

## **Vliv nisinu na kmeny *Escherichia coli* DMF 7502 a *Pseudomonas fluorescens* DMF 9010 poškozené působením EDTA nebo směsi organických kyselin**

EVA ŠVIRÁKOVÁ - MILADA PLOCKOVÁ - LINDA HORNÍKOVÁ

**SOUHRN.** Tato práce byla zaměřena na studium vlivu chemických stresových faktorů (nisin, EDTA, směs organických kyselin) na růst technologicky rizikových kmenů *Escherichia coli* DMF 7502 a *Pseudomonas fluorescens* DMF 9010. Samostatně působící EDTA (7440 mg.l<sup>-1</sup>) i samostatně působící směs organických kyselin: kyselina mléčná (272 mg.l<sup>-1</sup>), kyselina octová (1030 mg.l<sup>-1</sup>), kyselina propionová (835 mg.l<sup>-1</sup>), vykazovaly intenzivní inhibici obou testovaných kmenů; směs organických kyselin působila mírně silněji. Přídavek nisinu (2,5 mg.l<sup>-1</sup>) snižoval inhibiční účinek EDTA i směsi organických kyselin na oba testované kmeny. Částečná reparace buněk obou testovaných kmenů vystavených působení EDTA a nisinu nebo organických kyselin a nisinu nastala po 2 h inkubace v reparačním roztoku obsahujícím kyselinu pyrohroznovou, Mg<sup>2+</sup> a Mn<sup>2+</sup> ionty. Účinnější reparace nastala u buněk obou kmenů vystavených účinku EDTA a nisinu.

**KLÍČOVÁ SLOVA:** gramnegativní bakterie; nisin; EDTA; organické kyseliny; reparace

Vlivem působení různých fyzikálních, chemických i kombinovaných faktorů, používaných při výrobě potravin, může dojít k subletálnímu poškození buněk mikroorganismů v tomto prostředí se nacházejících. Během subletálního poškození mikroorganismů se buňky přestávají reprodukovat a není možné stanovit jejich počet plotnovou metodou.

Tato práce je zaměřena na technologicky rizikové gramnegativní bakterie reprezentované kmeny *Escherichia coli* a *Pseudomonas fluorescens*, které se v potravinářských výrobcích mohou objevit jako důsledek nedostatečné hygieny a sanitace výroby. Subletální poškození se u bakterií projevuje narušením slabých interakcí některých makromolekul buněk, ve změně propustnosti a v destabilizaci buněčných membrán, v denaturaci různých proteinů či enzymů [1]. U bakterií dochází během poškození ke konformačním změnám lipopolysacharidů vnější buněčné membrány, které jsou pravděpodobně

---

Ing. Eva ŠVIRÁKOVÁ, PhD., doc. Ing. Milada PLOCKOVÁ, CSc., Linda HORNÍKOVÁ, Ústav technologie mléka a tuků, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika.  
Korespondující autor: Ing. Eva ŠVIRÁKOVÁ, PhD., e-mail: Eva.Svirakova@vscht.cz

způsobeny ztrátou dvojmocných kationtů [2]. Z bakterií rezistentních k nepříznivým podmínkám prostředí se tak následně stávají subletálně poškozené bakterie, které jsou citlivé např. k jiným typům poškození [1].

Mezi chemické stresové faktory způsobující subletální poškození bakterií se řadí bakteriociny. Inhibiční spektra bakteriocinů, produkovaných bakteriemi mléčného kvašení, jejichž aplikace jsou v potravinářských technologiích možné, obecně nezahrnují gramnegativní bakterie [1]. Bylo objeveno, že základní účinek bakteriocinu nisinu závisí na typu buněčné stěny bakterií. Stavba vnější membrány gramnegativních bakterií zabraňuje penetraci bakteriocinů k místu jejich působení - tzn. do cytoplazmatické membrány, a proto uděluje buňkám vysoký stupeň rezistence [3]. Nisin sice vykazuje nízký inhibiční účinek vůči většině gramnegativních bakterií, ale přímo intenzivně působí na grampozitivní bakterie [4]. Bylo zjištěno [5,6], že nisin destabilizuje membránové měchýřky gramnegativních bakterií podobně jako cytoplasmatickou membránu grampozitivních bakterií.

Mezi známá chelatační činidla, způsobující chemické subletální poškození bakterií, patří kyselina ethylendiaminotetraoctová (EDTA). Účinek EDTA spočívá ve změně membránové struktury buněk bakterií a ve zvýšení propustnosti membrány, ke kterým dochází v důsledku chelatace hořčinatých a vápenatých iontů obsažených v lipopolysacharidových vrstvách vnějších membrán bakterií [7]. U gramnegativních bakterií, rezistentních vůči antibiotikům nebo bakteriocinům, dochází vlivem EDTA ke zvýšení citlivosti k těmto látkám [8].

