

# ANALIZE PRIVIND ACTIVITATEA ANTIMICROBIANĂ A UNOR TULPINI DE BACTERII LACTICE

*Analysis on the antimicrobial activity of some lactic  
acid bacteria strains*

Ionela Sârbu<sup>1</sup>, Tatiana Vassu<sup>1</sup>, Ileana Stoica<sup>1</sup>, Carmen Chifiriuc<sup>1</sup>, Marcela Bucur<sup>1</sup>,  
Elena Rusu<sup>2</sup>, Robertina Ionescu<sup>1</sup>, Diana Pelinescu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamentul de Genetică, Facultatea de Biologie, Universitatea din București

<sup>2</sup>Universitatea „Titu Maiorescu”, București

## REZUMAT

**Obiectiv.** Scopul principal al acestui studiu a constat în selecția unui grup de bacterii lactice cu activitate antimicrobiană ridicată, identificarea compușilor cu acțiune antimicrobiană și caracterizarea acestora.

**Material și metode.** S-a determinat activitatea antimicrobiană a 153 de tulpini de bacterii lactice prin metoda difuzimetrică față de 6 tulpini microbiene patogene izolate de la pacienți cu infecții urinare și vaginale.

**Rezultate.** În urma obținerii rezultatelor, s-a constatat că majoritatea tulpinilor de bacterii lactice au prezentat o activitate antimicrobiană ridicată față de bacteriile patogene, cât și față de tulpinile de drojdii. Activitatea antimicrobiană a bacteriilor lactice a fost corelată în special cu producerea de acizi organici, iar în cazul a două tulpini aceasta a fost corelată cu biosinteza de bacteriocine. Bacteriocina produsă de tulpina *Lactococcus* (Lc.) *lactis* F2a a prezentat un spectru larg de acțiune și o activitate ridicată (51.200 UA/ml), comparativ cu bacteriocina izolată de la tulpina *Lactobacillus* (Lb.) *paracasei* ssp. *paracasei* JR (400 UA/ml). În ceea ce privește stabilitatea bacteriocine produse de tulpina Lc. *lactis* F2a, aceasta este mai stabilă la pH acid decât la pH bazic, expunerea în timp la o temperatură medie de 60°C determină o scădere drastică a activității bacteriocinei.

**Concluzii.** Bacteriile lactice utilizate au prezentat o activitate antimicrobiană ridicată atât față de tulpini patogene procariote, cât și eucariote. Dintre cele două bacteriocine analizate, bacteriocina izolată de la tulpina Lc. *lactis* F2a a prezentat o activitate ridicată și un spectru larg de acțiune.

**Cuvinte cheie:** bacterii lactice, probiotice, bacteriocine

## ABSTRACT

**Objective.** The main objective of this study was to select lactic acid bacteria strains with antimicrobial activity and to identify and characterize the antimicrobial compounds.

**Methods.** In this study we tested the antimicrobial activity of 153 lactic bacteria strains by disk diffusion method against 6 microbial pathogenic strains isolated from patients with urinary and vaginal infections.

**Results.** Antimicrobial test results revealed that most of lactic acid bacteria strains exhibited high antimicrobial activity against pathogenic microorganisms. For most of lactic bacteria strains antimicrobial activity has been correlated with the production of organic acids and only for two strains with the biosynthesis of bacteriocins. Bacteriocin produced by *Lactococcus* (Lc.) *lactis* F2a strain presented a broad spectrum of activity and high activity (51,200 AU/ml) compared with bacteriocins isolated from *Lactobacillus* (Lb.) *paracasei* ssp. *paracasei* JR strain (400 AU/ml). The stability tests of bacteriocin revealed that the bacteriocin produced by Lc. *lactis* F2a strain, it is stable at acid pH while exposure for long time to 60°C causes a drastic decrease in bacteriocin activity.

**Conclusions.** Lactic bacteria strains showed a high antimicrobial activity against both prokaryotic and eukaryotic pathogen strains. Two bacterial strains have bacteriocins. Bacteriocins isolated from Lc. *lactis* F2a strain showed a high activity and a broad spectrum of action.

