

Vplyv glycerolu, glukózy a NaCl na rast *Brevibacterium linens*

LUBOMÍR VALÍK - JAROSLAV ZEMANOVIČ - FRIDRICH GÖRNER

Súhrn. V práci sa zistil významný vplyv látky upravujúcej a_v -hodnotu kultivačného média na rast a rozmnožovanie halotolerantného mikroorganizmu *Brevibacterium linens*. Osmoúčinné látky glycerol a glukóza vyvolali u tohoto mikroorganizmu najprv významné predĺženie jeho lag fázy; glycerol na 21 h, glukóza na 15 h, oproti kontrole 3 až 5 h. Potom nasledovala pôsobením obidvoch látok veľmi strmá log fáza, trvajúca 4 až 6 h, pri ktorých boli vypočítané priemerné časy zdvojenia buniek 43 až 57 min. Po ukončení log fázy rozmnožovania nastúpili v obidvoch prípadoch normálne prebiehajúce stacionárne fázy. Osmoúčinná látka NaCl nespôsobila pri podobných a_v -hodnotách médií významné predĺženie lag fázy. Log fáza rastu *B. linens* v médiách pomocou NaCl zníženými a_v -hodnotami mali podobný priebeh ako v kontrolnom pokuse, iba s istým spomalením rastu pokračujúcim až po fázu stacionárnu.

Scott [1] skúmal vplyv v médiu rozpustených látok na rast mikroorganizmov, pričom zistil, že najvýznamnejším limitujúcim faktorom je aktivita vody (a_v) a nie jej absolútny obsah, ako aj prevažne v médiu rozpustená látka. Neskoršie štúdie však poukázali na skutočnosť, že pri rovnakej a_v -hodnote má na rast, resp. inhibíciu mikroorganizmov významný vplyv aj látka samotná. Calhoun a Frazier [2] porovnávali vplyv glukózy a NaCl, pri rovnakej a_v -hodnote na inhibíciu rastu *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* a *Staphylococcus aureus*. Obidve rozpustené osmoúčinné látky mali rovnaký účinok na rast *S. aureus*, ale NaCl mal na *P. fluorescens* výraznejší inhibičný účinok ako glukóza. Marshall a kol. [3] porovnávali inhibičný účinok NaCl a glycerolu

Ing. Lubomír Valík, CSc., Ing. Jaroslav Zemanovič, CSc., Prof. Ing. Dr. Fridrich Görner, DrSc., Katedra mlieka, tukov a hygieny potravín, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

u 16 druhov baktérií. Z nich len tri reagovali rovnako na obidve látky. Pri rovnakých a_v -hladinách bol u halotolerantných baktérií glycerol na inhibíciu rastu účinnejší ako NaCl a menej účinný u ostatných organizmov.

Z týchto údajov sa môže dedukovať, že jedna osmoúčinná látka môže mať pri rovnakej a_v -hodnote odlišný účinok u rôznych mikroorganizmov a na druhej strane, pri určitom mikroorganizme môžu mať rôzne osmoúčinné látky pri rovnakej a_v -hodnote taktiež odlišný účinok.

Z tohto hľadiska, Li a Torres [4] rozdeľujú osmoúčinné látky používané na úpravu a_v -hodnoty médií a potravín do dvoch skupín. Prvá obsahuje látky, ktoré ľahko vnikajú do mikrobiálnej bunky, ale nevyvolávajú v nej osmoregulačnú odozvu. V tejto skupine sa podľa uvedených autorov nachádzajú s bunkou kompatibilné látky: glycerol, sorbitol, glukóza a arabinóza. V druhej skupine sú látky, ktoré nemajú schopnosť preniknúť vo väčšom množstve do bunky; presnejšie povedané, sú to látky, ktorých príjem inhibuje v bunkách ich saturačnú kinetiku, spôsobujú plazmolýzu a indikujú osmoregulačnú odozvu. Táto skupina obsahuje väčšinou soli a cukry, ktoré vo všeobecnosti spôsobujú značné predĺženie lag fázy rastu mikroorganizmov.

Cieľom tejto práce bolo zistiť vplyv NaCl na rast, resp. jeho inhibíciu u halotolerantného organizmu *Brevibacterium linens*, ktorý sa používa pri výrobe syrov zrejúcich pod mazom, v porovnaní s osmoúčinnými látkami prvej skupiny, s glukózou a glycerolom.