Úspěšný růst bakterií je možný jen při odpovídající pH prostředí, t. j. vhodné koncentraci vodíkových iontů [9]. Organické kyseliny vykazují vůči gramnegativním bakteriím vyšší inhibiční účinek než silné anorganické kyseliny. Organické kyseliny mají v nedisociovaném stavu lipofilní vlastnosti, a proto vykazují zvýšenou schopnost procházet buněčnou stěnou ve srovnání s anorganickými kyselinami. Konečným výsledkem jejich působení je okyselení cytoplasmy, likvidace transmembránového gradientu a ztráta aktivního transportu živin přes membránu. Inhibiční účinek kyselin je ovlivněn mnoha faktory jako jsou teplota, redoxní potenciál, ale i množství a charakter mikroorganismů, na které působí [10]. Organické kyseliny jsou inhibičně nejúčinnější v koncentraci nad 1 % a při pH prostředí nižším než 4,0. Neúčinné jsou při pH vyšším než 5,5. Účinek organických kyselin je závislý na hodnotě disociačních konstant jednotlivých kyselin. Z toho důvodu kyselina propionová vykazuje vyšší inhibiční účinek (pK 4,9) než kyselina octová (pK 4,8) nebo kyselina mléčná (pK 3,9) [11]. K intenzivnějšímu inhibičnímu účinku gramnegativních bakterií dochází při použití směsi organických kyselin nebo jejich solí [1].

Ke zvýšení citlivosti různým způsobem subletálně poškozených buněk gramnegativních bakterií je možné obecně využít kombinace např. s nisinem [1], a tím i lépe a kvalitněji konzervovat potraviny.

Subletálně poškozené buňky bakterií jsou schopny obnovit své životní funkce za předpokladu vytvoření vhodných podmínek prostředí, ve kterém se právě nacházejí. Mezi nejdůležitější podmínky patří vhodná teplota, kultivační médium (bohaté hlavně na proteiny, hořečnaté a manganaté ionty) a typ resuscitačního média. Podle rozsahu a hloubky subletálního poškození dochází buď pouze k reparaci poškozených buněk nebo k reparaci buněk a zároveň k jejich resuscitaci. Proces reparace zahrnuje začlenění a reorganizaci poškozených makromolekul (např. DNA, proteinů, peptidoglykanů buněčné stěny) buněk bakterií včetně obnovení původní konformace sloučenin. Resuscitace znamená přestavbu poškozených částí či makromolekul buňky, která vede k normální stavbě a funkci mikroorganismu [12].

Prezentovaná práce byla zaměřena na studium vlivu vybraných chemických stresových faktorů (nisinu, EDTA, směsi organických kyselin) na technologicky rizikové gramnegativní bakteriální kmeny *Escherichia coli* DMF 7502 a *Pseudomonas fluorescens* DMF 9010, u kterých nedošlo vlivem chemických stresů k letální inhibici, ale pouze k subletálnímu poškození. Skutečnost, že buňky bakteriálních kmenů byly působením zvolených koncentrací EDTA a organických kyselin poškozeny subletálně, a ne letálně, byla prokázána v minulosti s využitím plotnové metody využívající kultivace poškozených i nepoškozených buněk bakterií na selektivních a neselektivních médiích [13].

## **Materiál a metody**

### *Bakteriální kmeny*

K experimentům byly použity gramnegativní bakteriální kmeny *Escherichia coli* DMF 7502 (Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, Česká republika) a *Pseudomonas fluorescens* DMF 9010 (Sbírka kultur mlékařských mikroorganismů Laktoflora, Milcom a. s., Praha, Česká republika). Oba kmeny byly jednorázově kultivovány (1 % obj. inokulum) v živném bujónu (Oxoid, Basingstoke, Velká Británie) při teplotě 30 °C po dobu 16 h. Pro stanovení růstové aktivity obou kmenů byla použita metoda stanovení počtu bakterií [JTK.ml<sup>-1</sup>] jednorázově kultivovaných na živném agaru při teplotě 30 °C po dobu 72 h za aerobních podmínek [14].

#### *Stanovení účinku nisinu na nepoškozené bakteriální kmeny*

Pro stanovení účinku nisinu (Nisaplin®, Danisco, Brabrand, Dánsko) na růst nepoškozených bakteriálních kmenů *E. coli* a *P. fluorescens* byly použity kmeny zaočkované (1% obj. inokulum) do živného bujónu s nisinem (0; 0,0025; 0,025; 0,25; 2,5 mg.l<sup>-1</sup>). Po jednorázových kultivacích kmenů při teplotě 30 °C po dobu 16 h byly změřeny absorbance obou kultur (A<sub>615</sub>) a ze získaných hodnot absorbancí (A<sub>615</sub>) bylo následně vypočteno procento růstu buněk (viz. rovnice 1) obou bakteriálních kmenů.

$$\text{Růst buněk [\%]} = A_{615}(x) / A_{615}(0) \times 100 \quad (\text{rovnice 1})$$

kde A<sub>615</sub>(x) je absorbance bakteriální kultury kultivované v živném bujónu s nisinem (0; 0,0025; 0,025; 0,25; 2,5 mg.l<sup>-1</sup>) za daných podmínek kultivace (absorbance byla měřena oproti sterilnímu živnému bujónu s nisinem (0; 0,0025; 0,025; 0,25; 2,5 mg.l<sup>-1</sup>)) a A<sub>615</sub>(0) je absorbance bakteriální kultury kultivované v živném bujónu za daných podmínek kultivace (absorbance byla měřena oproti sterilnímu živnému bujónu).

