

PODMÍNKY TVORBY BIOFILMU U *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Sabina Purkrťová, Tereza Pilchová, Jarmila Ďurišová, Kateřina Demnerová, Jarmila Pazlarová

Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie,

Vysoká škola chemicko technologická v Praze, Technická 5, 166 24, Česká republika

Abstrakt

Účelem této studie bylo nalezení podmínek pro tvorbu biofilmu u *Listeria monocytogenes* v modelovém systému za použití mikrotitračních destiček a nalezení účinného desinfekčního prostředku k odstranění biofilmu a inaktivace listerie v něm. Sbírkový kmen *Listeria monocytogenes* CCM 7202 (ATCC 13932) a průmyslový izolát *Listeria monocytogenes* byly porovnány ve svých schopnostech tvořit biofilm. Z testovaných médií a teplot (8, 25, 30, 37 °C) byly jako optimální pro tvorbu biofilmu vyhodnoceny pufrovaná peptonová voda (PPV) obsahující 0,05% glukózy a 30 °C. Na vzniklý biofilm byly vyzkoušeny desinfekční přípravky Merades Alco (směs ethanolu a propanolu) a 50% etanol. Žádný z testovaných přípravků nebyl schopen zcela odstranit vzniklý biofilm, ale při testování následného růstu po ošetření desinfektantem, se jako nejúčinnější ukázalo 30 minutové působení prostředkem Merades Alco.

Conditions for biofilm development of *Listeria monocytogenes*

Abstract

The objective of this study was to learn the optimal conditions for biofilm development of *Listeria monocytogenes* on a model system using microtiter plates and to find some effective disinfecting agent for removing of biofilm and inactivation of listeria in it. *Listeria monocytogenes* CCM 7202 (ATCC 13932) and an industry isolate of *Listeria monocytogenes* were compared in their ability to form biofilm. From tested media and temperatures (8, 25, 30, 37 °C) buffered peptone water (BPW) with 0.05% glucose in 30 °C was found as the most optimal medium for forming biofilm. Following disinfectants were applied: Merades Alco (mixture of ethanol and propanol) and 50% ethanol. Any of these agents were not able to remove the biofilm completely, but the subsequent growth was most efficiently repressed after 30 min treatment of Merades Alco.

Úvod

Listeria monocytogenes je grampozitivní patogenní bakterie přenášená potravinami, která je široce rozšířená v životním prostředí. *L. monocytogenes* je odpovědná za

onemocnění označované jako listerióza, které má průměrnou úmrtnost 20-30%. Tato bakterie může přetrvávat v technologických zařízeních potravinářských závodů po mnoho let a tvoří významnou kontaminaci (Boruckí a kol., 2003).

L. monocytogenes má schopnost ulpívat a tvořit biofilmy na mnoha typech povrchových materiálů (Kalmokoff a kol. 2001). Je známo, že mnohé bakterie jsou schopné kolonizovat různé povrchy a tvořit na nich trojrozměrnou matici složenou z buněk a polymerních látek vylučovaných těmito buňkami (extracellular polymeric substances, EPS), kterou označujeme jako biofilm. Biofilmy jsou tvořeny soubory mikroorganismů obklopených slizovitými látkami, které vylučují, a mohou se tvořit jak na inertních površích, tak na jiných živých organismech (Poulsen, 1999). Toto uspořádání umožňuje mikroorganismům přežít dlouhodobě v prostředí a odolávat vysušení, UV záření a ošetření antimikrobiálními a sanitačními prostředky. Je značně obtížné zamezit tvorbě biofilmů, neboť ty se tvoří v podmínkách, kde je dostatek vody a čištění není řádně prováděno. V mlékárenských závodech se daří izolovat biofilmy tvořené *L. monocytogenes* z plnicích nebo balicích linek, odpadů vody v podlahách, ze stěn, chladicích trubek, dopravních pásů a unašečů užívaných k balení výrobků, stojanů a polic na výrobky, ručních nástrojů a rukavic (Tompkin a kol.1999). Ke sledování zákonitostí a podmínek tvorby bakteriálních povlaků a kolonizaci různých typů povrchů byla navržena celá řada přímých i nepřímých experimentálních postupů (Lindsay a von Holy, 1997; Poulsen, 1999).