Materiál a metódy

V práci použitý kmeň *Brevibacterium linens* LF 200 sme získali zo zbierky mliekárenských kultúr LAKTOFLORA a. s. MILCOM Praha. Po oživení v bujóne obohatenom s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu (1 %) a laktózou (1 %) sa tento kmeň kultivoval v mliečnom médiu štandardného zloženia: 15 g vždy rovnaké sušené odstredené mlieko (MEDMILK, Veľký Meder), 1 g kvasničný autolýzát (IMUNA), 1 g peptón pre bakteriológiu (IMUNA), 150 ml destilovanej vody, (sterilizácia 0,12 MPa 20 min, pH = 7,0 až 7,2), ako aj v médiu s prídavkom primeraného množstva NaCl, glukózy alebo glycerolu, ktoré sa na zníženie aktivity vody média použilo s ohľadom na jeho konštantné zloženie. Ako inokulum sa použilo 1 % 24 h kultúry *B. linens* pomno-

ženej v bujóne s enzymatickým hydrolyzátom kazeínu. Kultivácia prebiehala za neustálej štandardnej aerácie na trepačke s počtom kmitov $120.\text{min}^{-1}$ pri $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Počet buniek a ich zhlukov sa stanovoval v dvojhodinových intervaloch mikroskopicky v 0,01 ml vzorky rozotretej na podložnom sklíčku na ploche 1 cm^2 po vysušení, fixácii plameňom a metanolom a farbení podľa Lewina a Blacka [5]. Izolované bunky sa počítali ako jednotky a v tesných zhlukoch sa celý útvar počítal tiež ako bakteriálna jednotka (BJ) [6]. Zo získaných rastových kriviek sa vypočítal priemerný čas zdvojenia buniek počas exponenciálnej fázy rastu [7]. Pôvodné médium malo hodnotu $a_v = 0,994$. Aktivita vody sa v tomto ako aj v upravených médiách merala kryoskopicky na základe teploty tuhnutia Beckmannovým teplomerom s presnosťou na $0,01^\circ\text{C}$. Na výpočet sa použil vzťah podľa Chena [8]: $2,303 \log a_v = 0,0097 \cdot t_t$, kde t_t je teplota tuhnutia média. Na kontrolu správnosti uvedeného vzťahu vypočítanej a_v -hodnoty sa použili štandardné roztoky NaCl [9].

Výsledky sú aritmetické priemery z troch paralelných kultivačných sérií.

Výsledky

Vplyv inhibície rastu B. linens pri a_v -hodnotách médií upravených glycerolom

V kontrolnom médiu s pôvodnou a_v -hodnotou $a_v = 0,994$ trvala lag fáza rozmnožovania buniek *B. linens* 3 až 4 h. V rovnakom médiu s prídavkom glycerolu zníženou a_v -hodnotou na $a_v = 0,951$ a $0,936$, sa lag fáza významne predĺžila; pri obidvoch a_v -hodnotách rovnako na asi 21 h. Potom nastala výrazná log fáza trvajúca pri obidvoch znížených a_v -hodnotách 5 h. Pri nej sa mikroskopicky stanovený počet buniek a zhlukov zvýšil pri $a_v = 0,951$ o 2,1 log poriadky a pri $a_v = 0,936$ o 1,7 log poriadkov. Príslušné priemerné časy zdvojenia buniek boli 43 min a 53 min. Pri ukončení lag fázy, po 21 hodinách kultivácie, bol počet buniek pri obidvoch a_v -hodnotách $10^{9,2}$ a $10^{8,8}$ BJ/ml.

Vplyv a_v -hodnôt na rast *B. linens* upravených osmoučinnou látkou glycerol sa prejavil aj počas stacionárnej fázy rastu medzi 30. a 48. h. Priemerné počty buniek boli v poradí klesajúcich a_v -hodnôt 10^{10} BJ/ml

(kontrola), $10^{9,4}$ a $10^{9,0}$ BJ/ml.

Vplyv osmoučinnnej látky glycerol možno zhrnúť konštatovaním, že sa prejavila významným predĺžením lag fázy, ktorá bola kompenzovaná s nasledovnou výrazne strmou log fázou (obr.1.).