#### *Subletální poškození bakteriálních kmenů pomocí EDTA*

Bakteriální kmeny *E. coli* a *P. fluorescens* byly jednorázově kultivovány (1 % obj. inokulum) v živném bujónu s EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ve formě dihydrátu disodné soli (7440 mg.l<sup>-1</sup>) při teplotě 30 °C po dobu 16 h. Procento růstu buněk bakterií (viz. rovnice 1) obou kmenů, po subletálním poškození účinkem EDTA, bylo vypočteno z naměřených hodnot absorbancí (A<sub>615</sub>). Naměřená hodnota absorbance A<sub>615</sub>(x) představovala absorbanci bakteriální kultury, kultivované v živném bujónu s EDTA (7440 mg.l<sup>-1</sup>) za daných podmínek kultivace (absorbance byla měřena oproti sterilnímu živnému bujónu s EDTA 7440 mg.l<sup>-1</sup>).

#### *Subletální poškození bakteriálních kmenů směsí organických kyselin*

Kmeny bakterií *E. coli* a *P. fluorescens* byly jednorázově kultivovány (1 % obj. inokulum) v živném bujónu se směsí organických kyselin při teplotě 30 °C po dobu 16 h. K přípravě směsí organických kyselin byly použity koncentrované roztoky kyseliny mléčné (98 % hm.), kyseliny octové (99 % hm.) a kyseliny propionové (99 % hm.), všechny chemikálie Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, v poměru 40 : 16 : 16 % obj. smíchané s vodou (pH 5,5). K rozborům byla brána 1% obj. úroveň připravené vodné směsi organických kyselin. Výsledné koncentrace organických kyselin v živném bujónu byly: kyselina mléčná (272 mg.l<sup>-1</sup>), kyselina octová (1030 mg.l<sup>-1</sup>) a kyselina propionová (835 mg.l<sup>-1</sup>). Procento růstu buněk (viz. rovnice 1) obou bakteriál-

ních kmenů, po subletálním poškození směsí organických kyselin, bylo vypočteno ze získaných hodnot absorbancí ( $A_{615}$ ). Naměřená hodnota absorbance  $A_{615}(x)$  představovala absorbanci bakteriální kultury, kultivované v živném bujónu se směsí organických kyselin za daných podmínek kultivace (absorbance byla měřena oproti sterilnímu živnému bujónu se směsí organických kyselin).

#### *Stanovení účinku nisinu na subletálně poškozené bakteriální kmeny*

Bakteriální kmeny *E. coli* a *P. fluorescens*, kultivované v živném bujónu (1 % obj. inokulum) při teplotě 30 °C po dobu 16 h, byly nejprve subletálně poškozeny působením konkrétního subletálního chemického stresu, tzn. EDTA (7440 mg.l<sup>-1</sup>) nebo směsí organických kyselin: kyselina mléčná (272 mg.l<sup>-1</sup>), kyselina octová (1030 mg.l<sup>-1</sup>), kyselina propionová (835 mg.l<sup>-1</sup>). Poškozené buňky bakteriálních kmenů byly následně kultivovány (1 % obj. inokulum subletálně poškozených buněk bakterií) v živném bujónu s nisinem (2,5 mg.l<sup>-1</sup>) při teplotě 30 °C po dobu 16 h. Ze získaných hodnot absorbancí ( $A_{615}$ ) bylo vypočteno procento růstu buněk bakterií (viz. rovnice 1) pro oba kmeny. Naměřená hodnota absorbance  $A_{615}(x)$  představovala absorbanci poškozené bakteriální kultury (pomocí EDTA nebo směsí organických kyselin) následně kultivované v živném bujónu s nisinem (2,5 mg.l<sup>-1</sup>) za daných podmínek kultivace. Absorbance byla měřena proti sterilnímu živnému bujónu s nisinem (2,5 mg.l<sup>-1</sup>).

