

## SCREENING FOR ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NEW ISOLATED LACTOBACILLI FROM YOGURT AND CHEESES

**Tropcheva, R. and Danova, S.**

*The Stephan Angeloff Institute of Microbiology, Bulgarian Acad. Sci., 26, Acad. G. Bontchev str. 1113 Sofia, Bulgaria, E-mail: std@microbio.bas.bg*

### ABSTRACT

The present study is a part of a research project (DOO2-187, funded by NSF) on characterization of Bulgarian LAB strains, possessing potential of bio-protecting agents of food products. *In vitro* antimicrobial activity of LAB, cultivated in MRS broth and milk (simulating conditions of a real fermentation product) was estimated. Six promising strains with a broad spectrum of activity against food associated pathogens (*Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes*) were selected. They will be included in the laboratory collection of LAB with different probiotic characteristics and will be estimated their further applicability for functional foods elaboration.

**Key words:** *antibacterial activity, lactobacilli, yogurt, cheese*

### УВОД

Изборът на млечно кисели бактерии, които да бъдат използвани като хранителни добавки или биотерапевтични агенти е сложен и многоетапен процес (Elmer *et al.*, 1996). Полезните им свойства се разглеждат като щамово-специфични и резултати получени с един щам не е задължително да са характерни за други щамове, дори и близкородствени и изолирани от същата екологична ниша. Подборът на пробиотици включва оценка на редица технологични и медико-научни характеристики. Сред тях антимикуробната активност е един от основните *in vitro* критерии. Млечно киселите бактерии (МКБ), в това число и лактобацилите, представляват богат източник на антибактериални субстанции (органични киселини, бактериоцини, водороден пероксид, въглероден диоксид, биосърфактанти), които действат инхибиращо върху растежа на различни патогени. Най-характерен метаболитен продукт е млечната киселина, чието бързо натрупване води до рязко понижаване нивото на рН, а оттам и до потискане на различни патогенни (*Salmonella*, *Listeria*) и токсиногенни бактерии (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*). При хетероферментативните МКБ, едновременно с млечната киселина се синтезират и равни количества оцетна киселина. Поради по-високата си дисоциационна константа тя има и по-силно изразено инхибиращо действие (Holzapfel *et al.*, 1995). МКБ могат да редуцират молекулния кислород до водороден пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и поради липсата на каталазна активност, концентрацията му се повишава силно и той проявява окислителното си антибактериално действие към различни микроорганизми (Juarez Tomas *et al.*, 2003). От друга страна, когато H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> се натрупа в млечни продукти, той активира съдържащия се в млякото ензим лактатпероксидаза. Резултатът се изразява в силното потискане на различни Грам (-) бактерии - *E. coli*, *Salmonella* (Lindgren, 1990; Holzapfel *et al.*, 1995). Въглеродният диоксид (CO<sub>2</sub>) по отношение на различни аероби е силно токсичен, тъй като създава неблагоприятна за развитието им среда, докато за други микроорганизми може да има стимулиращ ефект. Предпазващата роля на CO<sub>2</sub> от нежелана микрофлора е изключително важна и може да се използва в хранителните ферментации. Бактериоцините са друга важна група антимикуробни агенти. Изучените до момента бактериоцини показват голямо разнообразие както в своя спектър на действие, така и по отношение на биохимичната си структура и начин на секреция (Klaenhammer, T.R. 1988).

Комплексният инхибиторен ефект на метаболити продуцирани от МКБ е обект на интензивни изследвания през последните години. Той е в основата на модерната концепция за минимално третирани и естествено защитени храни, търсени от съвременния консуматор.

Това определи и целта на настоящето изследване: Да се изолират и изследват за антибактериална активност МКБ от традиционни за България ферментационни млечни продукти - кисело мляко и бяло саламурено сирене.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### Микроорганизми и условия за култивиране

Обект на изследване в настоящата работа са МКБ, изолирани от домашно приготвени млечни продукти с помощта на стандартни микробиологични методи. Събрани са проби кисели млека и сирена от различни екологично чисти райони - Стара планина, Рила и Родопи.

### Определяне на антимикробна активност

За определяне спектрите на антагонистичната активност на МКБ бяха подбрани четири тест култури на хранително асоциирани патогенни видове: *Staphylococcus aureus* ATCC 12600, *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, *Escherichia coli* ATCC 11775, *Salmonella choleraesuis* ATCC 13076, култивирани на МПА агар при 37°C. Използван е методът дифузия в агар, с експоненциални тест-култури (~ 10<sup>6</sup> cfu/ml), култивирани при стандартни условия. Тестовите са осъществени с безклетъчни супернатанти (кисели и неутрализирани) и ферментирани млека със съответните шамове. Опитите са проведени в три повторения за всеки шам. Антибактериалната активност се отчита в mm стерилна зона след 24-часово развитие на тест културите.

## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

### Изолиране на МКБ от кисели млека и сирена

За да бъдат изолирани МКБ, които не са производствени шамове и са част от натуралната млечно-кисела микрофлора на ферментирания продукт бяха подбрани само домашно приготвени проби от овче и краве кисело мляко и овче бяло саламурено сирене от екологично чисти райони. Изолирането бе осъществено на MRS (Difco, USA), Rogosa (Difco, USA) and L-S differentiation agar (Scharlau, Spain) съгласно общоприетите микробиологични подходи. В събраните проби бе отчетена добра виталност на МКБ. На този етап от изследването бе подбрана група от шест шамове, условно обозначени като SR13, SR3, SR4, SRM3, SR11 и SR131, които по фенотипни характеристики се определят като лактобацили (Табл. 1).

**Таблица 1. Физиолого-биохимична характеристика на изолатите от млечни продукти**

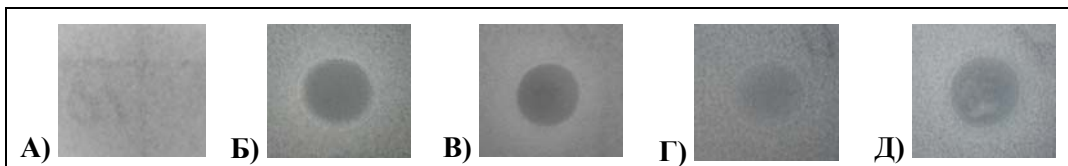
Произход на шамове	Усл. №	Оцветяване по Грам	Тест каталаза	Растеж при различни температури	
				37°C	45°C
Кисело мляко	SR13	Грам (+)	Отрицателен	+	+
	SR3	Грам (+)	Отрицателен	+	+
	SR4	Грам (+)	Отрицателен	+	+
	SRM3	Грам (+)	Отрицателен	+/-	+
Сирене	SR11	Грам (+)	Отрицателен	+	-
	SR131	Грам (+)	Отрицателен	+	-

*Легенда:* + добър растеж; +/- колебания в растежа; - липса на растеж

### Антибактериална активност на лактобацили, изолирани от домашно приготвени млечни продукти

Попадането на патогенни микроорганизми в млечните и други хранителни продукти е потенциален рисков фактор за здравето на човека (WFO, 1999). Нарастващата заболяемост вследствие консумацията на такива продукти е глобален проблем (King *et al.*, 2000; D'Souza *et al.*, 2004) и налага търсенето на нови подходи за предпазване на храните. Затова в тестовите бяха включени референтни тест-култури, представители на най-често докладваните хранително асоциирани патогени: *Escherichia coli* ATCC 11775, *Enterobacter aerogenes*

ATCC13048, *Salmonella choleraesuis* ATCC13076, *Staphylococcus aureus* ATCC12600. Скрининговите тестове с различни тест-култури на патогени е широко прилаган подход за подбор на активни щамове сред голям брой изолати (Morelli, 2000). Приложени бяха два варианта на метода дифузия в агар: (1) директен agar-spot метод и (2) метода на ямките. По този начин е възможно да се получи достоверна информация за наличието на инхибиторен ефект на щама или негов метаболит към тест-културата и да се определи природата на продуцираното активно вещество. Използвани бяха безклетъчни филтрувани супернатанти (БФС) получени след 24 ч. култивиране в среда MRS, (с кисели- *ks* и неутрализирани супернатанти-*ns*) и с ферментирани с културите млека (*м*). Ефектът бе отчетен по зоната на инхибиране (Фиг. 1). В *in vitro* експериментите осъществени по метода на ямките бе отчетена по-висока активност като брой щамове и ефект (Табл. 2).