*Inhibícia rastu B. linens
pri a_v -hodnotách média upravených prídavkom glukózy*

V pôvodnom (kontrolnom) mliečnom médiu ($a_v = 0,994$) trvala lag fáza rozmnožovania buniek *B. linens* asi 5 h. V rovnakých médiách s aktivitou vody upravenou osmoučinnnou látkou glukóza na hodnoty $a_v = 0,980$ a $0,961$, sa lag fáza významne predĺžila. V prvom prípade na asi 15 h a v druhom až na 25 h.

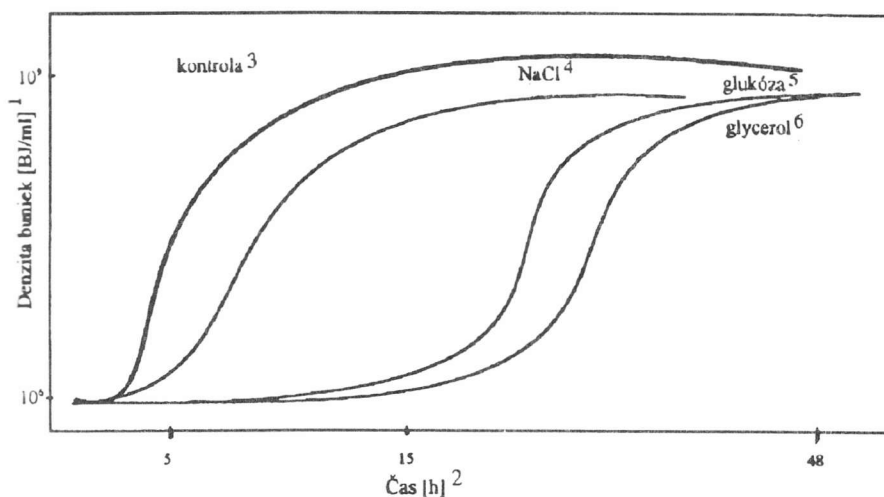
V médiu s prvou zníženou a_v -hodnotou ($a_v = 0,980$) bola po 15 h trvajúcej lag fáze zaznamenaná výrazná log fáza trvajúca asi 6 h. Počas nej sa počet buniek *B. linens* zvýšil o 1,9 log poriadkov na hodnotu $10^{9,1}$ BJ/ml. Priemerný čas zdvojenia buniek počas log fázy bol 57 min. Potom sa rast buniek spomalil a až medzi 40. a 48. h dosiahol fázou stacionárnu pri priemernej koncentrácii buniek 10^{10} BJ/ml. Tento počet bol v rovnakom čase zaznamenaný aj v kontrolnom médiu.

V médiu s najnižšou a_v -hodnotou ($a_v = 0,961$) sa po 25 h trvajúcej lag fázy prejavila nevýrazná log fáza, za ktorou sa po dvoch hodinách bunky už prakticky nerozmnožovali. Ich maximálny počet bol od 26. h po 48. h v priemere pri hodnote $10^{8,0}$ BJ/ml.

Pre osmoučinnnú látku glukóza sa výsledky môžu zhrnúť konštatovaním, že táto spôsobila pri zníženej a_v -hodnote média významné predĺženie lag fázy s nasledovnou výraznou log fázou (obr.1.). a_v -hodnota $0,961$ pôsobila na rast *B. linens* výrazne inhibične.

*Vplyv inhibície rastu B. linens
pri a_v -hodnotách médií upravených s NaCl*

V kontrolnom médiu s pôvodnou a_v -hodnotou $0,994$ bola táto upravená prídavkom NaCl na hodnoty $a_v = 0,983$, $0,971$ a $0,945$. Na rozdiel od predchádzajúcich pokusov s osmoučinnnými látkami glycerol a glukóza, pri NaCl nebolo pri žiadnom znížení a_v -hodnoty zaznamenané významné predĺženie lag fázy rozmnožovania buniek oproti kontrole.



Obr. 1. Vplyv zníženia a_v -hodnôt média ($a_v = 0,98$ až $0,95$) na rast *B. linens* osmoúčinnými látkami glukóza a glycerol (významne predĺžená lag fáza a strmá log fáza) a chloridom sodným (inhibícia rastu kopírujúca rast v kontrolnom médiu).

Fig. 1. Effect of media a_v -values lowering ($a_v = 0,98$ to $0,95$) on *B. linens* growth by self-efficient matters glucose and glycerol (significantly elongated lag phase and sheer log phase) and by natrium chloride (inhibition of growth copying the growth of control medium).