Postup využívající kultivace bakterií v mikrotitračních destičkách patří k nepřímým metodám měření množství bakterií *in situ* a lze jej použít pro kvantitativní rozbor množství vytvořeného biofilmu. V této práci byla použita metoda využívající mikrotitračních destiček popsána Djordjevicem a kol., 2002. Cílem této studie bylo nalézt vhodné médium pro tvorbu biofilmu u *L. monocytogenes*, dále porovnat sbírkový kmen s izolátem z průmyslu a vyzkoušet odolnost vzniklého biofilmu k desinfekčním prostředkům.

Materiál a metody

Kultivace. V této práci byly použity dva kmeny: *Listeria monocytogenes* CCM 7202 a průmyslový izolát *Listeria monocytogenes* Lm-24 (výrobní sýrů). Zásobní kultury obou kmenů byly uchovávány v mozkosrdcovém bujonu (BHI, Merck, Německo) s 25% obsahem glycerolu při -80 °C. Pracovní kultury byly kultivovány na Plate count agaru (PCA, Oxoid, GB) po 24 hodin při 37 °C a po nárůstu skladovány při 4 °C.

Média. Testy na tvorbu biofilmu byly prováděny v následujících médiích: pufrovaná peptonová voda (PPV, Oxoid, GB), PPV s 5,0% NaCl, PPV s 0,5% NaCl, PPV s 0,5% glukózy, PPV s 0,05% glukózy, PPV s 5,0% NaCl a 0,5% glukózy, PPV s 0,5% NaCl a 0,05% glukózy, dále fyziologický roztok (FR), mozkosrdcový bujon (BHI) a desetkrát naředěný BHI.

Test pro sledování tvorby biofilmu na mikrotitrační destičce

Ke sledování tvorby biofilmu byla použita nepřímá metoda barvení biofilmu krystalovou violetí (Djordjevic a kol., 2002). Mikrotitrační destičky COSTAR 3797 vyrobené z polystyrénu (Corning Incorporated, USA) byly vyzkoušeny a vybrány jako standardní pomůcka ve všech experimentech. Před každým experimentem byla odebrána jedna kolonie z PCA a kultivovaná v 10 ml BHI při 37 °C po dobu přibližně 20 hodin. Tato kultura byla poté naředěna do shora uvedených médií takto: 1:100, 3:100 a 5:100 a další ředění odpovídalo 0,5 stupni McFarlandovy stupnice. Mikrotitrační destičky byly promyty 70% ethanolom a vysušeny na vzduchu. Do jamek mikrotitrační destičky bylo vždy přeneseno 100 μ l naředěné kultury v testovaném typu média. Pro každý typ média a ředění bylo k měření použito celkem 16 jamek (dvě řady po osmi jamkách). Souběžně bylo v dalších 16 paralelách též prováděno měření s nezaočkovaným médiem. Každý pokus byl opakován dvakrát při inokulaci z různých kolonií. Mikrotitrační destičky byly poté kultivovány při 30 °C po dobu 20 hodin. Vždy před a po 20 hodinové inkubaci byly všechny jamky proměřeny spektrofotometrem Tecan-Spectra 9440012 (Tecan, Švýcarsko) při 620 nm. Po 20 hodinách inkubace byl obsah všech jamek destičky odstraněn a destička byla pětkrát promyta pomocí promývačky Multiwash (Labsystems, USA) sterilní destilovanou vodou, aby se odstranily volné a volně uchycené bakterie. Destičky pak byly ponechány na vzduchu k vyschnutí po 45 min a poté se do každé jamky přidalo 150 μ l 1% vodného roztoku krystalové violeti. Barvení probíhalo 45 minut. Po obarvení následovalo pětinašobné promytí sterilní destilovanou vodou a nakonec se destičky nechaly vyschnout na vzduchu (cca 30 min). Pro kvantitativní vyhodnocení tvorby biofilmu bylo přidáno do každé jamky 200 μ l 95% ethanolu k odbarvení, které probíhalo 5 min. Z každé jamky bylo dále přeneseno 100 μ l odbarvovacího roztoku do nové mikrotitrační destičky a proměřena jeho absorbance při 620 nm. Vliv teploty na tvorbu biofilmu při teplotách 8, 25, 30 a 37 °C byl ověřován stejným postupem za použití dvou médií poskytujících nejvyšší tvorbu biofilmu - PPV s 0,05% glukózy a v PPV při počáteční koncentraci inokula 0,5 stupně McFarlandu. Kultivace poté probíhala za vybrané teploty.