**Keywords:** lactic acid bacteria, probiotics, bacteriocins

Autor corespondent:

Diana Pelinescu, Facultatea de Biologie, Aleea Portocalelor nr. 1-3, cod poștal 60101, București, România

E-mail: diana\_smarandache@yahoo.com

## INTRODUCERE

În România există o tendință de creștere a incidenței infecțiilor cu tulpini microbiene înalt rezistente la compuși cu acțiune antimicrobiană. Una dintre alternativele la tratamentele convenționale este reprezentată de utilizarea produselor probiotice. Tulpinile de bacterii lactice sunt utilizate frecvent în obținerea de produse probiotice. Cele mai utilizate specii de bacterii lactice în produsele probiotice de pe piață sunt: *Lb. rhamnosus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. reuteri*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum*, *Lb. johnsonii*, *Lb. plantarum* etc. (1-3)

Este cunoscut faptul că probioticele exercită efecte benefice asupra stării de sănătate a gazdei printr-o serie de mecanisme care implică: acțiune antimicrobiană, acțiune hipocolesterolemiantă, acțiune anticancerigenă, activitate imunomodulatoare, activitate metabolică etc. Studii clinice realizate până în prezent au demonstrat eficacitatea probioticelelor în tratarea sau prevenirea unor afecțiuni ale sistemului digestiv (diaree asociată cu infecția cu rotavirus și *Clostridium difficile*, sindromul colonului iritabil, boala Crohn, colite ulcerose, ulcere, cancer gastrointestinal și colorectal, intoleranța la lactoză), pancreatite, encefalopatia hepatică, alergii, boli autoimune, obezitate, boli cardiovasculare și infecții uro-genitale. (4-7)

Pentru utilizarea optimă a microorganismelor probiotice este necesară selecția și caracterizarea tulpinilor bacteriene. Unul dintre mecanismele prin care bacteriile lactice exercită efecte benefice asupra sănătății gazdei este reprezentat de capacitatea acestora de a biosintetiza compuși cu acțiune antimicrobiană. Dintre compușii cu activitate antimicrobiană biosintetizați de bacterii lactice amintim: acizii organici (acidul lactic, acidul acetic, acidul fenilactic, acidul hidroxifenilactic, acidul formic, acidul propionic, acidul butiric, acidul succinic etc.), bacteriocine, peroxidul de hidrogen, CO<sub>2</sub>, diacetilul, reuterinul produs de specia *Lb. reuteri* (8,9).

Bacteriocinele sunt substanțe antimicrobiene de natură proteică, biosintetizate de diferite tulpini bacteriene. Până în prezent, nisina produsă de *Lc. lactis* subsp. *lactis* este singura bacteriocină utilizată ca bioconservant în procesarea lactatelor. (10)

## MATERIAL ȘI METODE

### Testarea activității antimicrobiene a bacteriilor lactice asupra tulpinilor patogene selectate

Pentru testarea activității antimicrobiene au fost luate în studiu un număr de 153 de tulpini de bac-

terii lactice și 6 tulpini patogene izolate din infecții uro-genitale: *Escherichia (E.) coli* CMGB 11, *Streptococcus (Str.) agalactiae* CMGB 21, *Micrococcus (M.) luteus* CMGB 6, *Staphylococcus (S.) xylosus* CMGB 32, *Candida (C.) albicans* CMGB 13 și *C. krusei* CMGB 8. Tulpinile fac parte din colecția de microorganisme a Facultății de Biologie, Universitatea din București.

Au fost utilizate două metode de evidențiere a activității antimicrobiene. Pentru tulpinile de bacterii patogene 100μl cultură proaspătă (D.O.<sub>600nm</sub> 0,4-0,6) a fost dispersată pe plăci cu mediu Brain Heart Infusion (BHI). După uscarea plăcilor 10μl de cultură de bacterii lactice cu densitatea de D.O.<sub>600nm</sub> 0,8 au fost adăugată în spot. Plăcile au fost incubate timp de 24 h la 37°C. În cazul tulpinilor de drojdii, 10μl de cultură de bacterii lactice au fost adăugați în spot pe plăci cu MRS, iar plăcile au fost incubate timp de 48 h la 37°C. După incubare, pe suprafața plăcilor s-au adăugat 3 ml de mediu Yeast Peptone Glucose (YPG) semisolid (0,7% agar) în care au fost încorporați 100 μl suspensie microbiană patogenă (DO<sub>660nm</sub> 0,4-0,6). Plăcile au fost incubate 24-48 h la 37°C. După incubare, tulpinile de bacterii lactice cu acțiune antimicrobiană au prezentat o zonă clară în jurul coloniei ca urmare a inhibării creșterii microorganismului patogen.

### Determinarea naturii compușilor cu acțiune antimicrobiană

Tulpinile de bacterii lactice care au prezentat acțiune microbicidă au fost cultivate în mediu MRS lichid timp de 18 h la 37°C. După dezvoltare, culturile au fost centrifugate 10 min. la 10.000 rpm, iar supernatantul a fost ajustat la pH 6,5 cu NaOH 40% (pentru a inactiva acțiunea antimicrobiană a acizilor organici) și apoi retestat față de tulpinile patogene prin metoda difuzimetrică.