1 - cell density, 2 - time, 3 - control, 4 - NaCl, 5 - glucose, 6 - glycerol.

Pri všetkých a_v -hodnotách netrvala dlhšie než 2 až 4 h.

Dynamika rozmnožovania buniek *B. linens* bola v kontrolnom médiu ($a_v = 0,994$) a v dvoch pokusných ($a_v = 0,983$ a $0,971$) podobná. Iba v médiu s a_v -hodnotou $0,971$ sa zistila oproti kontrole istá inhibícia rastu buniek. Túto inhibíciu je možné charakterizovať priemernou denzitou počtu buniek medzi 40. a 48. h pri $a_v = 0,994$ 10^{10} BJ/ml a pri $a_v = 0,971$ $10^{9,4}$ BJ/ml.

Zaujímavý je pohľad na v pokusoch maximálne zníženú a_v -hodnotu $0,945$. Táto dovolila medzi 2. až 10. hodinou istý rast počtu buniek oproti inokulu ($10^{6,3}$ BJ/ml) o asi $0,78$ log poriadku s nasledovnou skoro úplnou inhibíciou rastu a rozmnožovania buniek.

Vplyv osmoúčinnej látky NaCl na inhibíciu rastu halotolerantného mikroorganizmu *B. linens* sa môže zhrnúť nasledovne. NaCl nespôbil významné predĺženie lag fázy. Inhibícia množenia buniek sa manifestovala až pri a_v -hodnote $0,945$ trvalým pôsobením bez zjavných zmien na rastovej čiare (obr.1.).

Diskusia

Porovnaním rastových kriviek *B. linens* z hľadiska vplyvu použitých osmoúčinných látok sa ukazuje, že medzi pôsobením glycerolu a glukózy na jednej strane a NaCl na druhej strane je významný rozdiel.

Glycerol a glukóza mali podobný účinok. Prídavky týchto látok do rovnakého média v množstve, v ktorom ešte nespôsobili úplnú inhibíciu množenia buniek, spôsobili najprv významné predĺženie ich lag fázy. Pri prídavku glycerolu na 21 h a pri prídavku glukózy na 15 h. Za takto predĺženou lag fázou prebehla u oboch osmoúčinných látok strmá log fáza. Napriek týmto zreteľným zásahom do mechanizmu rozmnožovania buniek sa ich konečné počty v stacionárnej fáze rastu nelíšili významne od kontroly v médiu s pôvodnou a_w -hodnotou.

Na základe týchto skutočností sa môže predpokladať, že bunky *B. linens* sa zvýšenému osmotickému tlaku prostredia najprv nejakým mechanizmom prispôbovali, čo inhibovalo ich rozmnožovanie. Po ukončení procesu prispôbenia alebo vzniku rovnovážneho stavu medzi osmotickým tlakom v médiu a v bunkách, sa mechanizmus ich rozmnožovania opäť obnovil. Oproti kontrole sa dokonca urýchlil.

O povahe mechanizmu prispôbenia sa buniek zvýšenému osmotickému tlaku prostredia sú podľa autorov, nimi použitých osmoúčinných látok, ako aj z hľadiska v experimentoch použitých mikroorganizmov, rôzne názory. Streit a kol. [10] predpokladajú, že prispôbenie sa môže uskutočniť príjmom látok z prostredia (zo živného média) alebo vlastnou syntézou osmoregulačných látok v bunke samotnej. Z hľadiska povahy osmoúčinných látok používaných na úpravu a_w -hodnoty prostredia sa udáva, že glycerol, glutamát, sorbitol a glukóza prenikajú do bunky a samotné v nej zvýšia osmotický tlak, ale nespôsobujú vlastnú osmoregulačnú odozvu [11, 12, 13]. Tieto poznatky sú v súlade s delením osmoúčinných látok, ako sú zhrnuté v úvode tejto práce [4].