Testování účinnosti desinfekčních prostředků

Testování účinnosti desinfekčních prostředků probíhalo za těchto podmínek - PPV s 0,5% glukózy, výchozí koncentrace inokula 0,5McFarlandu a teplota inkubace 25 °C. Časy působení desinfekčních prostředků byly 1, 5, 10 a 30 min. Účinnost byla testována jak při aplikaci přímo do suspenze, tak při aplikaci na vzniklý biofilm. V případě testu aplikace do suspenze byl po 20 hodinové inkubaci přidán testovaný desinfekční přípravek v objemu 150 μ l přímo do suspenze v jednotlivých jamkách. V případě testu

aplikace na biofilm byl obsah mikrotitrační destičky po 20 hodinové inkubaci odstraněn a 150 μ l testovaného desinfekčního prostředku bylo aplikováno přímo na vzniklý biofilm. V obou případech byla po uplynutí doby působení desinfekčního prostředku destička standardně ošetřena postupem popsáním výše. Z desinfekčních prostředků byl použit 50% ethanol a Merades Alco (směs ethanolu a propanolu, MERAK, spol. s r.o., Česká republika).

Při testování vlivu desinfekčního média na vitalitu buněk biofilmu byly destičky připravené za shora uvedených podmínek podrobeny stejným způsobem působení desinfekčního činidla při aplikaci do suspenze a na biofilm. Následně místo barvení biofilmu bylo ovšem do jamek opět přidáno 100 μ l média PPV s 0,5% glukózy a změřena absorbance při 620 nm ihned a po 22 hodinách nárůstu při 25 °C.

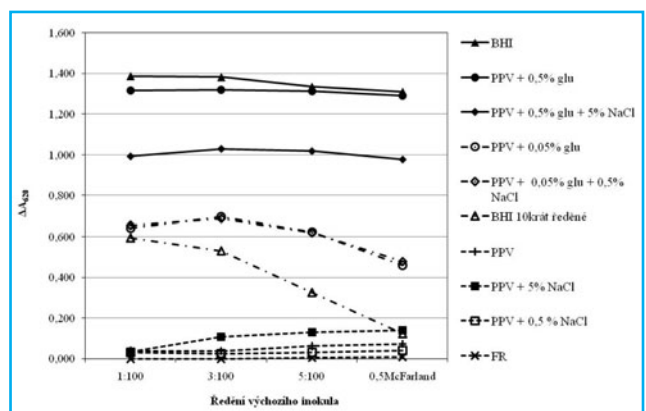
Statistika

Naměřené hodnoty byly statisticky vyhodnoceny pomocí software Statistica 8 (StatSoft, USA). Jako možný zdroj chyb byl uvažován vliv nedostatečného odmytí nenavázané krystalové violeti, který následně zvyšuje absorbanci při odbarvení, stejně jako vysoké hodnoty absorbance nárůstu v porovnání s ostatními paralelami. Jako odlehle hodnoty byly proto vyloučeny hodnoty ležící nad 75. percentilem. Z ostatních hodnot byl určen medián a směrodatná odchylka, jejíž dvojnásobek určuje interval obsahující 95% uvažovaných hodnot.

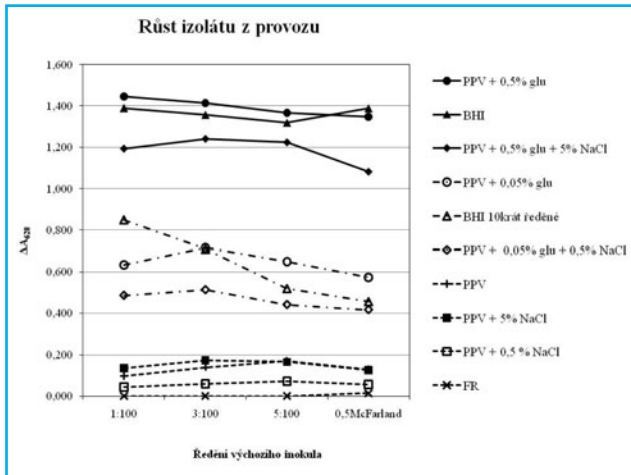
Výsledky a diskuse

Růst *L. monocytogenes* CCM 7202 v různých médiích v závislosti na výchozí koncentraci inokula je zobrazen na obr. 1 (0,5 stupně McFarlanda je přibližně rovno ředění 5:100). Obr. 2 poté zachycuje růst u izolátu z provozu. Schopnost růstu byla určena jako rozdíl absorbancí (620 nm) suspenzí na počátku kultivace a suspenzí po 20hodinové kultivaci. Z obrázku je zřejmé, že z hlediska schopnosti růstu lze rozdělit média do čtyř skupin. Mezi média s vysokým nárůstem ($\Delta A_{620}=1-1,4$) patří BHI, PPV

Obr. 1 Růst *L. monocytogenes* CCM 7202 v různých médiích při teplotě 30 °C za dobu 20 hodin.