#### *Reparace subletálně poškozených bakteriálních kmenů*

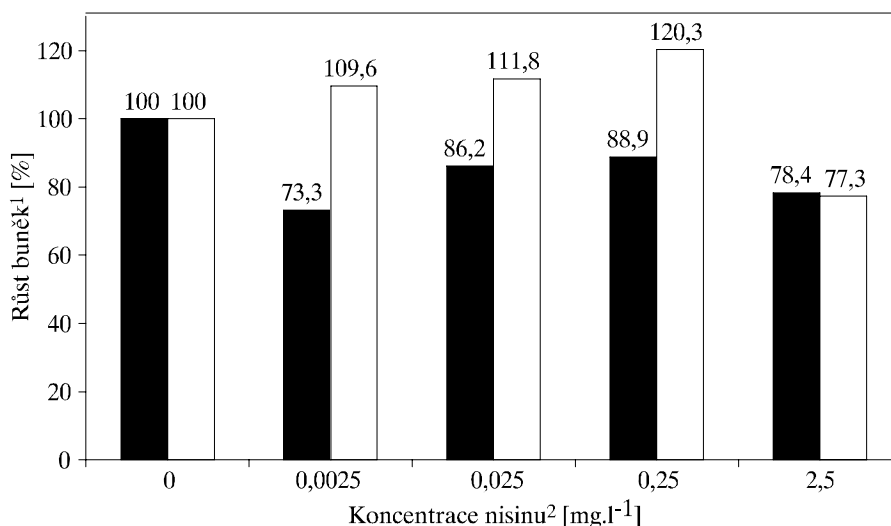
Reparační procedura byla uskutečněna u bakteriálních kmenů *E. coli* a *P. fluorescens* subletálně poškozených kombinovaným působením EDTA (7440 mg.l<sup>-1</sup>) s následným působením nisinu (2,5 mg.l<sup>-1</sup>) nebo směsí organických kyselin: kyselina mléčná (272 mg.l<sup>-1</sup>), kyselina octová (1030 mg.l<sup>-1</sup>), kyselina propionová (835 mg.l<sup>-1</sup>) s následným působením nisinu (2,5 mg.l<sup>-1</sup>). Pro reparaci byl použit vodný reparační roztok o pH 7 obsahující následující chemikálie: MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (0,1 % hm.), MnSO<sub>4</sub> (0,1 % hm.), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,5 % hm.) a kyselinu pyrohroznovou (0,1 % hm.), všechny chemikálie Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Poškozené buňky bakterií byly odstředěny (4000 ot.min<sup>-1</sup>/0 °C/15 min) a suspendovány do reparačního média, kde byly podrobeny reparaci při teplotě 30 °C po dobu 2 h. Zreparované buňky byly poté zaočkovány do živného bujónu (1 % obj. inokulum zreparovaných buněk) a kultivovány při teplotě 30 °C po dobu 16 h. Ze získaných hodnot absorbancí ( $A_{615}$ ) bylo pro oba kmeny vypočteno procento růstu buněk bakterií (viz. rovnice 1). Naměřená hodnota absorbance  $A_{615}(x)$  představovala absorbanci zreparované bakteriální kultury kultivované v živném bujónu

za daných podmínek kultivace (absorbance byla měřena oproti sterilnímu živnému bujónu).

Všechny výsledky uvedené v práci jsou průměrem minimálně ze tří stanovení.

## Výsledky a diskuse

V prezentované práci byl zjišťován rozdíl v kombinaci účinku EDTA a nisinu a organických kyselin a nisinu na gramnegativní bakteriální kmeny *E. coli* a *P. fluorescens*. Výběr stresových faktorů i testovaných gramnegativních bakterií měly vazbu na experimentální výzkum této problematiky v minulých letech [15]. Kmeny *E. coli* a *P. fluorescens* rostly dobře v živném bujónu a jejich denzity dosahovaly po jednorázové 16h kultivaci shodně řádu  $10^8$  JTK.ml<sup>-1</sup>.



OBR. 1. Přímý účinek nisinu (0; 0,0025; 0,025; 0,25; 2,5 mg.l<sup>-1</sup>) na nepoškozené bunky *E. coli* DMF 7502 (●) a *P. fluorescens* DMF 9010 (○) po jejich jednorázové kultivaci v živném bujónu s nisinem při 30 °C během 16 h.

FIG. 1. Direct effect of nisin (0, 0.0025, 0.025, 0.25, 2.5 mg.l<sup>-1</sup>) on non-injured cells of *E. coli* DMF 7502 (●) and *P. fluorescens* DMF 9010 (○) after their batch cultivation in the nutrient broth with nisin at 30 °C during 16 h.

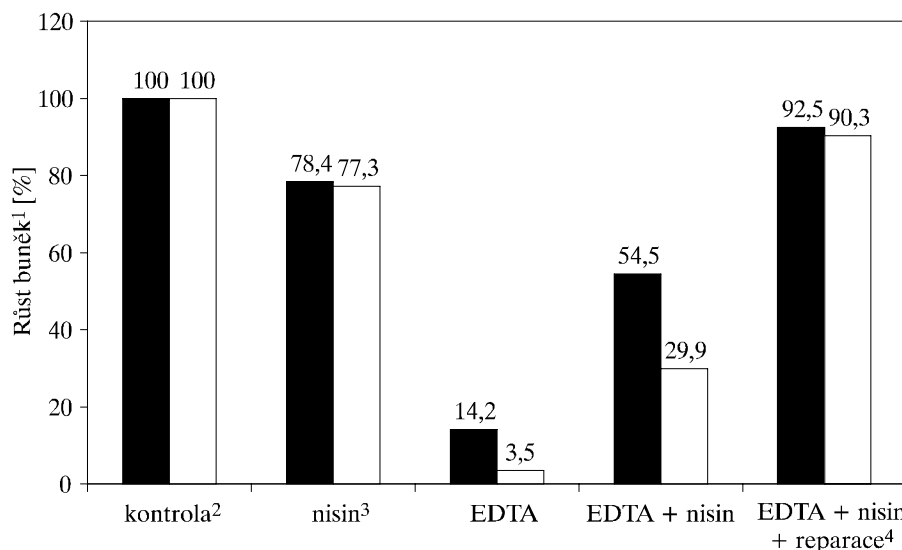
1 - growth of cells, 2 - concentration of nisin.



