilních zkumavek.

b) Příprava misek s inokulem:

- 24h suspenzi testovaných mikroorganismů (*Enterococcus durans*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis* a *Lb. plantarum*) zředte desítkovým ředěním až na ředění 10^{-4} .
- Z příslušného ředění (10^{-2} – 10^{-4}) odeberte 1 ml inokula a naočkujte na sterilní Petriho misky. Poté zalijte zchladlým médiem (asi 40 °C) a opatrně krouživým pohybem zamíchejte a nechte utuhnout.
- Po utužení agaru vykrojte sterilním nástrojem jamky o průměru cca 0,6 cm (viz Obr. 2).

c) Dávkování supernatantu a nizinu:

- Do příslušných jamek nadávkujte 100 μ l připraveného supernatantu nebo příslušnou koncentraci nizinu.
- Nechte 24 – 48 hodin kultivovat za podmínek vhodných pro inhibovaný mikroorganismus.



Obr. 1 – Schéma rozmístění jamek (disek) na Petriho misce

Hodnocení:

Po kultivaci (podle druhu testovaného mikroorganismu) vyhodnotíme tvorbu inhibičních zón a změříme jejich průměr (včetně jamek).

Úkol 2 – Skrining antimikrobiálních účinků vybraných BMK a nizinu, pomocí diskové difuzní metody

Testované mikroorganismy: *Enterococcus durans*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus brevis*, *Lb. plantarum*.

Postup:

- 24h suspenzi testovaných mikroorganismů zředíte desítkovým ředěním až na ředění 10^{-4} .
- Z příslušného ředění (10^{-2} – 10^{-4}) odeberte 0,1 ml inokula a naočkujte na Petriho misky s živnou půdou. Sterilní hokejkou inokulum rovnoměrně rozetřete po povrchu agarové plotny. Nechte zaschnout.
- Na připravené disky o průměru 6 mm naneste pipetou 50 μ l supernatantu nebo příslušnou koncentraci nizinu. Nechte zaschnout.
- Poté připravené disky sterilní pinzetou nebo jehlou přeneste na povrch agarové plotny s naočkovaným kmenem (viz Obr. 2).
- Petriho misky nechte 24 – 48 hodin kultivovat za podmínek vhodných pro inhibovaný mikroorganismus.

Hodnocení:

Po kultivaci (podle druhu testovaného mikroorganismu) vyhodnotíme tvorbu inhibičních zón a změříme jejich průměr.