

GRAMOVO BARVENÍ A DALŠÍ JEDNODUCHÉ TESTY PRO ROZLIŠENÍ MIKROORGANISMŮ

Irena Němečková¹, Jana Chramostová¹,
Andrea Mühlhansová¹, Iva Jebavá², Sabina Purkrtová²

¹ - Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

² - Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Gram-staining and other simple tests for differentiation of microorganisms

Souhrn

Na souboru 57 mikroorganismů izolovaných ze syrového mléka, mléčných výrobků a zeleninových šťáv byla testována praktická využitelnost jednoduchých biochemických a dalších mikrobiologických testů pro potřeby mlékárenské praxe. Rozlišení Gram-pozitivních, Gram-negativních bakterií a kvasinek bylo prováděno pomocí barvení mikroskopického preparátu, KOH testem a detekcí L-alanin-aminopeptidasy. Bakterie a kvasinky bylo možné rozlišit pouze mikroskopicky. Metabolismus sacharidů byl sledován s využitím sacharidových disků, na agaru s glukosou nebo s laktosou, pomocí disků detekujících β -galaktosidasu či na OF mediu pro rozlišení oxidačního a fermentačního typu metabolismu. Pro diferenciaci mikroorganismů se nejlépe osvědčily sacharidové disky. Kromě toho byly provedeny testy na katalasu a oxidasu.

Klíčová slova: aminopeptidasa, KOH test, fermentační vlastnosti

Summary

Usability of simple biochemical and other microbiological tests for needs of dairy practice was tested on a file of 57 microorganisms isolated from raw milk, dairy products and vegetable juices. Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeasts were distinguished by staining of microscopical preparation, KOH test and detection of L-alanine-aminopeptidase. Only microscope was able to distinguish between bacteria and yeasts. Metabolism of saccharides was tested by saccharide discs, agar with glucose or lactose, discs for detection of β -galactosidase or OF medium for differentiation between oxidative and fermentative metabolism. Saccharide discs were the best tool for categorization of microorganisms. Moreover, tests on katalase and oxidase were performed.

Key words: aminopeptidase, KOH test, fermentative properties

Úvod

Identifikace mikroorganismů či charakterizace mikroflóry v mlékárenských vzorcích z hlediska druhové roz-

manitosti či potenciálního zdravotního rizika, technologických problémů nebo kažení finálních mléčných výrobků představuje stále aktuální výzvu.

Značná pozornost byla a je věnována metodám pro detekci a typizaci patogenních mikroorganismů. K dispozici jsou rozmanité metody od kultivačních postupů, často založených na kombinaci selekčních činidel a chromogenních substrátů, přes imunochemické metody, např. enzymová imunoanalýza na pevné fázi - ELISA, imunochromatografické testy - LFIA, aj., až po metody molekulární biologie, jako jsou např. kvalitativní PCR metody, kvantitativní real-time PCR, genotypizační metody v různém uspořádání, např. AFLP, REP-PCR, ERIC-PCR, RAPD, PFGE, aj. (Demnerová, 2012).

Relativně méně propracované jsou metody pro studium mikroorganismů způsobujících kažení. Základní představu o mikroflóře vzorků poskytují klasické kultivační metody, např. pro stanovení celkového počtu mikroorganismů, kvasinek a plísní, bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, psychrotrofních mikroorganismů, proteolytických mikroorganismů, apod.

Pro vlastní identifikaci jsou pak vhodné metody založené na porovnání profilů jednotlivých kmenů s databázemi. Zde se uplatní např. sekvenace vybraných genů kódujících rRNA nebo analýza proteinových profilů pomocí Maldi-TOF MS, popř. biochemické identifikační soupravy sestavené speciálně pro určité skupiny mikroorganismů (např. API testy, ENTEROtesty, STAPHYtesty, ANAEROtesty, apod.) (Jebavá a kol., 2013).

Cílem této práce je doporučit jednoduché, rychlé, instrumentálně a cenově dostupné testy pro primární klasifikaci mikroorganismů přítomných v mlékárenských vzorcích, které by byly využitelné přímo na mlékárnách či v servisních laboratořích.

Materiál a postup práce

Mikroorganismy

Při práci byly použity kmeny izolované ve VÚM ze syrového mléka, mléčných výrobků a zeleninových šťáv, které byly identifikovány v kombinaci metod Maldi-TOF, sekvenace úseků genů pro 16S rRNA a biochemické identifikace. Přehled kmenů včetně podmínek pro jejich pomnožení pro jednotlivé experimenty je uveden v tab. I. Pokud daný kmen nerostl pomaleji, bylo dále pracováno s 24h kulturou.