Účinek experimentálně zvolených koncentrací nisinu (0; 0,0025; 0,025; 0,25; 2,5 mg.l<sup>-1</sup>) na nepoškozené kmeny *E. coli* a *P. fluorescens* je demonstrován na obr. 1. Použité koncentrace nisinu nezpůsobily prokazatelný přímý inhibiční účinek na růst testovaných kmenů. U kmene *P. fluorescens* byl v prostředí nižších koncentrací nisinu (0; 0,0025; 0,025; 0,25 mg.l<sup>-1</sup>) zjištěn mírně stimulační účinek. Důvodem zjištěné stimulace se zdá být hypotéza, že bakterie využívaly pro svůj růst proteinové složky mléka obsažené v nisinovém preparátu Nisaplinu® (obsah proteinů 12 % hm.) [4]. Na základě experimentu uvedeného v této i předchozích pracích [16] bylo zjištěno, že určitý inhibiční účinek na oba gramnegativní kmeny začíná od koncentrace nisinu 2,5 mg.l<sup>-1</sup>, která byla zvolena pro kombinované působení s dalšími faktory a představuje koncentraci používanou ke konzervaci některých potravin v potravinářském průmyslu. Prakticky používané koncentrace nisinu se v potravinářském průmyslu se pohybují od 0,625 do 12,5 mg.l<sup>-1</sup> [4]. Jak bylo publikováno v minulosti, působení nisinu samostatně i v kombinaci s dalšími fyzikálními (záhřev, mrazení) [1, 17] nebo chemickými (organické kyseliny, EDTA, NaCl) [1, 15] stresovými faktory bylo výrazně silnější na grampozitivní bakterie [18] než na gramnegativní bakterie [1].

Výsledky účinku EDTA (7440 mg.l<sup>-1</sup>), účinku EDTA (7440 mg.l<sup>-1</sup>) s následným působením nisinu (2,5 mg.l<sup>-1</sup>) a účinku finální reparační procedury na bakteriální kmeny *E. coli* a *P. fluorescens* jsou uvedeny na obr. 2. Z obrázku je patrné, že při působení EDTA došlo u kmene *P. fluorescens* k intenzivnějšímu potlačení růstu (na 3,5 % původního růstu buněk) než u kmene *E. coli*. V potravinářském průmyslu České republiky jsou přídatky EDTA (E 385) v nejvyšším povoleném množství 75–250 mg.kg<sup>-1</sup>, resp. mg.l<sup>-1</sup> [19] povoleny pro různé potravinářské výrobky. Z našich výsledků je zřejmé, že námi používaná koncentrace EDTA (7440 mg.l<sup>-1</sup>) převzatá z literatury [20], která je řádově vyšší než v potravinářství České republiky přípustné hodnoty, avšak vykazující úroveň inhibice srovnatelnou s použitou směsí organických kyselin, způsobila výrazný úbytek životaschopnosti obou gramnegativních kmenů.

Z výsledků účinku EDTA (7440 mg.l<sup>-1</sup>) s následným působením nisinu (2,5 mg.l<sup>-1</sup>) na bakteriální kmeny *E. coli* a *P. fluorescens* je možné konstatovat, že přírůstek nisinu ve formě Nisaplinu® zeslabil účinek chelatačního činidla na oba testované mikroorganismy. Z literatury je známo, že pro fyziologické poškození buněk *E. coli* bylo úspěšně použito kombinace bakteriocinů s chelatačními činidly [1, 21]. Tato zjištěná skutečnost je v relativním rozporu s těmito údaji. Buňky gramnegativních bakterií se pravděpodobně v prostředí Nisaplinu®, obsahujícího určité množství proteinů, sacharidů a minerálních látek mléka, reparaovaly a následně byly schopné růstu



OB. 2. Přímý účinek nisinu (2,5 mg.l<sup>-1</sup>), účinek EDTA (7440 mg.l<sup>-1</sup>), účinek EDTA (7440 mg.l<sup>-1</sup>) s následným působením nisinu (2,5 mg.l<sup>-1</sup>) a účinek reparační procedury na *E. coli* DMF 7502 (●) a *P. fluorescens* DMF 9010 (○) po jednorázové kultivaci kmenů v živném bujónu při 30 °C během 16 h.

FIG. 2. Direct nisin effect (2.5 mg.l<sup>-1</sup>), effect of EDTA (7440 mg.l<sup>-1</sup>), effect of EDTA (7440 mg.l<sup>-1</sup>) with a subsequent effect of nisin (2.5 mg.l<sup>-1</sup>), and effect of the reparation procedure on *E. coli* DMF 7502 (●) and *P. fluorescens* DMF 9010 (○) after the batch cultivation of strains in the nutrient broth at 30 °C during 16 h.