Tulpinile de bacterii lactice care au prezentat acțiune antimicrobiană după ajustarea valorilor de pH au fost selectate pentru determinarea naturii proteice a compușilor cu acțiune antimicrobiană. Astfel, supernatantul obținut prin centrifugarea culturilor de bacterii lactice timp de 10 min. la 10.000 rpm (pH 6.5) a fost incubat în prezența proteinazei K (concentrație finală 1mg/ml) timp de 2 h la 37°C și apoi retestat prin metoda difuzimetrică, utilizând diferite tulpini indicator.

### Izolarea, purificarea și caracterizarea bacteriocinelor

Pentru izolarea bacteriocinelor, 50 ml MRS lichid a fost inoculat cu 100 μl cultură proaspătă de

tulpină producătoare de bacteriocine și incubat timp de 12 h la 37°C. Cultura obținută a fost centrifugată timp de 30 de minute, 11.000 rpm la 4°C, iar supernatantul a fost ajustat la pH 6,5. Peste supernatant s-a adăugat treptat 12 g sulfat de amoniu și s-a incubat timp de 24 h la 4°C cu agitare ușoară. În urma centrifugării, timp de 30 de minute la 11.000 rpm și 4°C la suprafața supernatantului se formează o peliculă care a fost colectată și dizolvată într-un ml tampon fosfat pH 6,5. Stocarea bacteriocinelor s-a realizat la -20°C până la utilizarea în experimentele ulterioare.

### Determinarea activității bacteriocinelor prin metoda difuzimetrică adaptată

Activitatea antimicrobiană a supernatantului și a bacteriocinei izolate s-a realizat prin efectuarea de diluții seriale binare (1/2) în tampon fosfat pH 6,5. 10μl din fiecare diluție au fost distribuiți în spot pe suprafața plăcilor, conținând tulpina indicator *Enterococcus (E.) faecium* CMGB 6. Ultima diluție până la care se observă inhibiția creșterii culturii indicator (zonă clară) va fi luată în calcul.

Activitatea antimicrobiană se calculează după formula:  $(AU/ml) = 2^n \times 100$ , unde n este ultima diluție la care apare zonă clară.

### Determinarea stabilității bacteriocinei la diferite valori de pH și temperatură

Pentru determinarea activității bacteriocinei la diferite valori de pH și de temperatură s-a realizat incubarea bacteriocinei parțial purificată la valori de pH 3,0, 7,0 și 9,0, timp de 20, 30 și 60 de minute la 60°C și respectiv 100°C. După incubare s-au realizat diluții seriale binare, iar câte 10 μl probă au fost adăugați pe plăcile însămânțate cu tulpina sensibilă *E. faecium* CMGB 6.

## REZULTATE ȘI DISCUȚII

### Determinarea activității antimicrobiene a bacteriilor lactice față de tulpinile patogene

În urma determinării activității antimicrobiene, s-a constatat că majoritatea tulpinilor de bacterii lactice au prezentat acțiune antimicrobiană față de tulpinile patogene analizate, în special față de tulpinile Gram pozitive, *M. luteus* CMGB 6 și *S. xylosus* CMGB 32, cu excepția tulpinii *Str. agalactiae* CMGB 21 (Tabelul 1).

Doar un număr redus de bacterii lactice a fost inhibat de tulpinile patogene, un motiv în plus pentru utilizarea acestora în refacerea microbiotei intestinale (Tabelul 1).

Rezultatele obținute au permis selecția a 142 de tulpini de bacterii lactice cu activitate antimicrobiană. Acestea au fost selectate în vederea determinării naturii compușilor cu acțiune antimicrobiană, constatându-se că majoritatea tulpinilor de bacterii lactice nu au mai prezentat acțiune antimicrobiană după ajustarea valorilor de pH (în cazul acestor tulpini, activitatea antimicrobiană fiind datorată eliberării acizilor organici), cu excepția a două tulpini *Lc. lactis* F2a și *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* JR. După tratamentul cu proteinază, supernatantul produs de cele două tulpini și-a pierdut activitatea; astfel, pentru cele două tulpini activitatea a putut fi corelată cu producerea de bacteriocine.

### Determinarea activității și a spectrului de acțiune a bacteriocinelor

Pentru determinarea activității antimicrobiene (UA/ml) a bacteriocinelor sintetizate de cele două tulpini de bacterii lactice în prima etapă s-a realizat izolarea și purificarea parțială a bacteriocinelor (11).