**Фигура 1. Визуализиране инхибиторния ефект на безклетъчни филтрувани супернатанти (А-Г) и мляко (Д) от лактобацилните култури с помощта на директен agar-spot метод: (А) негативна контрола (тест култура *Escherichia coli* на МПА+ MRS); (Б) *ks* от култура на щам SR131 срещу тест-култура *E. coli*; (В) *ns* от щам RCDM3 срещу *Salmonella choleraesuis*; (Г) *ks* от щам SR4 срещу *Enterobacter aerogenes*; (Д) мляко с щам SR131 срещу *Staphylococcus aureus***

Най-отчетливи са резултатите при *Ent. aerogenes* и *Salmonella enteritidis*. Ефектът на потискане вероятно се дължи на продукцията на органични киселини и/или  $H_2O_2$ . Директното антимикробно действие на органичните киселини (млечна, оцетна, бензоена, пропионова) продуцирани от МКБ е добре известно (Fraga *et al.*, 2005). Най-характерна е млечната киселина, чието бързо натрупване води до рязко понижаване нивото на рН, а оттам и до потискане на различни патогени: *Salmonella*, *Listeria*, *Proteus* (Fraga *et al.*, 2005), Грам (-) видове от семейства *Enterobacteriaceae* и *Pseudomonadaceae* (Dooges *et al.*, 1993), както и токсиногенни бактерии (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*). При хетероферментативните лактобацили се отделят и големи количества оцетна киселина, която има и по-силно изразено инхибиращо действие (Holzapfel *et al.*, 1995). Инхибиращият ефект на млечната и оцетната киселини е провокиран от недисоцираните молекули, които преобладават в среда с ниско рН (Abdellah Bouguettoucha *et al.*, 2007). Последните взаимодействат с основни метаболитни функции, като транспорт на субстрати, окислително фосфорилиране и освобождавайки протони предизвикват промяна на вътреклетъчното рН. Всичко това дестабилизира мембраната, което влияе на пермеабилитета ѝ, същевременно води и до намаляване на активността на редица ензими и може да инициира ефекта на други антимикробни субстанции (Alakomi *et al.*, 2000).

**Таблица 2. Антимикробна активност на лактобацили по метода на ямките**

№	Проби	Активност (зона на инхибиране в mm)			
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Salmonella cholerae</i> <i>Enteritidis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	SR13 <sup>KS</sup>	4**	6**	0	0
2	SR13 <sup>NS</sup>	0	0	0	0
3	SR13 <sup>M</sup>	0	0	0	0
4	SR3 <sup>KS</sup>	+/-	+/-	16*	0
5	SR3 <sup>NS</sup>	0	5**	0	0
6	SR3 <sup>M</sup>	0	0	0	0
7	SR4 <sup>KS</sup>	6	9**	9**	0
8	SR4 <sup>NS</sup>	0	6**	0	0
9	SR4 <sup>M</sup>	0	0	0	0
10	SRM3 <sup>KS</sup>	0	15*	12*	12*
11	SRM3 <sup>NS</sup>	0	23*	17*	23*
12	SRM3 <sup>M</sup>	0	7**	0	0
13	SR11 <sup>KS</sup>	+/-	7**	5**	0
14	SR11 <sup>NS</sup>	0	0	0	0
15	SR11 <sup>M</sup>	0	0	0	0
16	SR131 <sup>KS</sup>	10*	0	0	0
17	SR131 <sup>NS</sup>	0	0	18**	0
18	SR131 <sup>M</sup>	13*	0	11*	13*

**Легенда:** <sup>s</sup> – безклетъчни филтрувани супернатанти (БФС) от 24ч. култури в MRS (кисели <sup>KS</sup> и неутрализиранни <sup>NS</sup>); <sup>M</sup> – тестове с обезмаслено мляко (10% w/v), инокулирано със съответната култура за 24 ч.; +/- – гранична активност - много слабо повлияване на тест микроорганизма; \* – зона на инхибиране без видим растеж на тест културата; \*\* – зона на инхибиране с по-слаб растеж на тест културата.

Най-чувствителен към действието на неутрализиранни супернатанти бе *Ent. aerogenes* (Табл. 2). Установената активност с неутрализиранни супернатанти предполага продукция на антимикробен метаболит различен от органичните киселини. В последните години са доказани различни продуценти на бактериоцини и бактериоцин-подобни белтъчни вещества при представители на нестартерната микрофлора на ферментационни млечни продукти. Търсенията се разширяват и напоследък са насочени към нови активни субстанции, каквито могат да бъдат биологичните пептиди на млякото, отделени вследствие естествената метаболитна активност на подбрани щамове МКБ. При тестовете с кисели млека единствено щам SR131 дава положителен резултат (Табл. 2, Фиг. 1Д).