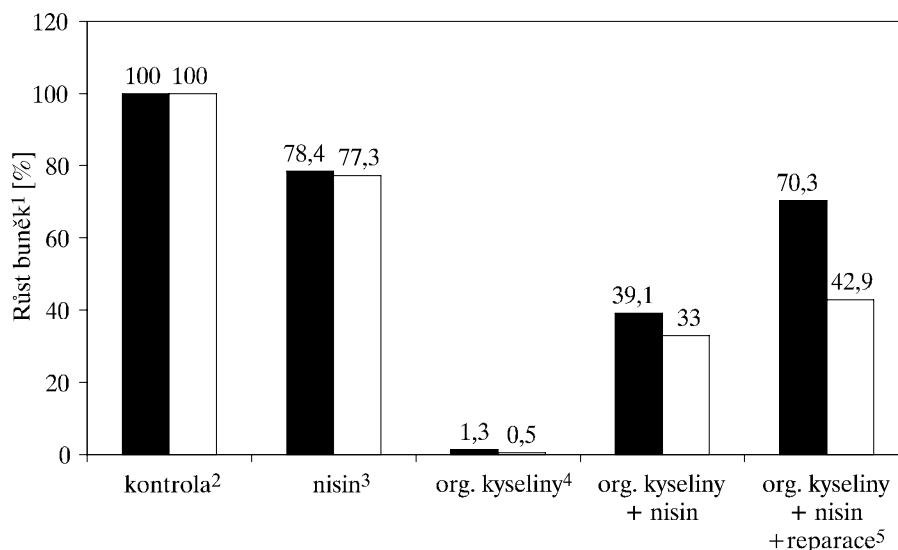
1 - growth of cells, 2 - control, 3 - nisin, 4 - reparation.

v živném bujónu. K průkazu inhibice buněk poškozených pomocí EDTA s následným působením nisinu by bylo vhodné vyzkoušet přidavek samotné aktivní látky nisinu.

Výsledky reparační bakteriálních kmenů *E. coli* a *P. fluorescens*, po jejich předchozím poškození EDTA (7440 mg.l<sup>-1</sup>) a následně nisinem (2,5 mg.l<sup>-1</sup>) v reparačním roztoku za vhodných kultivačních podmínek ukazuje obr. 2. Obecně se dá konstatovat, že u obou bakteriálních kmenů došlo během finálních reparací k relativně vysokému nárůstu jejich buněk (vzhledem k původním buněčným populacím). Již dříve bylo zjištěno, že se většina buněk bakterií reparuje během 2 hodin při vhodné teplotě růstu v nutričně bohatém neselektivním médiu [22].

Výsledky samotného účinku směsi organických kyselin: kyseliny mléčné (272 mg.l<sup>-1</sup>), kyseliny octové (1030 mg.l<sup>-1</sup>), kyseliny propionové (835 mg.l<sup>-1</sup>) [1], dále účinku směsi organických kyselin s následným působením nisinu





OBR. 3. Přímý účinek nisinu (2,5 mg.l<sup>-1</sup>), účinek směsi organických kyselin: kyselina mléčná (272 mg.l<sup>-1</sup>), kyselina octová (1030 mg.l<sup>-1</sup>), kyselina propionová (835 mg.l<sup>-1</sup>), účinek směsi organických kyselin s následným působením nisinu (2,5 mg.l<sup>-1</sup>) a účinek reparační procedury na *E. coli* DMF 7502 (●) a *P. fluorescens* DMF 9010 (○) po jednorázové kultivaci kmenů v živném bujónu při 30 °C během 16 h.

FIG. 3. Direct effect of nisin (2.5 mg.l<sup>-1</sup>), effect of the mixture of organic acids: lactic acid (272 mg.l<sup>-1</sup>), acetic acid (1030 mg.l<sup>-1</sup>), propionic acid (835 mg.l<sup>-1</sup>), effect of the mixture of organic acids with a subsequent effect of nisin (2.5 mg.l<sup>-1</sup>), and the effect of the reparation procedure on *E. coli* DMF 7502 (●) and *P. fluorescens* DMF 9010 (○) after batch cultivations of strains in a nutrient broth at 30 °C during 16 h.

1 - growth of cells, 2 - control, 3 - nisin, 4 - organic acids, 5 - reparation.

(2,5 mg.l<sup>-1</sup>) a účinku finální reparační procedury na bakteriální kmeny *E. coli* a *P. fluorescens* jsou uvedeny na obr. 3. Na obrázku je demonstrováno, že směs organických kyselin vykazovala silný inhibiční účinek na oba bakteriální kmeny, a tento účinek byl ještě intenzivnější, než v případě EDTA. V potravinářském průmyslu České republiky se některé organické kyseliny, např. kyselina mléčná (pouze L(+)-forma, E 270), kyselina octová (E 260) nebo kyselina propionová (E 280), nebo jejich soli, používají jako přídatné látky [23] v deklarovaném nejvyšším povoleném množství v rozmezí hodnot 2000–3000 mg.l<sup>-1</sup>, resp. mg.kg<sup>-1</sup> pro relativně velmi široké spektrum potravinářských výrobků [19, 24]. Námi testovaná směs organických kyselin výše uvedených koncentrací (složená z kyseliny mléčné, kyseliny octové a kyseliny propionové) se ve zvoleném systému jevila jako velmi účinná.

