

## STANOVENÍ AUTOLÝZY *Lactobacillus helveticus* POMOCÍ GRAMOVA BARVENÍ A PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE

IVA JEBAVÁ<sup>a</sup>, JAROMÍR FIALA<sup>b</sup>, ADÉLA PETŘÍKOVÁ<sup>b</sup>, PAVEL ULBRICH<sup>c</sup>  
a MILADA PLOCKOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Ústav technologie mléka a tuků, <sup>b</sup> Ústav kvasné chemie a bioinženýrství, <sup>c</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6  
Iva.Jebava@vscht.cz, Jaromir.Fiala@vscht.cz,  
Adela.Petrikova@vscht.cz, Pavel.Ulbrich@vscht.cz,  
Milada.Plockova@vscht.cz

Došlo 8.9.10, přijato 11.11.10.

Klíčová slova: autolýza, průtoková cytometrie, *Lactobacillus helveticus*, elektronová mikroskopie, Gramovo barvení

### Úvod

*Lactobacillus helveticus* je používán jako kyselá kultura při výrobě sýrů s vysokodohříváním syřeninou (Grana Padano, Parmigiano Reggiano, Emmental) a s nízkodohříváním syřeninou (Cheddar, Edam). Tento druh disponuje vysokým zastoupením intracelulárních proteolytických enzymů, které po uvolnění z buňky do těsta sýru pomocí autolýzy významně přispívají ke snížení hořkosti hydrolyzou hydrofobních peptidů, k zlepšování senzoryckých vlastností zvýšením produkce volných aminokyselin a k urychlování zráního procesu<sup>1-3</sup>. Míra autolýzy jednotlivých kmenů *L. helveticus* při výrobě sýrů (*in situ*) je jedním z důležitých kritérií při výběru aplikovatelných kmenů<sup>4,5</sup>.

Ke stanovení autolýzy *in situ* je možné použít buď samotnou výrobu sýru, která je osvědčeným, ale dlouhým a ekonomicky náročným procesem, nebo řadu *in vitro* metod, které vynikají nízkými náklady a rychlostí<sup>6</sup>. Za nejjednodušší screeningovou metodu *in vitro* je považováno pozorování bakteriální suspenze v nutričně chudém prostředí, jako je například pufr, kde buňky mají spontánní tendenci autolyzovat<sup>7</sup>. V pufrch je míra autolýzy obvykle detekována úbytkem buněk pomocí spektrofotometrického stanovení nebo stanovením počtu životaschopných buněk plotnovou metodou, stanovením přítomnosti a aktivity intracelulárních komponent (DNA, RNA, enzymy), mikroskopickým pozorováním nebo pozorováním aktivity lytických enzymů (difuzní agarová zkouška, zymogram)<sup>6</sup>.

Gramovo barvení sloužilo historicky k rozlišení bakterií na dvě skupiny, které se vzájemně liší stavbou buněčné stěny. Bylo zjištěno, že s použitím tohoto barvení lze u *L. helveticus* pozorovat změnu zbarvení buněk při stanovení autolýzy v pufru<sup>8</sup>. Původně grampozitivní buňky *L. helveticus* (modro-fialové zbarvení) mění barvu a jeví se jako gramnegativní (růžovo-červené). Tato Gram-labilita je diskutována u některých mikroorganismů (např. *Bacillus* spp.)<sup>9</sup>, ale nikdy nebyla spojována s autolýzou u *L. helveticus*.

Průtoková cytometrie je známa jako velice přesná analytická metoda poskytující informace o stavu a změnách bakteriální populace<sup>10</sup>. K rozlišení grampozitivních a gramnegativních bakterií lze využít metod průtokové cytometrie s vhodným fluorescenčním barvením. Specifická barviva pro grampozitivní bakterie jsou například lipofilní barvivo rhodamine 123, barvivo HI (hexidium iodid) nebo barvivo WGA (fluorescein-conjugated lecithin wheat germ agglutinin), které se váže na *N*-acetylglukosamin v peptidoglykanu buněčné stěny. Těmto barvivům lipopolysacharidy v buněčné stěně brání proniknutí do gramnegativních buněk a obarvit je<sup>11</sup>. Pro odlišení gramnegativních bakterií lze použít doplňkové barvivo, které barví všechny buňky ve vzorku. Jako vhodné se ukázalo barvivo HI, pokud je s buňkami inkubováno v roztoku EDTA při 50 °C po dobu 15 min (cit.<sup>11</sup>).