Като най-преспективни се определят щамовете SRM3, SR4 и SR131, които притежават широк спектър на активност (Табл. 2). Предстоят допълнителни изследвания, които да характеризират природата на продуцираните активни субстанции и видовата принадлежност на подбраните лактобацилни щамове.

През последните години интензивно се изучава продукцията на антимикробни вещества от различни представители на млечно-киселата микрофлора (Amant *et al.*, 2002; Tannock, 2003). Открити са *Lactobacillus* sp. с широк спектър на антагонистична активност по отношение на различни ентеропатогени (*Salmonella*, *Shigella* и *E. coli*) и други не-близко родствени микроорганизми (Drago *et al.*, 1997; Elegado *et al.*, 2004; Riley, 1998; Casey *et al.*, 2004; Todorov & Dicks, 2005b). Поради факта, че независимо от мащабните изследвания и откритите нови бактериоцини от МКБ, само низинът е единственият допуснат за употреба в хранителната индустрия, усилията на учените продължават.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Abdellah Bouguettoucha, Béatrice Balannec, Saci Nacef a, Abdeltif Amrane. A generalised unstructured model for batch cultures of *Lactobacillus helveticus*. 2007, Elsevier Inc.

2. Alakomi, H.L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K. and Helander, I.M. (2000). Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2001-2005.
3. Amant DC St, Valentin-Bon I, Jerse A (2002) Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by *Lactobacillus* species commonly isolated from the female genital tract. *Infect Immun*. 70, 7169–7171.
4. Casey P.G., G.D. Casey, G.E. Gardiner, M. Tangney, C. Stanton, R.P. Ross, C. Hill and G.F. Fitzgerald (2004). Isolation and characterization of anti-Salmonella lactic acid bacteria from the porcine gastrointestinal tract. *Applied Microbiology*, 39:431 – 438.
5. D'Souza, R.M., N.G. Becker, G. Hall and K.B.A. Moodie, 2004. Does ambient temperature affect foodborne disease? *Epidemiology*, 15 (1): 86-92.
6. Doores, S. 1993. Organic acids, p. 95-136. In P. M. Davidson, and A. L. Branen (ed.), *Antimicrobials in foods*. Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.
7. Drago L, Gismondo MR, Lombardi A et al. (1997) Inhibition of in vitro growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. *FEMS Microbiology Letters* 153, 455-463.
8. Elegado FB, Guerra MA, Macayan RA et al. (2004) Spectrum of bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprinting by RAPD-PCR. *International Journal of Food Microbiology* 95, 11-18.
9. Elmer GW, Surawicz CM, McFarland LV (1996) Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA*. 275, 870-876.
10. Fraga, M., Scavone, P. and Zunino, P. (2005). Preventive and therapeutic administration of an indigenous *Lactobacillus* sp. strain against *Proteus mirabilis* ascending urinary tract infection in mouse model. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 88: 25-34.
11. Georgieva R., Choiset Y., Dalgalarondo M., Ivanova I., Danova S., Chobert J-M., Haertle T. "Characterization and purification of a new S-Layer protein from a probiotic *Lactobacillus salivarius* strain", Sofia school of protein science 17-19 September 2008, Sofia.
12. Holzapfel, W. H., R. Geisen, and U. Schillinger, Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes., 1995, *Int. J. Food Microbiol.* 24:343–358.
13. Juárez Tomás M S; Zonenschain D; Morelli L; Nader-Macías M E, Characterisation of potentially probiotic vaginal lactobacilli isolated from Argentinean women, 2003
14. King, J.C., R.E. Black, M.P. Doyle, K.L. Fritsche, B.H. Halbrook, O.A. Levander, S.N. Meydani, W.A. Walker and C.E. Woteki, 2000. Foodborne illnesses and nutritional status: A statement from an American Society for Nutritional Sciences working group. *J. Nutr.*, 130 (10): 2613-2617.
15. Klaenhammer, T.R. 1988. "Bacteriocins of lactic acid bacteria". *Biochimie*. 70:337-349.
16. Lindgren SE, Dobrogosz WJ (1990) Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol Rev.* 7, 149-163.
17. Morelli, L. (2000). In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 1:59-67.
18. Riley MA (1998) Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annual Review of Genetics* 32, 255-278.
19. Tannock GW (2003) Probiotics: time for a dose of realism. *Curr Issues Intest Microbiol*, 4, 33-42.
20. Todorov SD, Dicks LM (2005b) *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 318-326.
21. WHO (World Health Organization), 1999. Removing obstacles to healthy development – World Health Organization report on Infectious diseases. WHO, Geneva, Switzerland.