Podobně jako v případě EDTA, námi zvolená koncentrace nisinu, aplikovaná ve formě Nisaplinu®, způsobila snížení inhibičních účinků směsi organických kyselin na růst obou gramnegativních bakteriálních kmenů kultivovaných v živném bujónu. Výsledky s použitou koncentrací nisinu nepotvrdily literární poznatky, které uvádějí, že u gramnegativních bakterií a grampozitivních bakterií rezistentních k bakteriocinům, které byly subletálně poškozeny mrazením, záhřevem nebo organickými kyselinami, byl prokázán inhibiční účinek nisinu nebo pediocinu AcH [1]. V budoucnu by bylo vhodné experimentálně vyzkoušet působení vyšších koncentrací nisinu (např. až 25 mg.l<sup>-1</sup>).

Z výsledků reparace bakteriálních kmenů *E. coli* a *P. fluorescens*, po jejich předchozím subletálním poškození směsí organických kyselin a následně nisinem (2,5 mg.l<sup>-1</sup>) vyplývá, že reparační procedura byla méně účinná pro oba kmeny než reparační procedura následující po poškození kombinovaným účinkem EDTA a nisinu.

V potravinách se často vyskytuje směs gramnegativních a grampozitivních bakterií různě citlivých k nisinu. Tam, kde by byl nisin použit k cílenému potlačení růstu grampozitivních bakterií citlivých k nisinu, je možno přítomnou mikrobiální populaci rozdělit na skupinu grampozitivních bakterií citlivých i necitlivých k nisinu a na skupinu gramnegativních bakterií, citlivých k EDTA a organickým kyselinám. Přídavek nisinu ve formě Nisaplinu®, v doporučeném množství postačujícím k inhibici citlivých grampozitivních bakterií (např. *Bacillus* sp., *Clostridium* sp., *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Listeria* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp.) [4], byl použit v této práci a bylo prokázáno, že nisin zeslaboval účinek směsi EDTA a organických kyselin na testované kmeny *E. coli* a *P. fluorescens*. Z uvedeného je zřejmá potřeba ověřování antimikrobiálně působících faktorů nejen v modelových pokusech s jednotlivými mikrobiálními kmeny, ale i v systémech reálných potravin obsahujících směsnou mikrobiální populaci.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České republiky (grant č. 104/00/D087) a Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (grant č. CEZ: J19/98/223300004).

## Literatura

1. KALCHAYANAND, N. - HANLIN, M. B. - RAY, B.: Sublethal injury makes Gram-negative and resistant Gram-positive bacteria sensitive to the bacteriocins, pediocin AcH and nisin. Letters in Applied Microbiology, 15, 1992, č. 6, s. 239-243.