Activitatea antimicrobiană a fost cuantificată prin realizarea de diluții binare (1:2/v:v) și testarea

**TABELUL 1.** Activitatea antimicrobiană a bacteriilor lactice

Tulpini patogene	Numărul tulpinilor de bacterii lactice			
	Activitate antimicrobiană ridicată	Activitate antimicrobiană redusă	Nedezvoltate în prezența patogenului	Fără activitate antimicrobiană
<i>E. coli</i> CMGB 11	107	7	5	34
<i>Str. agalactiae</i> CMGB 21	57	42	10	44
<i>M. luteus</i> CMGB 6	131	7	5	10
<i>S. xylosus</i> CMGB 32	138	4	3	8
<i>C. albicans</i> CMGB 13	93	3	11	46
<i>C. krusei</i> CMGB 8	78	5	0	70

prin metodă difuzimetrică, folosind ca tulpină indicator tulpina *E. faecium* GM6. A fost luată în calcul ultima diluție care determină apariția zonei de inhibiție (zonă clară), iar activitatea a fost cuantificată în unități arbitrare raportate la mililitru (AU/ml).

S-a constatat faptul că bacteriocina sintetizată de tulpina *Lc. lactis* F2a prezintă o activitate de 51.200 UA/ml, mult mai ridicată comparativ cu bacteriocina sintetizată de tulpina *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* JR, care are o activitate de 400 UA/ml.

**TABELUL 2.** Spectrul de inhibiție al bacteriocinelor

Tulpini indicator	Bacteriocine	
	<i>Lc. lactis</i> F2a	<i>Lb. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> JR
<i>E. coli</i> CMGB 14	+/-	-
<i>E. coli</i> CMGB 22	-	-
<i>E. coli</i> CMGB 31	-	-
<i>K. oxytoca</i> CMGB 27	+	-
<i>Ent. aerogenes</i> CMGB 35	+	-
<i>M. luteus</i> CMGB 6	+	-
<i>M. luteus</i> CMGB 9	+	-
<i>M. luteus</i> CMGB 12	+	-
<i>M. luteus</i> CMGB 25	+	-
<i>E. faecalis</i> CMGB 20	+	-
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	+/-	-
<i>S. xyloso</i> CMGB 32	+	-
<i>Str. agalactiae</i> CMGB 21	-	-

+: cu activitate; -: fără activitate; +/-: activitate redusă

Așa cum se observă în Tabelul 2, bacteriocina produsă de tulpina *Lc. lactis* F2a a prezentat un spectru larg de activitate comparativ cu bacteriocina biosintetizată de tulpina *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* JR. Tulpinile Gram pozitive au prezentat o sensibilitate mai crescută la acțiunea bacteriocinei produse de tulpina *Lc. lactis* F2a, comparativ cu tulpinile Gram negative (Tabelul 2).

### Determinarea stabilității bacteriocinei

Utilizarea industrială a bacteriocinelor în calitate de conservanți alimentari implică testarea acestora

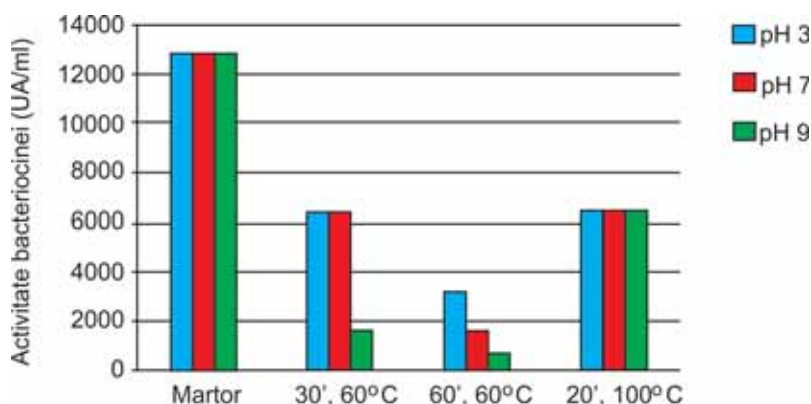
în vederea determinării stabilității lor la diferite valori de pH și temperatură. Datorită activității ridicate, bacteriocina sintetizată de tulpina *Lc. lactis* F2a a fost analizată din punct de vedere al stabilității la diferite valori de pH și temperatură.