Cílem této práce bylo zjistit, zda je možné průtokovou cytometrií odlišit v pufru autolyzované buňky *L. helveticus*, jevící se při Gramově barvení jako gramnegativní, od buněk grampozitivních.

### Experimentální část

#### Kmeny a růstové podmínky

V této práci byly použity tři kmeny *L. helveticus* (CNRZ 32J – kyselá kultura Comté, Francie, CNRZ 414 – kumys, Rusko a ICT BROI – syrové kravské mléko, Česká republika) získané z různých zdrojů, a to jak vzhledem k biotopu, tak vzhledem k zeměpisnému původu. Všechny kmeny byly kultivovány v MRS bujónu (Oxoid, Anglie) aerobně při teplotě 42 °C po dobu 16 h.

#### Příprava buněk a autolýza v pufru

Kmeny byly očkované inokulem 1 obj.% do 50 ml MRS bujónu a kultivovány po dobu 12 h. Poté byly odstředěny za podmínek: 9000 ot min<sup>-1</sup> při teplotě 4 °C po dobu 15 min. Po odstředění byl supernatant dekantován a buňky byly 2krát promyty ve 40 ml β-glycerofosfátového pufru (Sigma-Aldrich)<sup>12</sup>. Promyté buňky byly převedeny do fosfátového pufru (0,1 mol l<sup>-1</sup>, pH 7,0) a jím zředěny na výslednou absorbanci 0,8–0,9 měřenou při vlnové délce 650 nm. Takto připravená buněčná suspenze ve fosfátovém pufru byla kultivována při teplotě 42 °C po dobu 6 h.

## Stanovení autolýzy pomocí měření absorbance

Absorbance buněčné suspenze ve fosfátovém pufru byla měřena spektrofotometrem Helios (Thermo Spectronic, Anglie) při vlnové délce 650 nm v časech 0, 2, 4 a 6 h. Autolytická schopnost byla charakterizována procentem autolýzy dle rovnice<sup>7,12</sup>:

$$\% \text{ autolýza} = (A_0 - A_t) * 100 / A_0$$

kde  $A_0$  - absorbance na počátku kultivace v čase 0 h,  $A_t$  - absorbance v průběhu kultivace v čase  $t$ , kde  $t = \{2, 4, 6\}$ .

## Stanovení autolýzy pomocí Gramova barvení a světelného mikroskopu

Fixní preparáty připravené rozetřením 20  $\mu\text{l}$  buněčné suspenze ve fosfátovém pufru v časech 0, 2, 4 a 6 h na plochu 1  $\text{cm}^2$  vyznačenou na podložním sklíčku byly fixovány plamenem, obarveny podle Grama a pozorovány optickým mikroskopem při tisícinásobném zvětšení pod imerzním olejem. Z každého fixního preparátu bylo pořízeno pět snímků. U každého snímku byl určen počet buněk jevících se jako gramnegativní (růžovo-červené) a počet buněk jevících se jako grampozitivní (modro-fialové). Autolytická schopnost byla charakterizována procentem autolýzy dle rovnice:

$$\% \text{ autolýza} = (\% (G+) _0 - \% (G+) _t) * 100 / \% (G+) _0$$

kde je  $\% (G+) _0$  - procentuální zastoupení grampozitivních buněk na počátku kultivace v čase 0 h,  $\% (G+) _t$  - procentuální zastoupení grampozitivních buněk v průběhu kultivace v čase  $t$ , kde  $t = \{2, 4, 6\}$ .

## Stanovení autolýzy elektronovým mikroskopem

Vzorky pro elektronovou mikroskopii byly připraveny metodou negativního barvení z buněčné suspenze ve fosfátovém pufru v časech 0 a 4 h. Suspenze byla nanesena na tři minuty na elektronmikroskopickou měděnou síťku potaženou uhlíkem. Následovalo odsátí buněk a opláchnutí síťky vodou. Poté byla síťka položena na 10 s na kapku roztoku wolframáto-křemičitanu sodného (4 hm.%, pH 7,4). Buňky byly pozorovány transmisním elektronovým mikroskopem JEOL JEM-1010 s urychlovacím napětím 80 kV. Snímky byly pořízeny CCD kamerou Mega-View III spojenou se softwarem AnalySIS (Olympus Soft Imaging Solutions, Německo)<sup>13</sup>.