2. HOOVER, D. G. - STEENSON, L. R.: Bacteriocins of lactic acid bacteria. San Diego : Academic Press Inc., 1993. 93 s.
3. SCHVED, F. - HENIS, Y. - JUVEN, B. J.: Response of spheroplasts and chelator-permeabilized cells of Gram-negative bacteria to the action of the bacteriocins pediocin SJ-1 and nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 21, 1994, s. 305-314.
4. Danisco Cultor, Brabrand, Dánsko: Introduction to Nisaplin® Natural Antimicrobial. 2001. 6 s.
5. RUHR, E. - SAHL, H.: Mode of action of peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential on whole cells and on cytoplasmatic and artificial vesicles. *Antimicrobial Agent and Chemotherapy*, 27, 1985, s. 841-845.
6. GAO, F. H. - ABEE, T. L. - KOONINGS, W. N.: Mechanism of action of the peptide antibiotics nisin in liposomes and cytochrome C oxidase containing proteoliposomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1991, s. 2164-2170.
7. STEVENS, K. A. - SHELDON, B. W. - KLAPES, N. R. - KLAENHAMMER, T.: Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 1991, s. 3613-3615.
8. LEIVE, L.: The barrier function of the gram-negative envelope. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 235, 1974, s. 109-129.
9. ROSYPAL, S. - HOĐÁK, K. - MARTINEC, T. - KOCUR, M.: *Obecná bakteriologie*. Praha : SPN n. p., 1981. 104 s.
10. KABARA, J. J. - EKLUND, T.: Organic acids and esters. In: RUSSEL, N. J. - GOULD, G. W. (ed.): *Food Preservatives*, Glasgow : Blackie and Son Ltd., 1991, s. 44.
11. RAY, B. - SANDINE, W. E.: Acetic, propionic, and lactic acids of starter culture bacteria as biopreservatives. In: RAY, B. - DAESCHEL, M. (ed.): *Food Biopreservatives of Microbial Origin*, London : CRC Press, 1992, s. 103-136.
12. ORTH, D. S.: *Handbook Cosmetic Microbiology*. New York : Marcel Dekler Inc., 1993. 119 s.
13. ŠVIRÁKOVÁ, E.: Závěrečná zpráva o řešení grantového projektu č. 104/00/D087 Subletální poškození gram pozitivních a gram negativních bakterií. Praha : Grantová agentura České republiky, 2003. 3 s.
14. ČSN 56 0083 (ISO 4833). *Mikrobiologie - Všeobecné pokyny pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C*. Praha : Český normalizační institut, 1995.
15. ŠVIRÁKOVÁ, E. - ŠVANDOVÁ, J. - PLOCKOVÁ, M.: Subletální poškození kmenů *E. coli* a *Pseudomonas* sp. In: *Sborník přednášek semináře Mléko a sýry 2001*. Praha : Česká společnost chemická, 2001, s. 148-153.
16. PLOCKOVÁ, M. - ŠTĚPÁNEK, M. - DEMNEROVÁ, K. - ČURDA, L. - ŠVIRÁKOVÁ, E.: Effect of nisin for improvement in shelf-life and quality of processed cheese. *Advances in Food Sciences*, 18, 1996, č. 3/4, s. 78-83.
17. PLOCKOVÁ, M. - ŠVIRÁKOVÁ, E. - NEVAŘILOVÁ, P.: Effect of nisin on injured cells of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Czech Journal of Food Sciences*, 16, 1998, č. 1, s. 3-7.
18. STILES, M. E.: Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70, 1996, s. 331-345.
19. Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích po úpravě zákonem č. 306/2000 Sb., s komentářem, Vyhláška č. 298 Ministerstva zdravotnictví ze dne 28. listopadu 1997, část 6 Konzervanty. In: *Praktická příručka č. 44*. Praha : Agrospoj s.r.o., 2001, s. 212-215.
20. STEVENS, K. A. - SHELDON, B. W. - KLAPES, N. A. - KLAENHAMMER, T. R.: Effect of treatment conditions on nisin inactivation of Gram-negative bacteria. *Journal of Food Protection*, 55, 1992, č. 10, s. 763-766.

21. SHEFET, S. M. - SHELDON, B. W. - KLAENHAMMER, T. R.: Efficacy of optimized nisin-based treatments to inhibit *Salmonella typhimurium* and extend shelf life of broiler carcasses. *Journal of Food Protection*, 58, 1995, s. 1077-1082.
22. RAY, B.: Impact of bacterial injury and repair in food microbiology: its past, present and future. *Journal of Food Protection*, 49, 1996, č. 8, s. 651-655.
23. Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích po úpravě zákonem č. 306/2000 Sb., s komentářem, Vyhláška č. 298 Ministerstva zdravotnictví ze dne 28.listopadu 1997, část 1 Látky přídatné. In: Praktická příručka č. 44. Praha : Agrospoj s.r.o., 2001, s. 200-203.
24. Zákon č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích po úpravě zákonem č. 306/2000 Sb., s komentářem, Vyhláška č. 298 Ministerstva zdravotnictví ze dne 28.listopadu 1997, část 7 Kyseliny, zásady, soli a estery. In: Praktická příručka č. 44. Praha : Agrospoj s.r.o., 2001, s. 215-217.

Do redakcie došlo 20.2.2003.

**Effect of nisin on *Escherichia coli* DMF 7502 and *Pseudomonas fluorescens* DMF 9010 injured by reason of EDTA or mixture of organic acids**

ŠVIRÁKOVÁ, E. - PLOCKOVÁ, M. - HORNÍKOVÁ, L.: *Bull. potrav. Výsk.*, 42, 2003, p. 75-86.

SUMMARY. This work was directed to study the effect of chemical stress factors (nisin, EDTA, mixture of organic acids) on the growth of technological risk strains *Escherichia coli* DMF 7502 and *Pseudomonas fluorescens* DMF 9010. EDTA (7440 mg.l<sup>-1</sup>) and the mixture of organic acids: lactic acid, acetic acid, propionic acid at concentrations of 272 mg.l<sup>-1</sup>, 1030 mg.l<sup>-1</sup>, and 835 mg.l<sup>-1</sup> respectively, acting separately, exhibited intensive inhibition of both tested strains; the mixture of organic acids was found to be slightly more effective. Addition of nisin (2.5 mg.l<sup>-1</sup>) decreased the inhibitory effects of EDTA and of the mixture of organic acids on both tested strains. Partial cell reparation of both tested strains treated by EDTA and nisin or by organic acids and nisin occurred after a 2 h incubation in the reparation solution containing pyruvic acid, Mg<sup>2+</sup> and Mn<sup>2+</sup> ions. The reparation was more successful for cells treated by EDTA and nisin for both tested strains.

KEYWORDS: Gram-negative bacteria; nisin, EDTA; organic acids; reparation