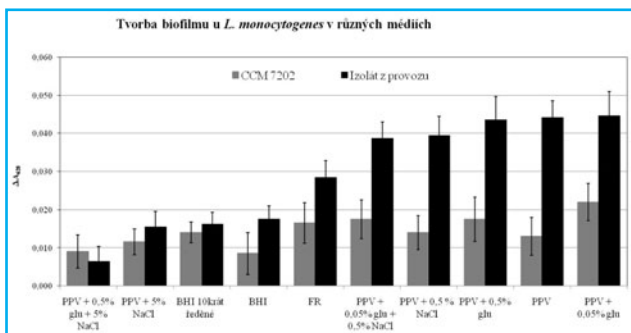
Obr. 2 Růst izolátu z provozu v různých médiích při teplotě 30 °C za dobu 20 hodin.



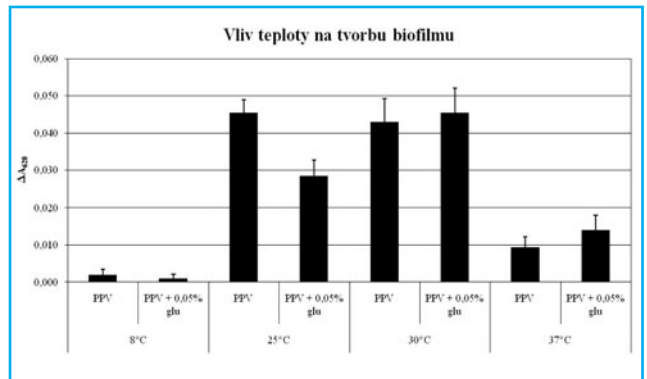
s 0,5 % glukózy a PPV s 0,5 % glukózy a s 5% NaCl. Střední nárůst ($\Delta A_{620}=0,4-0,8$) nastává v 10krát ředěném BHI, v PPV s 0,05 % glukózy a v PPV s 0,05 % glukózy a 0,5% NaCl. Nejnižší nárůst ($\Delta A_{620}=0,02-0,2$) byl zjištěn v PPV, v PPV s 5% NaCl a PPV s 0,5% NaCl. Ve fyziologickém roztoku žádná z testovaných kultur nerostla. Schopnost růstu v různých médiích se u obou kmenů v zásadě nelišila. Pouze u PPV s 0,5 % glukózy a s 5% NaCl rostl lépe průmyslový izolát ($\Delta A_{620}=1,2$) oproti sbírkovému kmenu CCM 7202 ($\Delta A_{620}=1$). Tuto vlastnost je možno vysvětlit jako lepší adaptaci průmyslového izolátu na vyšší obsah soli v médiu.

Ověřili jsme závislost tvorby biofilmu na velikosti inokula (data nejsou ukázána), ale tento faktor měl menší vliv než složení media. Tvorba biofilmu byla měřena při počáteční koncentraci inokula 0,5 stupně McFarlanda, kdy byl tvořen v nejvyšší míře, a je zachycena na obr. 3. Nejvyšší tvorby biofilmu ($A_{620}=0,043-0,046$) bylo dosaženo v PPV s 0,05% glukózy, dále v PPV bez přídavku glukózy a v PPV s 0,5% glukózy. Přídavek 0,5% NaCl tvorbu biofilmu mírně snižoval. Na těchto médiích došlo u průmyslového izolátu k dvoj až trojnásobnému zvýšení tvorby biofilmu oproti sbírkovému kmeni. Naopak PPV s přídavkem 5% NaCl a 5% NaCl s 0,5% glukózy zřejmě vlivem snížené aw patřila k médiím s velmi nízkou tvorbou biofilmu. Nejnižší tvorba biofilmu u průmyslového izolátu

Obr. 3 Tvorby biofilmu u dvou kmenů *L. monocytogenes* při teplotě 30 °C, výchozí koncentrace inokula 0,5 McFarlanda za dobu 20 hodin.