## Stanovení autolýzy průtokovou cytometrií

Byly připraveny zásobní roztoky fluorescenčních barviv HI (Invitrogen, Molecular Probes, USA) o koncentraci 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  a fluorescenčního barviva Oregon Green conjugated WGA (Invitrogen, Molecular Probes, USA) o koncentraci 1  $\text{mg ml}^{-1}$ , které byly uchovávány při  $-18^\circ\text{C}$  a před použitím filtrovány (velikost pórů 0,22  $\mu\text{m}$ )<sup>10</sup>. Buněčná suspenze byla zředěna v časech 0, 2, 4 a 6 h v poměru 1:100 roztokem KCl (3  $\text{mol l}^{-1}$  KCl, 0,035  $\text{mol l}^{-1}$  EDTA, pH 7,0). K 100  $\mu\text{l}$  vzorku bylo přidáno 20  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku HI a vzorek byl inkubován 15 min při

50  $^\circ\text{C}$ . Poté bylo přidáno 10  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku WGA a vzorek byl inkubován při pokojové teplotě po dobu 4 min. Před cytometrickou analýzou byl vzorek zředěn 3  $\text{mol l}^{-1}$  KCl na výsledný objem 1 ml. Vzorky byly měřeny na průtokovém cytometru (PAS III, Partec GmbH, Německo). Pomocí měření relativní distribuce velikost buněk (FSC), červené fluorescence (FL3) emitované HI, zelené fluorescence (FL1) emitované WGA byl zjišťován podíl autolyzovaných buněk.

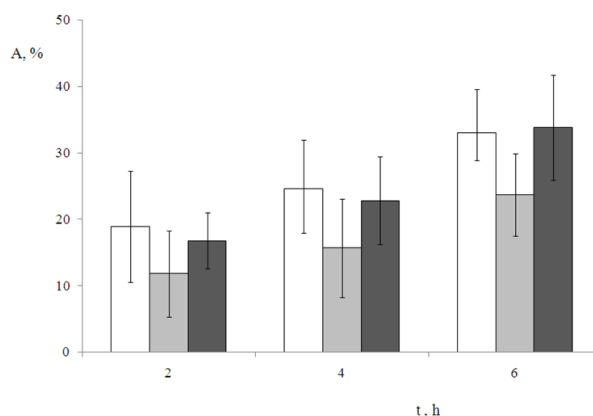
## Statistická analýza naměřených dat

Všechna stanovení autolýzy byla opakována 6krát na nezávislých vzorcích. Pro vyloučení odlehlých hodnot byl aplikován Dean- Dixonův test s hladinou významnosti 0,05. Výsledky byly prezentovány jako aritmetický průměr z šesti měření doplněné směrodatnými odchylkami.

## Výsledky a diskuse

Klasickou metodou stanovení autolytické aktivity měřením absorbance byl potvrzen rozdílný autolytický potenciál testovaných kmenů. Nejvíce lytický kmen *L. helveticus* byl po 4 h kultivace kmen CNRZ 32J a po 6 h kultivace kmen BROI (obr. 1).