Rozlišení Gram-negativních bakterií, Gram-pozitivních bakterií a kvasinek

Mikroorganismy byly rozlišeny takto:

- na základě identifikace,
- barvení mikroskopického preparátu podle Grama,
- KOH test - kolonie byla přenesena na podložní sklíčko a přikápnut byl 3% roztok KOH - jestliže se tato suspenze po rozmíchání kličkou táhne, jedná se o Gram-negativní bakterie,
- pomocí kitu detekujícího L-alanin aminopeptidasu (Sigma-Aldrich) - kolonie byla suspendována v 0,2 ml

Tab. I Přehled použitých mikroorganismů a podmínek jejich kultivace

Kmen	Identifikace	Původ	Půda	Podmínky kultivace
02	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	syrové mléko	GTK	37 °C
03	<i>Chryseobacterium</i> sp.	syrové mléko	GTK	30 °C
04	<i>Kocuria rhizophila</i>	syrové mléko	GTK	30 °C
05	<i>Acinetobacter</i> sp.	syrové mléko	GTK	30 °C
08	<i>Pseudomonas</i> sp.	syrové mléko	GTK	30 °C
011	<i>Serratia liquefaciens</i>	syrové mléko	GTK	37 °C
013	<i>Enterobacter</i> sp.	syrové mléko	GTK	37 °C
015	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	syrové mléko	GTK	30 °C
016	<i>Acinetobacter</i> sp.	syrové mléko	GTK	30 °C
017	<i>Shewanella</i> sp.	syrové mléko	GTK	37 °C
018	<i>Comamonas testosteroni</i>	syrové mléko	GTK	30 °C
019	<i>Kocuria varians</i>	syrové mléko	GTK	30 °C
M03	<i>Acinetobacter baumannii</i>	bombážované UHT mléko	GTK	30 °C
KM1	<i>Candida</i> sp.	bombážovaný fermentovaný mléčný nápoj	GKCH	25 °C
ZM1	<i>Candida parapsilosis</i>	zahuštěné slazené mléko	GKCH	25 °C
A1	<i>Bacillus licheniformis</i>	bílý sýr	GTK	30 °C
A7	<i>Bacillus licheniformis</i>	bílý sýr	GTK	30 °C
A10	<i>Candida guilliemondii</i>	bílý sýr	GKCH	25 °C
A11	<i>Candida lusitanae</i>	bílý sýr	GKCH	25 °C
A12	<i>Bacillus licheniformis</i>	bílý sýr	GTK	30 °C
N6	<i>Debaryomyces hansenii</i>	solný nálev	GKCH	25 °C
N9	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	solný nálev	GTK	37 °C
N11	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	solný nálev	GTK	37 °C
N12	<i>Staphylococcus equorum</i>	solný nálev	GTK	37 °C
N13	<i>Staphylococcus hominis</i>	solný nálev	GTK	37 °C
N14	<i>Debaryomyces hansenii</i>	solný nálev	GKCH	25 °C
N26	<i>Serratia marcescens</i>	solný nálev	GTK	37 °C
N31	<i>Staphylococcus hominis</i>	solný nálev	GTK	37 °C
1z	<i>Debaryomyces hansenii</i>	zduřelý dohříváný sýr	GKCH	25 °C
4z	<i>Kocuria kristiana</i>	zduřelý dohříváný sýr	GTK	30 °C
6z	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	zduřelý dohříváný sýr	GTK	30 °C
7z	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	zduřelý dohříváný sýr	GTK	37 °C anaer.
8z	<i>Staphylococcus hominis</i>	zduřelý dohříváný sýr	GTK	37 °C
9z	<i>Lactobacillus curvatus</i>	zduřelý dohříváný sýr	GTK	37 °C anaer.
10z	<i>Serratia liquefaciens</i>	farmářský sýr	GTK	37 °C
11z	<i>Debaryomyces hansenii</i>	farmářský sýr	GKCH	25 °C
12z	<i>Klebsiella oxytoca</i>	farmářský sýr	GTK	37 °C
13z	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	farmářský sýr	GTK	37 °C
14z	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	farmářský sýr	GTK	37 °C anaer.
15z	<i>Staphylococcus hominis</i>	farmářský sýr	GTK	37 °C
1T	<i>Lactobacillus paracasei</i>	tvaroh s růžovými skvrnkami	GTK	37 °C anaer.
3T	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	zkažené pasterované mléko	GTK	30 °C
4T	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	zkažené pasterované mléko	GTK	37 °C
5T	<i>Clostridium tyrobutyricum</i>	zduřelý dohříváný sýr	RCM	37 °C anaer.
1S	<i>Candida kefyr</i>	tvaroh	GKCH	25 °C
3S	<i>Delftia acidovorans</i>	pasterované mléko	GTK	30 °C
10S	<i>Candida lipolytica</i>	termizovaný sýr	GKCH	25 °C
12S	<i>Candida lipolytica</i>	termizovaný sýr	GKCH	25 °C
16S	<i>Bacillus cereus</i>	termizovaný sýr	GTK	30 °C
18S	<i>Sporobolomyces roseus</i>	termizovaný sýr	GKCH	25 °C
z1	<i>Pantoea agglomerans</i>	zeleninová šťáva	GTK	30 °C
z2	<i>Serratia liquefaciens</i>	zeleninová šťáva	GTK	37 °C
z3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	zeleninová šťáva	GTK	30 °C
z5	<i>Pantoea agglomerans</i>	zeleninová šťáva	GTK	30 °C
z8	<i>Lactobacillus sakei</i>	zeleninová šťáva	GTK	37 °C anaer.
z9	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	zeleninová šťáva	GTK	37 °C
z10	<i>Micrococcus luteus</i>	zeleninová šťáva	GTK	30 °C
z12	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	zeleninová šťáva	GTK	37 °C