Obr. 4 Vliv teploty na tvorbu biofilmu u průmyslového izolátu *L. monocytogenes*, výchozí koncentraci inokula 0,5 McFarlanda v PPV a v PPV s 0,05% glukózy za dobu 20 hodin.



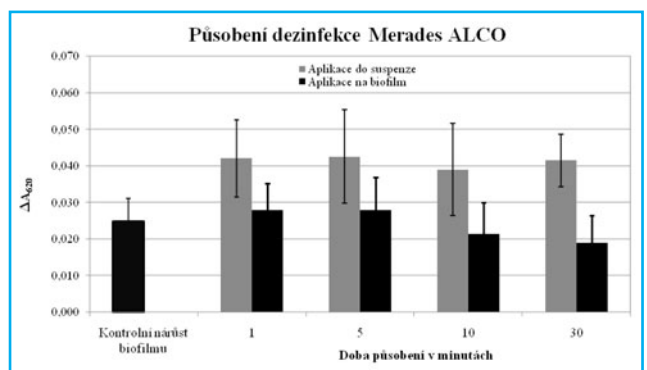
byla naměřena na PPV s 0,5% glukózy a 5% NaCl, jak ukazuje obr. 3, kde průmyslový izolát v tomto jediném případě tvořil biofilm méně než sbírkový kmen.

Testování vlivu teploty na tvorbu biofilmu bylo provedeno pouze s kmenem lépe tvořícím biofilm, což byl izolát z provozu, na dvou typech médií: PPV a PPV s 0,05% glukózy a počáteční koncentrací inokula 0,5 stupně McFarlanda. Výsledky srovnání tvorby biofilmu při teplotách 30 °C, 8 °C, 25 °C a 37 °C jsou shrnuty v obr. 4. V případě PPV s 0,05% glukózy byla tvorba biofilmu při 30 °C vyšší než při 25 °C, u PPV bez přídavku glukózy bylo dosaženo podobných výsledků u obou teplot. Při 37 °C byla tvorba biofilmu přibližně čtyřikrát nižší než při 30 °C pro obě média a při 8 °C k tvorbě biofilmu takřka nedocházelo.

Stejnou techniku, tj. barvení biofilmu krystalovou violetí na mikrotitračních destičkách, použili Borucki a kol., 2003. Jejich výsledky potvrdily reprodukovatelnost této metody na souboru 80 kmenů *L. monocytogenes*. Bylo prokázáno, že perzistentní kmeny *L. monocytogenes* tohoto souboru vykazovaly vyšší tvorbu biofilmu.

Při stanovení vlivu dezinfekčních prostředků bylo nejdříve prováděno testování schopnosti odstranit vzniklý biofilm. Doby působení byly 1 min, 5 min, 10 min a 30 min. Výsledky pro Merades Alco jsou na obr. 5, z kterého je zřejmé, že při aplikaci do suspenze nedocházelo k destrukci a úbytku biofilmu, naopak docházelo ke zvyšování absorbance. Tento

Obr. 5 Vliv dezinfekce Merades Alco na destrukci biofilmu v PPV s 0,5% glukózy při 25 °C, výchozí koncentrace 0,5 McFarlanda za dobu 22 hodin.



Tab. 1 Účinnost desinfekčních prostředků na vitalitu buněk biofilmu

Nárůst po 22 hodinách (% ΔA_{620})		Doba působení (min)				
Desinfekční prostředek	Způsob aplikace	0	1	5	10	30
Merades Alco	aplikace do suspenze	100,0%	1,3%	0,4%	0,4%	0,2%
	aplikace na biofilm	100,0%	0,0%	0,2%	0,1%	0,1%
50% ethanol	aplikace do suspenze	100,0%	1,0%	2,4%	4,4%	2,2%
	aplikace na biofilm	100,0%	0,6%	0,8%	0,5%	0,4%

jev byl zřejmě způsoben vazbou Merades Alco na strukturu biofilmu. V případě aplikace přímo na biofilm docházelo k jeho částečnému odstranění, ale až po 30 minutách působení. U 50% ethanolu docházelo k podobné situaci.