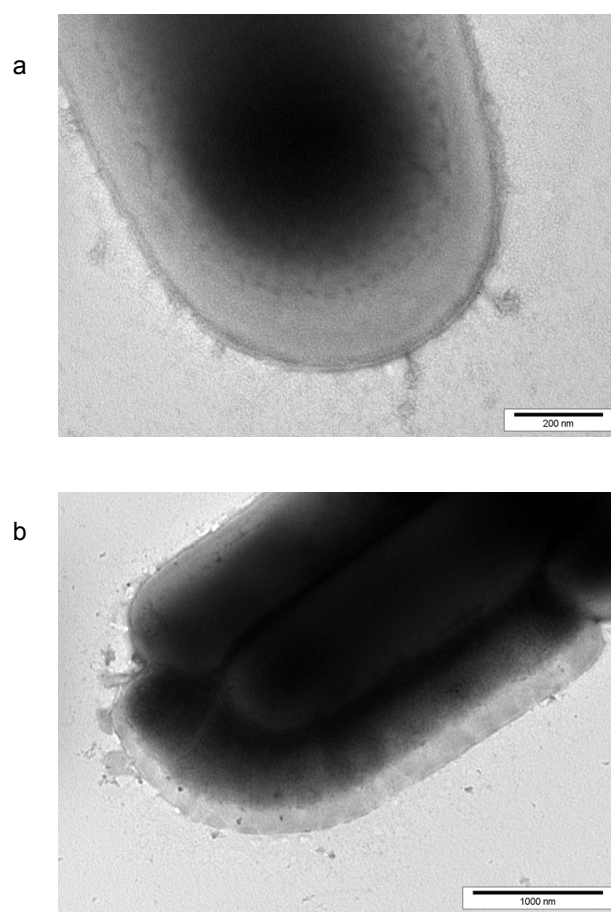
Na obr. 2 vidíme, že grampozitivní buňky *L. helveticus* se po 4 h kultivace ve fosfátovém pufru barví dle Grama jako gramnegativní tj. růžovo-červené. Tato změna nastává pravděpodobně v důsledku modifikace externích buněčných struktur. Předpokládáme, že gramnegativně jevící se buňky *L. helveticus* mají poškozenou buněčnou stěnu resp. zeslabenou vrstvu peptidoglykanu, což potvrzuje i elektronová mikroskopie. Na obr. 3 je zaznamenán morfologický rozdíl buněk před a po 4 h kultivaci ve fosfátovém pufru.



Obr. 1. Stanovení autolýzy ve fosfátovém pufru pomocí měření absorbance při 650 nm u tří kmenů *L. helveticus* □ 32J, ■ 414A ■ BROI; A – autolýza



Obr. 2. Sledování buněk *L. helveticus* BROI ve fosfátovém pufru obarvených dle Grama na počátku kultivace a) v čase 0 h, b) v čase 4 h, světelným mikroskopem při tisícínásobném zvětšení

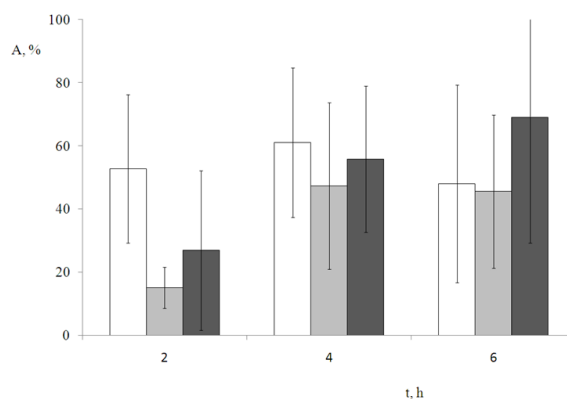


Obr. 3. Sledování autolýzy buněk *L. helveticus* BROI ve fosfátovém pufru na počátku kultivace a) v čase 0 h, b) v čase 4 h, elektronovým mikroskopem