GTK - živná půda s glukosou, tryptonem a kvasničným extraktem; GKCH - živná půda s glukosou, kvasničným extraktem a chloramfenikolem; RCM - živná půda pro kultivaci klostridií (reinforced clostridial medium)

destilované vody a ponořen byl testovací proužek. Po inkubaci 37 °C/10 - 30 min žluté zbarvení indikuje, že se jedná o Gram-negativní bakterie.

Fermentační vlastnosti mikroorganismů

Fermentační vlastnosti byly testovány těmito metodami:

- růst na GTK-AB agaru (MILCOM), inkubace 30 °C/3 dny (metoda se používá pro stanovení celkového počtu mikroorganismů s rozlišením kyselinotvorných a alkaligenních mikroorganismů),
- fermentace glukosy po inokulaci vpichem do glukosového agaru s bromkresolpurpurem (Sigma-Aldrich), inkubace 24 h při doporučené teplotě pro daný kmen,
- fermentace laktosy na laktosovém agaru s čínskou modří (Merck), inkubace 24 h při doporučené teplotě pro daný kmen,

- rozlišení oxidačního a fermentativního metabolismu glukosy na OF médiu (BioMerieux) - vpichem byly inokulovány dvě ampule s OF médiem pro každý kmen, přičemž po jedné ampuli bylo přelito vrstvou 1 cm minerálního oleje, inkubace 36 °C/24 - 48 h (vyhodnocení viz tab. II),
- detekce β-galaktosidasy pomocí ONPG disků, tj. disků s 2-nitrophenyl β-D-galactopyranosidem (Sigma-Aldrich) - disk byl ponořen do 0,1 ml fyziologického roztoku a suspendována byla kolonie testovaných mikroorganismů. Test byl hodnocen po 1, 6 a 24 h inkubace při 35 °C,
- fermentace vybraných sacharidů (arabiosa, cellobiosa, fruktosa, rhamnosa, inositol, laktosa, melibiosa, sacharosa, salicin) s využitím sacharidových disků (Sigma-Aldrich) - mikroorganismy byly inokulovány roztěrem na povrch agaru s fenolovou červení (Sigma-Aldrich) a poté byly položeny sacharidové disky, inkubace 36 °C/18 - 48 h.

Tab. II Vyhodnocení testu na OF médiu dle návodu výrobce (BioMerieux)

Aerobní inkubace	Inkubace pod minerálním olejem	Metabolismus glukosy
+	-	oxidační
+	+	fermentativní
-	-	inertní
-	+	došlo k chybě

Další biochemické vlastnosti

Provedeny byly dále tyto testy:

- detekce katalasy - misky s nakultivovanými mikroorganismy byly přelity 3% roztokem H₂O₂, pozitivní reakce se projeví uvolněním bublinek plynu,
- detekce oxidasy pomocí Bactident Oxidasa testu (Merck) - kolonie byly nanášeny na testovací proužek a po 20 - 60 s byl test vyhodnocen.