Osmoúčinná látka chlorid sodný (NaCl) mala podľa v práci prezentovaných výsledkov na bunky *B. linens* odlišný účinok. Znížené hodnoty aktivity vody s NaCl, ktoré u glycerolu a glukózy významne predlžovali lag fázou množenia buniek, tento účinok pri NaCl nemali. Tento poznatok je v zdanlivom rozpore s vyššie citovaným delením osmoúčinných látok podľa [4]. V konkrétnom prípade sa však pracovalo s halotolerantným organizmom *B. linens*. Je možné, že vedľa samotnej osmoúčinnej látky NaCl, sa na procesoch rozmnožovania buniek *B. linens*, prejavila

aj ich halotolerantnosť [14]. Halotolerantné, ako aj halofilné baktérie sa voči NaCl a ním znížených a_v -hodnôt prostredia správajú odlišne ako iné baktérie. Citlivo reagujú na druh látky, ktorou bola a_v -hodnota média upravená. Rozdiel bol pozorovaný medzi cukrami a NaCl [15]. V našom prípade znižovanie a_v -hodnoty média s NaCl neovplyvnilo rast a množenie buniek významne. Predĺženie lag fázy s NaCl, ako ho uvádzajú Li a Torres [4], sa u iných baktérií neprejavilo. Charaktery rastových kriviek sa zachovali v súlade s kontrolou. Z tejto skutočnosti sa môže predpokladať, že bunky *B. linens* majú ako halotolerantné k sodíkovým a chloridovým iónom značnú reparačnú schopnosť.

Na základe v práci experimentálne zistených skutočností sa môže zovšeobecniť, že na správanie sa mikroorganizmov v médiách so zníženými a_v -hodnotami má vedľa konkrétnej a_v -hladiny významný vplyv aj látka, ktorou bola a_v -hodnota upravená. V aplikácii týchto poznatkov na požívatinu či už z hľadiska inhibície nežiadúcich mikroorganizmov, ktoré skracujú ich trvanlivosť alebo na inhibíciu choroboplodných mikroorganizmov, treba však brať vedľa a_v -hodnoty do úvahy aj teplotu skladovania a pH-hodnotu prostredia.

Literatúra

1. SCOTT, W.J.: Aust. J. Beef Sci., 6, 1953, s. 549.
2. CALHOUN, C. L. - FRAZIER, W. C.: Appl. Microbiol., 14, 1966, s. 416.
3. MARSHALL, B. J. - OHZE, D. F. - CHRISTIAN, J. H. B.: Appl. Microbiol., 21, 1971, s. 363.
4. LI, K. Y. - TORRES, J. A.: J. Food Proc. & Preservation, 17, 1993, s. 305.
5. TEPLÝ, M. a kol.: Čisté mlékařské kultury. SNTL Praha, 1984.
6. GÖRNER, F. - ILAVSKÁ, E. - VOLLEK, V. - JANČEKOVÁ, J.: Mikrobiológia mlieka a tukov. ChTF SVŠT Bratislava, 1983.
7. BETINA, V. a kol.: Mikrobiologické laboratórne metódy. Alfa Bratislava, 1987.
8. CHEN, C. S., Lebensm. - Wiss. - Technol.: 21, 1988, s. 256.
9. CHIRIFE, J. - RESNIK, S. L.: J. Food Sci., 49, 1984, s. 1486.
10. STREIT, K. - RÜEGG, M. - BLANC, B.: Milchwissenschaft, 34, 1979, s. 459.
11. MEASURES, J. C.: Nature, 257, 1975, s. 398.
12. ROLLER, S. D. - ANAGNOSTOPOULOS, G. D., J. Appl. Bacteriol.: 52, 1982, s. 425.
13. SPERBER, W. H.: J. Food Prot. 46, 1983, s. 142.
14. ZEMANOVIČ, J. - VALÍK, L. - GÖRNER, F.: Bulletin PV, 31, 1992, s. 249.
15. TROLLER, J. A. - CHRISTIAN, J. H. B.: Water activity and Food. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1978.

Do redakcie došlo 11.11.1994.

Influence of glycerol, glucose and NaCl on *Brevibacterium linens* growth

Summary

Significant influence of a matter effecting water activity (a_v) of cultivating medium for growth and reproduction of halotolerant microorganism *Brevibacterium linens* has been ascertained in the work.

Self-efficient matters glycerol and glucose developed in this microbe first elongation of his lag phase; glycerol to 21 hours and glucose to 15 hours, in comparison with control it is 3-5 hours. Than in operation of both matters a very sheer log phase followed taking 3-6 hours, where average times of cell doubling 43 to 57 minutes were calculated. After log phase of reproduction in both cases stationary phase with normal course succeeded.

Osmo-effecient matter NaCl didn't cause significant elongation of the lag phase with similar a_v -values of media. Log phase of *Brevibacterium linens* growth in media with a_v -values lowered by NaCl have similar course as control experiment, but some retardation of growth continuing to the stationary phase.