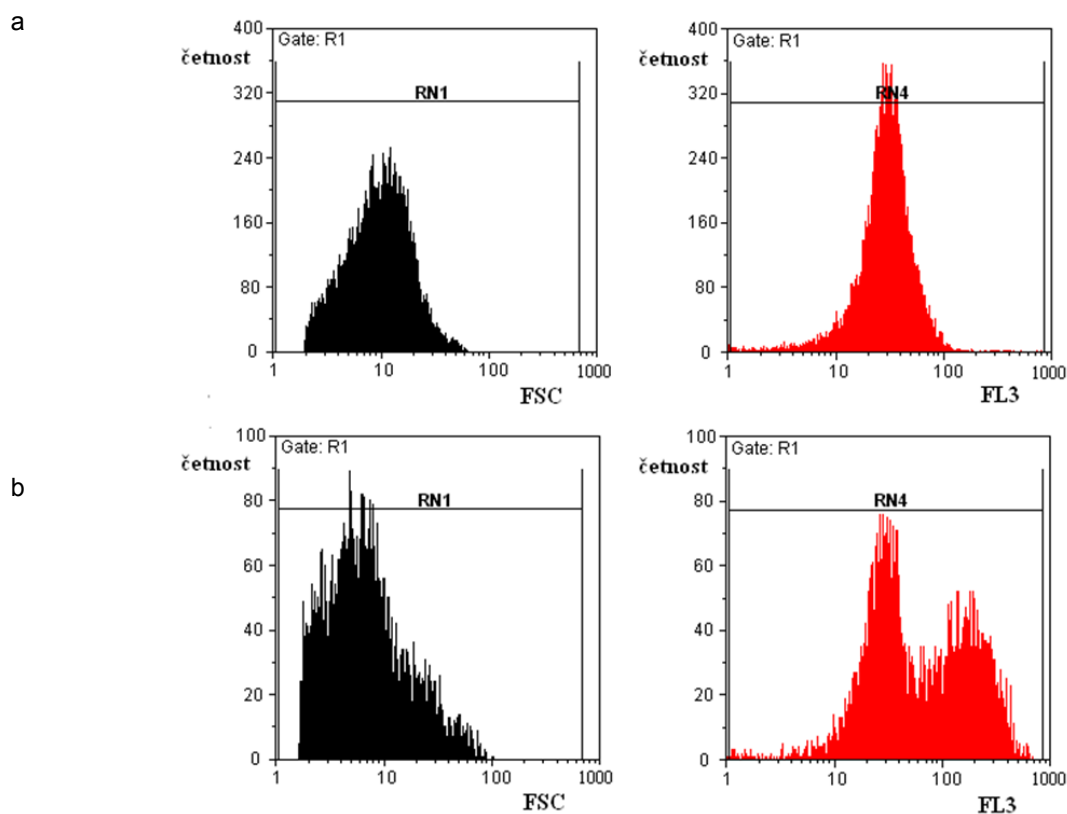
Výsledky autolytické aktivity stanovené pomocí sledování úbytku grampozitivních buněk korelovaly s výsledky klasické metody. Některé buňky však byly zbarveny jak červeně, tak modře a docházelo tak k subjektivním chybám při stanovení barvy buňky, což způsobilo vysoké směrodatné odchylky (obr. 4).

Průtokovou cytometrií bylo zjištěno (obr. 5), že během kultivace dochází k tvorbě dvou různých skupin buněk, lišících se ve schopnosti vázat barvivo HI. Toto barvivo vyzařující červenou fluorescence FL3 dosahuje u vzorku po 4h kultivaci ve fosfátovém pufru dvou maxim, což svědčí o tom, že ve vzorku jsou přítomny dva typy buněk stejně tak jako při Gramově barvení. Ve vaznosti barviva WGA, sledované pomocí emise zelené fluorescence FL1, nebyla zaznamenána žádná souvislost s buněčnou autolýzou.

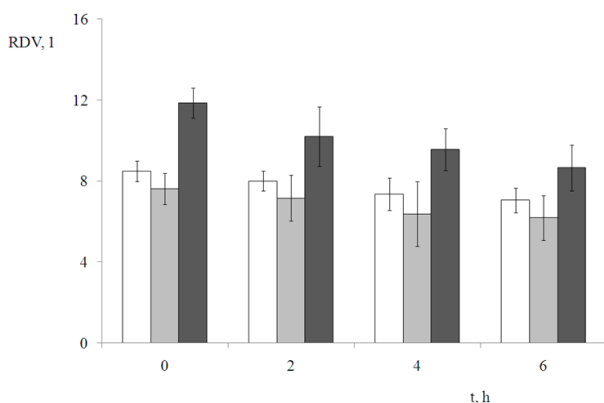
Sledováním relativní distribuce velikosti buněk (FSC) v průběhu kultivace ve fosfátovém pufru průtokovou cyto-



Obr. 4. Stanovení autolýzy ve fosfátovém pufru pomocí Gramova barvení a světelného mikroskopu u tří kmenů *L. helveticus* □ 32J, ■ 414 a ■ BROI; A – autolýza



Obr. 5. Příklad sledování autolýzy u *L. helveticus* BROI ve fosfátovém pufru průtokovou cytometrií se stanovením relativní velikosti buněk (FSC) a červené fluorescence (FL3) získané obarvením hexidum iodidu (HI) a) na počátku kultivace v čase 0 h, b) v průběhu kultivace v čase 4 h



Obr. 6. Sledování relativní velikosti buněk *L. helveticus* □ 32J, ■ 414 a ■ BROI průtokovou cytometrií v průběhu kultivace ve fosfátovém pufru. RDV – relativní distribuce velikosti

metrií bylo prokázáno, že velikost buněk během kultivace klesá (obr. 6). Největší změny v relativní velikosti byly patrné u v počátku největších buněk kmene BROI. Zde docházelo k zmenšení relativní distribuce velikosti buněk z 11,8 na 8,7. U ostatních kmenů byla tendence stejná ale s pozvolnější změnou.