Výsledky a diskuze

V tab. III jsou porovnány různé metody pro rozlišení Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií. Do testování byly zařazeny i některé kvasinky, protože mohou prorůstat při stanovení bakterií, a naopak některé bakterie mohou prorůstat při stanovení kvasinek. Výhodou provedení klasického Gramova barvení je snadné rozlišení bakterií a kvasinek na základě posouzení velikosti a tvaru buněk, popř. i tvorby spor. Nicméně provedení této metody vyžaduje mikroskop a dobré zaškolení personálu. Rozlišení bakterií mikroskopicky může být navíc komplikováno Gram-labilitou některých druhů a dalšími úskalími. V tab. III je např. patrné opakování chyby při zařazení bakterií z řádu *Pseudomonadales* (rody *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Comamonas* a další). Jak uvádí Sedláček (2007), acinetobaktery jsou Gram-negativní bakterie, které však mohou být rezistentní k odbarvení. Kvasinky se jeví jako Gram-pozitivní sytě zbarvené buňky.

Nejspolehlivěji bylo možné testovanými metodami zařadit bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*, bacily a laktobacily, zatímco kvasinky bylo možné odlišit jen mikroskopicky. V KOH testu ani v testu na L-alanin aminopeptidasu kvasinky neposkytovaly systematicky pozitivní ani systematicky negativní odezvu. U KOH testu působily problémy obdobné kmeny bakterií jako v případě Gramova barvení - při vyhodnocení je potřeba považovat i slabě "táhnuté se" suspenze buněk jako odezvu Gram-negativních bakterií. Naproti tomu test na aminopeptidasu nejčastěji selhával u Gram-pozitivních koků (stafylokoky, kocurie, laktokoky, aj.), zatímco výrobce v návodu uvádí *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides fragilis*, *Campylobacter* sp. a *Veillonella parvula*.

Gramovo barvení, KOH test a test na L-alanin aminopeptidasu porovnával i Moaledj (1986), a to na kmenech sladkovodních bakterií, mezi kterými byly rovněž zastoupeny kmeny poskytující jednotlivými metodami protichůdné výsledky. Pro identifikaci bakterií proto doporučuje kombinaci uvedených metod.

Tab. III Porovnání metod pro rozlišení Gram-negativních bakterií, Gram-pozitivních bakterií a kvasinek

Kmen	identifikace	dle identifikace	mikroskopicky	KOH test	test na aminopeptidasu
O2	<i>S. epidermidis</i>	G+	G+ koky	G+	G-
O3	<i>Chryseobacterium</i> sp.	G-	G- tyčinky	G-	G-
O4	<i>Kocuria rhizophila</i>	G+	G+ koky	G+	G-
O5	<i>Acinetobacter</i> sp.	G-	G+ koky	G-	G-
O8	<i>Pseudomonas</i> sp.	G-	G+ tyčinky	G-	G-
O11	<i>Serratia liquefaciens</i>	G-	G+ tyčinky	G-	G-
O13	<i>Enterobacter</i> sp.	G-	G- tyčinky	G-	G-
O15	<i>Lcc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	G+	G+ koky	G+	G-
O16	<i>Acinetobacter</i> sp.	G-	G+, G- koky	G+	G-
O17	<i>Shewanella</i> sp.	G-	G- tyčinky	G+	G-
O18	<i>Comamonas testosteroni</i>	G-	G+ tyčinky	G+	G-
M03	<i>Acinetobacter baumannii</i>	G-	G+ tyčinky	G+	G+, G-
KM1	<i>Candida</i> sp.	kvasinky	kvasinky	G-	G+
ZM1	<i>Candida parapsilosis</i>	kvasinky	kvasinky	G-	G+
A1	<i>B. licheniformis</i>	G+	G+ tyčinky	G+	G+
A7	<i>B. licheniformis</i>	G+	G+ tyčinky	G+	G+
A10	<i>Candida guilliermondii</i>	kvasinky	kvasinky	G+	G-
N14	<i>Debaryomyces hansenii</i>	kvasinky	kvasinky	G+	G+
N26	<i>Serratia marcescens</i>	G-	G- tyčinky	G-	G-
4z	<i>Kocuria kristiana</i>	G+	G+ koky	G+	G+, G-
7z	<i>Lb. rhamnosus</i>	G+	G+, G- tyčinky	G+	G+
9z	<i>Lb. curvatus</i>	G+	G+ tyčinky	G+	G+
10z	<i>Serratia liquefaciens</i>	G-	G- tyčinky	G-	G-
11z	<i>Debaryomyces hansenii</i>	kvasinky	kvasinky	G+	G+
12z	<i>Klebsiella oxytoca</i>	G-	G- tyčinky	G-	G-
13z	<i>S. saprophyticus</i>	G+	G+ koky	G+	G-
14z	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	G+	G+ tyčinky	G+	G+
15z	<i>S. hominis</i>	G+	G+, G- koky	G+	G-
1T	<i>Lb. paracasei</i>	G+	G+ tyčinky	G+	G+
4T	<i>S. epidermidis</i>	G+	G+ koky	G+	G+
10S	<i>Candida lipolytica</i>	kvasinky	kvasinky	G+	G-
16S	<i>B. cereus</i>	G+	G+ tyčinky	G+	G+