Zajímalo nás, zda biofilm ošetřený desinfekčním prostředkem je vitální. Proto jsme po obou způsobech aplikace testovaný prostředek odstranili a do jamek vnesli stejné medium, které tam bylo předtím. Po 22 h inkubace při 25 °C jsme měřili kvantitu nárůstu buněk. Výsledky, které jsou shrnuty v tab. 1., ukazují vyšší účinnost přípravku Merades Alco před 50% ethanolom. Míra nárůstu ΔA_{620} při neošetření desinfekčním prostředkem byla průměrně rovna 1,383. K této hodnotě byly poté procentuálně vztaheny míry nárůstu ΔA_{620} při ošetření jednotlivými desinfekčními prostředky. Technika měření množství biofilmu pomocí krystalové violeti, kterou jsme použili, neumožňuje rozlišení mrtvé a živé biomasy. Pouze postupy, kde je možno měřit vitalitu buněk následnou kultivací, prokázaly vysokou účinnost použitých desinfekčních prostředků.

Závěr

Potvrdili jsme, že zvolená metoda podle Djordjevice je vhodná pro kvantitativní hodnocení tvorby biofilmu u *Listeria monocytogenes*. Průmyslový izolát za testovaných podmínek tvořil biofilm lépe. Proto byl použit jako modelový kmen pro hodnocení účinku dvou desinfekčních prostředků. Jako vhodná metoda pro hodnocení účinku desinfekčních prostředků na odstranění biofilmu se jevila technika barvení biofilmu krystalovou violetí. Pro průkaz inaktivace (devitalizace) *Listeria monocytogenes* v biofilmu je třeba použít kultivačních metod.

Poděkování

Tato práce vznikla díky finanční podpoře projektu MŠMT 2B08050 a 6.FP EU Biotracer.

Přijato do tisku: 20. 12. 08

Lektorováno: 10. 1. 09

Literatura

- Borucki M.K., Peppin J.D., White D., Loge F., Call D.R.: Appl. Environ. Microbiol. 69, 7336-7342 (2003).
 Djordjevic D., Wiedman M., McLandsborough L.A.: Appl Environ. Microbiol. 68, 2950-2958 (2002).
 Kalmokoff M.L., Austin J.W., Wan X.-D., Sanders G., Banerjee S., Farber J.M.: J. Appl. Microbiol. 91, 725-734 (2001).
 Lindsay, D., von Holy A.: Food Microbiol. 22, 285-307 (1997).
 Poulsen, V.L.: Lebensm.-Wiss.U.-Technol. 32, 321-326 (1999).
 Tompkin, R.B., Scott V.N., Bernard D.T., Sveum W.H., Gombas K.S.: Food Environ. Sanit. 19, 551-562 (1999).

VLIV OBSAHU *PROTOTHECA ZOPFII* A *CANDIDA LUSITANIAE* NA KVALITU SYROVÉHO MLÉKA

Seydlová R.¹, Snášelová J.¹, Soukupová A.²

¹ Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

² Veterinární laboratoř, VEDIA s.r.o.

Abstrakt

Studie z období 2004-2007 shrnuje výsledky negativního působení dvou mastitidních patogenů kvasinky *Candida lusitaniae* a řasy *Prototheca zopfii* na biochemické změny v syrovém mléce. Přítomnost těchto patogenů v mléce může být důsledkem probíhajících mykotických mastitid u dojnic. Přídavek takového mléka k mlékárensky zpracovávané surovině navzdory pasteračnímu efektu má významný vliv na změny bílkovin, tuku, obsahu močoviny a laktózy vzhledem k enzymatické výbavě mikroorganismů. Zejména v koncentracích 10^3 - 10^4 citovaných patogenů vznikají významné biochemické změny složení mléka, kdy dochází i k negativnímu ovlivnění jeho skladovatelnosti a technologické použitelnosti.

Effect of *Prototheca zopfii* and *Candida lusitaniae* level on raw milk quality

Abstract

The study from 2004-2007 of two mastitis pathogens, yeast *Candida lusitaniae* and algae *Prototheca zopfii* summarizes the results of negative action on biochemical changes in raw milk. The presence of these pathogens in milk can be caused by mycotic mastitis of milk cows. The addition of such milk to dairy treatment raw milk in spite of pasteurization effect has significant influence on proteins, fat, urea content and lactose changes. This is affected by enzymatic equipment of microorganisms. The significant biochemical changes of milk composition and negatively influences its shelf life and technological applicability was given especially in concentration 10^3 - 10^4 above mentioned pathogens.

Úvod

Kontrola hygienické kvality mléka je principiálně založena na prevenci potenciálního poškození zdraví