## Závěr

Různými metodami bylo prostudováno autolytické chování tří kmenů *L. helveticus*. Byla použita klasická metoda sledování autolýzy v pufru pomocí měření absorbance, která byla doplněna o stanovení pomocí gramova barvení a světelného mikroskopu, elektronové mikroskopie a průtokové cytometrie s fluorescenčním barvením. Bylo zjištěno, že Gramovo barvení a průtokovou cytometrií lze použít jako doplňkové metody k detekci autolýzy u *L. helveticus*.

*Tato práce byla financována z účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum (MŠMT č. 21/2010) a grantem MŠMT 6046137305.*

## LITERATURA

1. Bockelmann W.: Int. Dairy J. 5, 977 (1995).
2. Hannon J. A., Wilkinson M. G., Delahunty C. M., Wallace J. M., Morrissey P. A., Beresford T. P.: Int. Dairy J. 13, 313 (2003).
3. Hannon J. A., Kilcawley K. N., Wilkinson M. G., Delahunty C. M., Beresford T. P.: Int. Dairy J. 17, 316 (2007).
4. Kenny O., FitzGerald R. J., O’Cuinn G., Beresford T. P., Jordan K.: Int. J. Dairy Tech. 58, 207 (2005).
5. Kenny O., FitzGerald R. J., O’Cuinn G., Beresford T. P., Jordan K.: Int. Dairy J. 58, 797 (2006).
6. Lortal S., Chapot-Chartier M. P.: Int. Dairy J. 15, 857 (2005).
7. Boutrou R., Sepulchre A., Gripon J. C., Monnet V.: J. Dairy Sci. 81, 2321 (1998).
8. Ondráčková I., Solichová K., Fiala J., Plocková M.: *Sborník: Celostátní přehledky sýrů 2010*, Výsledky přehledů a sborník přednášek konference Mléko a sýr. VŠCHT Praha, 264 (2010).
9. Beveridge T. J.: J. Bacteriol. 172, 1609 (1990).
10. Novák J., Basařová G., Fiala J., Dostálek P.: Chem. Listy 102, 183 (2008).
11. Holm C., Jespersen L.: Appl. Environ. Microbiol. 69, 2857 (2003).
12. Kozakova D., Solichová K., Ondrackova I., Svirakova E., Plockova M.: J. Food Nutr. Res. 49, 1 (2010).
13. Horsáková I., Voldřich M., Čerovský M., Sedláčková P., Šicnerová P., Ulbrich P.: Czech J. Food Sci. 27, 362 (2009).

**I. Jebavá<sup>a</sup>, J. Fiala<sup>b</sup>, A. Petříková<sup>b</sup>, P. Ulbrich<sup>c</sup>, and M. Plocková<sup>a</sup>** (<sup>a</sup> Department of Dairy and Fat Technology, <sup>b</sup> Department of Fermentation Chemistry and Bio-engineering, <sup>c</sup> Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology, Prague): **Detection of *Lactobacillus helveticus* Autolysis Using Gram Staining and Flow Cytometry**

In this study we combined a common method for autolysis detection - spectrophotometry of bacterial suspension in a buffer with Gram staining - and flow cytometry. After 4-h incubation in phosphate buffer the Gram-positive cells are colored like Gram-negative cells. A correlation between spectrophotometric observation and Gram staining was found. Using flow cytometry, the formation of two peaks of red fluorescence emitted by hexidium iodide (HI) was observed after 4-h incubation of the cell suspension in phosphate buffer. This indicates the presence of two cell groups with different capacity of binding HI to peptidoglycan as well as explains the observation by electron and light microscopy on Gram staining. A decrease in cell size during their cultivation in phosphate buffer was also observed.