V tab. IV jsou shrnuty výsledky testů vybraných kmenů v souvislosti s metabolismem sacharidů. Na GTK-AB agaru převažovalo zastoupení alkaligenních mikroorganismů nad kyselinotvornými. Na této půdě je testována změna pH jako důsledek celého souboru biochemických reakcí. Proto i některé kmeny fermentující široké spektrum sacharidů vyšly jako alkaligenní a naopak.

Pro testování metabolismu glukosy slouží OF médium a glukosový agar. Na OF médiu vyšly všechny otestované bakterie jako fermentativní a 95 % z nich bylo pozitivních na fermentaci glukosy na glukosovém agaru. Výsledky naznačují, že jsou obě metody hodně citlivé, popř. mohou poskytovat falešně pozitivní výsledky. Do testovaného souboru byly totiž zařazeny i aerobní bakterie s čistě respiratorním metabolismem jako jsou např. pseudomonády (Sedláček, 2007).

Naproti tomu mezi kvasinkami bylo 89 % pozitivních na OF médiu a 78 % negativních na glukosovém agaru. Jak

Tab. IV Fermentační vlastnosti vybraných kmenů

kmen	identifikace	GTK-AB	OF médium	disky pro β -galaktosidasu	glukosový agar	laktosový agar	arabinsosa disky	celobiososa disky	fruktosa disky	inositol disky	rhamnosa disky	laktosa disky	melibiososa disky	sacharosa disky	salicin disky
O2	<i>S. epidermidis</i>	A	F	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
O3	<i>Chryseobacterium</i> sp.	A	F	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
O4	<i>Kocuria rhizophila</i>	A	F	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
O5	<i>Acinetobacter</i> sp.	A	F	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-
O8	<i>Pseudomonas</i> sp.	A	F	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O11	<i>Serratia liquefaciens</i>	A	F	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
O15	<i>Lcc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	A	F	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O16	<i>Acinetobacter</i> sp.	A	F	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O17	<i>Shewanella</i> sp.	A	F	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
O18	<i>Comamonas testosteroni</i>	A	F	ND	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+
O19	<i>Kocuria varians</i>	A	F	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
M03	<i>Acinetobacter baumannii</i>	A	F	+	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KM1	<i>Candida</i> sp.	A	F	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ZM1	<i>Candida parapsilosis</i>	A	F	+/-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
A1	<i>B. licheniformis</i>	A	F	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
A7	<i>B. licheniformis</i>	A	F	+	+	ND	+	+	+	-	-	-	-	+	-
A12	<i>B. licheniformis</i>	A	F	+	+/-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
N6	<i>Debaryomyces hansenii</i>	K	F	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
N9	<i>S. epidermidis</i>	A	F	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
N11	<i>S. epidermidis</i>	A	F	+	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N12	<i>S. equorum</i>	K	F	ND	+/-	ND	-	-	+	-	-	+	-	+	-
N13	<i>S. hominis</i>	ND	F	ND	+	ND	+	-	+	-	-	-	-	+	-
N14	<i>Debaryomyces hansenii</i>	A	I	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
N26	<i>Serratia marcescens</i>	K	F	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
N31	<i>S. hominis</i>	ND	F	ND	-	ND	+	-	+	-	-	+	+	+	-
z1	<i>Pantoea agglomerans</i>	A	ND	ND	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+
z2	<i>Serratia liquefaciens</i>	ND	F	ND	+	ND	-	-	-	+	-	-	+	+	+
z3	<i>Leu. mesenteroides</i>	A	F	ND	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
z5	<i>Pantoea agglomerans</i>	A	ND	ND	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+
z8	<i>Lactobacillus sakei</i>	K	F	ND	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
z9	<i>S. haemolyticus</i>	ND	ND	ND	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-
z10	<i>Micrococcus luteus</i>	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
z12	<i>S. epidermidis</i>	K	ND	ND	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
1z	<i>Debaryomyces hansenii</i>	A	F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4z	<i>Kocuria kristiana</i>	A	F	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
6z	<i>Lcc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	K	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7z	<i>Lb. rhamnosus</i>	K	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8z	<i>S. hominis</i>	A	F	ND	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
9z	<i>Lb. curvatus</i>	K	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10z	<i>Serratia liquefaciens</i>	A	F	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11z	<i>Debaryomyces hansenii</i>	A	F	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12z	<i>Klebsiella oxytoca</i>	A	F	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13z	<i>S. saprophyticus</i>	A	F	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-
14z	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	K	F	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15z	<i>S. hominis</i>	A	F	ND	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1T	<i>Lb. paracasei</i>	K	F	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3T	<i>Lcc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	K	F	ND	ND	ND	-	+	+	-	-	+	-	-	-
4T	<i>S. epidermidis</i>	A	F	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
5T	<i>C. tyrobutyricum</i>	K	F	+	+/-	ND	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3S	<i>Delftia acidovorans</i>	ND	ND	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10S	<i>Candida lipolytica</i>	A	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12S	<i>Candida lipolytica</i>	A	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16S	<i>B. cereus</i>	A	F	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
18S	<i>Sporobolomyces roseus</i>	A	F	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

K - kyselínovorné, A - alkaligenní, O - oxidační, F - fermentativní, I - inertní, ND - nestanovené

ukazují další testy, jednalo se většinou o kvasinky s nevýznamnými fermentačními vlastnostmi. Nicméně kmeny N6 a ZM1 některé další sacharidy fermentovaly, což je v rozporu s Kluverovo fermentačními pravidly a naznačuje, že byly na glukosovém agaru získány falešně negativní výsledky. Táž pravidla vedou k závěru, že OF médium poskytlo falešně pozitivní výsledky. Kluverova pravidla uvedená v práci Demnerové a kol. (2011) zní:

1. Kvasinka, která nezkašuje glukosu, nezkašuje ani jiný cukr.
2. Kvasinka zkašující glukosu, zkašuje i fruktosu a mannosu.
3. Žádná kvasinka nezkašuje zároveň laktosu a mannosu.

Na laktosovém agaru vyšlo jako pozitivních 36 % kmenů bakterií a žádná kvasinka. Mezi laktosu-fermentujícími bakteriemi byly některé kmeny acinetobakterů, některé kmeny stafylokoků, klebsiela, laktobacily a laktokoky s výjimkou kmene *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* O15. Tento kmen laktokoků však pocházel ze syrového mléka a mohl být adaptovaný na jiné prostředí než mléko a laktosu fermentovat pomaleji, popř. se mohlo jednat o chybně identifikovaný kmen. Rovněž seracie bývají pozitivní na laktosu, avšak fermentace probíhá pomalu (Sedláček, 2007), a proto byl výsledek na laktosovém agaru negativní.

Výsledky získané na laktosovém agaru a s pomocí laktosového disku se v 82 % případů shodují. Rozdílné výsledky byly získány pravděpodobně tehdy, jestliže měl

daný kmen slabou schopnost fermentovat laktosu. Fermentační vlastnosti se výrazněji projeví při inkubaci se sacharidovými disky při 36 °C než při nižších teplotách, při kterých byly inkubovány glukosový či laktosový agar.

Laktosa může být štěpena β -galaktosidasou (detekována na ONPG discích) nebo fosfo- β -galaktosidasou, a proto by na ONPG discích měl být podle očekávání pozitivní stejný nebo nižší počet kmenů, než na laktosovém agaru a laktosových discích. Avšak pozitivní reakce byla zjištěna u 88 % kmenů. Metoda tedy poskytuje buď falešně pozitivní reakci, nebo odráží vysokou adaptabilitu izolovaných kmenů, které v nepřítomnosti dalších živin při testu na ONPG discích využívají laktosu, zatímco na laktosovém agaru či agaru s fenolovou červení a laktosovými disky jiné živiny.

Pokud jde o další sacharidy, na discích vyšlo 34 % kmenů pozitivních na arabinosu, 33 % kmenů na celobiosu, 58 % kmenů na fruktosu, 29 % kmenů na inositol, 20 % kmenů na rhamnosu, 27 % kmenů na mellibiosu, 69 % kmenů na sacharosu a 34 % kmenů na salicin. Nejvíce pozitivních reakcí (na osmi až devíti discích) vykazovaly všechny testované kmeny laktobacilů, laktokoky s výjimkou kmene O15, některé kmeny stafylokoků, *Klebsiella oxytoca* a *Clostridium tyrobutyricum*. Naopak nejvíce negativních reakcí (na osmi až devíti discích) bylo zjištěno u některých Gram-pozitivních koků (mikrokoky, stafylokoky, kocurie), některých kmenů acinetobakterů, pseudomonád, delftií, seracií, bacilů a u většiny kmenů kvasinek.

Tab. V Detekce oxidasy a katalasy u vybraných kmenů

kmen	identifikace	oxidasa	katalasa	kmen	identifikace	oxidasa	katalasa
O2	<i>S. epidermidis</i>	+	+	1z	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	+
O3	<i>Chryseobacterium</i> sp.	+	+	4z	<i>Kocuria kristianae</i>	-	+
O4	<i>Kocuria rhizophila</i>	-	+	6z	<i>Lcc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	-	-
O5	<i>Acinetobacter</i> sp.	+/-	+	7z	<i>Lb. rhamnosus</i>	-	-
O8	<i>Pseudomonas</i> sp.	+	+	8z	<i>S. hominis</i>	-	+/-
O11	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	+	9z	<i>Lb. curvatus</i>	-	-
O13	<i>Enterobacter</i> sp.	-	+	10z	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	+
O15	<i>Lcc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	-	+	11z	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	+
O16	<i>Acinetobacter</i> sp.	+	+	12z	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	+
O17	<i>Shewanella</i> sp.	+	+	13z	<i>S. saprophyticus</i>	-	+
O18	<i>Comamonas testosteroni</i>	+	+	14z	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	-	-
O19	<i>Kocuria varians</i>	-	+	15z	<i>S. hominis</i>	-	+
MO3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	+	1T	<i>Lb. paracasei</i>	+	-
KM1	<i>Candida</i> sp.	-	-	4T	<i>S. epidermidis</i>	+	+
ZM1	<i>Candida parapsilosis</i>	-	+	5T	<i>C. tyrobutyricum</i>	-	+/-
A1	<i>B. licheniformis</i>	+	+	1S	<i>Candida kefir</i>	-	+
A7	<i>B. licheniformis</i>	+	+	10S	<i>Candida lipolytica</i>	-	+
A10	<i>Candida guilliermondii</i>	-	+	12S	<i>Candida lipolytica</i>	-	+
A11	<i>Candida lusitanae</i>	-	-	16S	<i>B. cereus</i>	+	+
A12	<i>B. licheniformis</i>	+	+	18S	<i>Sporobolomyces roseus</i>	-	+/-
N6	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	+	z1	<i>Pantoea agglomerans</i>	-	+
N9	<i>S. epidermidis</i>	-	+	z2	<i>Serratia liquefaciens</i>	-	+
N11	<i>S. epidermidis</i>	+	+	z5	<i>Pantoea agglomerans</i>	-	+
N12	<i>S. equorum</i>	-	+	z9	<i>S. haemolyticus</i>	-	+
N13	<i>S. hominis</i>	-	+	z12	<i>S. epidermidis</i>	-	+
N14	<i>Debaryomyces hansenii</i>	-	+	N31	<i>S. hominis</i>	-	+
N26	<i>Serratia marcescens</i>	-	+	-	-	-	-

Dalšími často využívanými testy jsou detekce oxidasy a katalasy. Oxidasa byla přítomna u 26 % kmenů, katalasa u 87 % kmenů (tab. V). Mezi oxidasa-pozitivními kmeny převažovaly obligátně aerobní mikroorganismy (pseudomonády, acinetobakterie, chryseobakterie, komamonády, bacily), neboť oxidasa je součástí dýchacího řetězce (Ferguson-Miller a kol., 2012). Katalasa-negativní byly zejména laktobacily a laktokoky (opět s výjimkou kmene O15) a některé kvasinky. Katalasa se vyskytuje u většiny živých organismů vystavených aerobnímu prostředí. Katalyzuje disproportcionaci peroxidu vodíku na kyslík a vodu a podílí se tak na ochraně před oxidačním stresem (Chelikani a kol., 2004).

Závěr

Gramovo barvení mikroskopického preparátu má nezastupitelnou roli při rozlišení Gram-pozitivních a Gram-negativních bakterií a kvasinek a při posuzování morfologie jejich buněk. Pokud není mikroskop k dispozici, lze pro bakterie doporučit kombinaci KOH testu a detekce L-alanin aminopeptidasy (ve sporných případech pak identifikace dalšími metodami).

Při prvotním rozřídění izolovaných kmenů může být rovněž nápomocná detekce oxidasy a katalasy.

Ke studiu fermentačních vlastností se nejlépe osvědčily sacharidové disky, popř. glukosový či laktosový agar. Výsledky těchto metod jsou ovlivněny teplotou a dobou inkubace - doporučit lze teplotu 36 °C a vyhodnocení v pravidelných intervalech během 48 h. OF médium pro rozlišení oxidačního a fermentativního metabolismu glukosy ani ONPG disky pro detekci β -galaktosidasy se v této práci neosvědčily.

Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou NAZV při řešení projektu QJ1210300 v programu VAK a s využitím institucionální podpory na základě rozhodnutí RO0513.

Literatura

- Demnerová, K., Pazlarová, J., Ruml, T., Macková, M., Savická, D., Šilhánková, L.: Laboratorní cvičení z mikrobiologie, str. 172, VŠCHT v Praze, 3. vydání, 2001, ISBN 80-7080-415-7.
- Demnerová, K.: Mikrobiologická bezpečnost potravin: současné strategie pro efektivní kontrolu. *Chemické listy* 106 (2012): 920 - 925.
- Jebavá, I., Purkrťová, S., Hanušová, J., Savická, D., Šviráková, E., Němečková, I., Demnerová, K.: Identifikace mikrobiálních původců vad mléčárských výrobků moderními molekulárně-biologickými metodami. *Mlékařské listy - Zpravodaj* 138 (2013): X - XIV.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C.: Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular & Molecular Life Sci.* 61 (2004): 192 - 208.
- Ferguson-Miller, S., Hiser, C., Liu, J.: Gating and regulation of the cytochrome C oxidase proton pump. *Biochem. Biophys. Acta* 1817 (2012): 489 - 494.
- Moaledj, K.: Comparison of Gram-staining and alternate methods, KOH test and aminopeptidase activity in aquatic bacteria: their application to numerical taxonomy. *J. Microbiol. Methods* 5 (1986): 303 - 310.
- Sedláček, I.: Taxonomie prokaryot. Masarykova univerzita, Brno, 2007, ISBN 80-210-4207-9.

Přijato do tisku 20. 10. 2013

Lektorováno 13. 11. 2013

TVORBA ACE INHIBITORŮ RŮZNÝMI KMENY BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ

Markéta Lízalová, Ladislav Bár, Vladimír Dráb

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Production of ACE inhibitors by selected lactic acid bacteria strains

Abstrakt

Cílem této studie bylo nalézt bakteriální kultury produkující ACE inhibitory, které mohou potenciálně snižovat krevní tlak. Pro stanovení byly použity různé izoláty a sbírkové kmeny ze Sbírkvy mlékárenských mikroorganismů Laktoflora®. Získané výsledky ukazují, že tvorba ACE inhibitorů je kmenově specifická. Z testovaných kmenů byly nejúčinnější *Lbc. helveticus* CCDM 125 a *Enterococcus faecalis* RL27-VGA-7A2 s mírou inhibice 84,1 ± 18,9 % a 94,9 ± 0,1 %.

Klíčová slova: ACE inhibitory, bioaktivní peptidy, kyselina hippurová, *Lactobacillus*, *Enterococcus*

Abstract

The objective of the study was to find bacterial strains producing ACE inhibitors. Isolates of different origin and strains from Culture Collection of Dairy Microorganisms Laktoflora® were tested. According to obtained results production of ACE inhibitors were strain specific. *Lactobacillus helveticus* CCDM 125 and *Enterococcus faecalis* RL27-VGA-7A2 were the most potent strains with degree of inhibition 84,1 ± 18,9 % a 94,9 ± 0,1 %.

Key words: ACE inhibitors, bioactive peptides, hippuric acid, *Lactobacillus*, *Enterococcus*

Úvod

Vysoký krevní tlak, způsobený výživou, nadváhou, životním stylem nebo genetickou predispozicí, je velmi nebezpečný faktor ovlivňující vznik kardiovaskulárních onemocnění (Pihlanto a kol., 2010). V posledních letech je zkoumáno možné snížení krevního tlaku pomocí inhibitorů ACE (angiotensin-I-converting enzyme). ACE enzym je peptidyl-dipeptidasa A (EC 3.4.15.1). Bakterie mléčného kvašení produkují ACE inhibitory při fermentaci mléčných bílkovin (Gonzalez-Gonzalez a kol., 2011). Při hydrolyze kaseinu a dalších mléčných bílkovin bakteriemi vznikají peptidy, které mohou být zdrojem dusíku pro jejich růst (Pihlanto a kol., 2010). Při tomto procesu jsou produkovány také bioaktivní peptidy, které se skládají z 2 až 50 aminokyselin (Hernández-Ledesma a kol., 2011). Z kaseinu jsou např. oštěpovány tripeptidy IPP (Ile-Pro-Pro) a VPP (Val-Pro-Pro), které inhibují ACE (Gonzalez-Gonzalez