Stabilitatea bacteriocinei parțial purificate s-a realizat prin incubarea acesteia la diferite valori de pH (3.0, 7.0 și, respectiv, 9.0, timp de 30 și, respectiv, 60 de minute la 60°C și 20 de minute la 100°C). După incubare, au fost realizate diluții binare și s-a retestat activitatea acesteia față de tulpina sensibilă *E. faecium* GM6.

În urma analizării stabilității bacteriocinei (Fig. 1), s-a constatat că activitatea antimicrobiană a acesteia este dependentă de pH, timpul de incubare și temperatură. O stabilitate mai ridicată s-a evidențiat la un timp de incubare mai scurt și la valoarea de pH 3.0. Pierderea stabilității cea mai ridicată, cu peste 87,5% a avut loc în cazul incubării la pH 9.0 și 60°C, timp de 60 de minute. În concluzie, expunerea la un șoc termic prelungit, chiar la temperaturi mai scăzute, determină o reducere drastică a activității bacteriocinei produse de tulpina *Lc. lactis* F2a (Fig. 1).

### CONCLUZII

În urma testării activității antimicrobiene a bacteriilor lactice asupra tulpinilor patogene selectate, s-a constatat că majoritatea bacteriilor lactice analizate au prezentat o activitate antimicrobiană ridicată atât față de tulpini bacteriene, cât și față de tulpini de drojdii patogene. Activitatea antimicrobiană a bacteriilor lactice a fost corelată în special cu producerea de acizi organici și, în cazul a două tulpini (*Lc. lactis* F2a și *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* JR), aceasta a fost corelată cu biosinteza de bacteriocine. Bacteriocina produsă de tulpina *Lc. lactis* F2a a prezentat un spectru larg de acțiune (prezentând atât activitate față de tulpini Gram pozitive, cât și față de tulpini Gram negative) și o activitate ridicată (51.200 UA/ml), comparativ cu



**FIGURA 1.** Determinarea stabilității bacteriocinei izolată de la tulpina *Lc. lactis* F2a

bacteriocina izolată de la tulpină *Lb. paracasei* ssp. *paracasei* JR (400 UA/ml). În ceea ce privește stabilitatea bacteriocinei produse de tulpina *Lc. lactis* F2a, aceasta este mai stabilă la pH acid decât la pH bazic, expunerea în timp la o temperatură ridicată determinând o scădere drastică a activității bacteriocinei.

### **Mulțumiri**

Acest studiu a fost finanțat din două proiecte: POSDRU/159/1.5/S/133391, Proiect cofinanțat din

Fondul Social European prin Programul Operațional Sectorial pentru Dezvoltarea Resurselor Umane 2007-2013. Titlul proiectului: „Programe doctorale și post-doctorale de excelență pentru formarea de resurse umane înalt calificate pentru cercetare în domeniile Științele Vieții, Mediului și Pământului” și proiectul PCCA tip 1 PN-II-PT-PCCA-2011-3. 1-0621 finanțat de Unitatea Executivă pentru Finanțarea Învățământului Superior, a Cercetării Dezvoltării și Inovării.

### **BIBLIOGRAFIE**

1. Harish K., Varghese T. Probiotics in humans – evidence based review. *Calicut Med J*, 2006, (4): e3.
2. Thomas C.M., Versalovic J., Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine, *Gut Microbes*, 2010, (3):148-163.
3. Yan F., Polk D.B., Probiotics: progress toward novel therapies for intestinal diseases, *Curr Opin Gastroenterol*. 2010, (26):95-101.
4. Sang L.X., Chang B., Zhang W.L., Wu X.M., Li X.H., Jiang M., Remission induction and maintenance effect of probiotics on ulcerative colitis: a meta-analysis, *World J Gastroenterol* 2010, (16):1908-1915.
5. Indrio F., Neu J., The intestinal microbiome of infants and the use of probiotics, *Curr Opin Pediatr*. 2011, (23):145-150.
6. Kim N.Y., Ji G.E., Effects of probiotics on the prevention of atopic dermatitis, *Korean J Pediatr* 2012, (55):193-201.
7. Preidis G.A., Hill C., Guerrant R.L., Ramakrishna B.S., Tannock G.W., Versalovic J., Probiotics, enteric and diarrheal diseases, and global health, *Gastroenterology* 2011, (140):8-14.
8. Zamfir M., Grosu-Tudor S. Probiotic potential of some lactic acid bacteria isolated from Romanian fermented vegetables. *Annals of RSCB* 2012, XVIII(1):234-239
9. Rusu E., Cojocaru M., Cristescu C., Avram I., Pelinescu D., Assessment of antimicrobial effect of certain lactic acid bacteria species. *Revista română de boli infecțioase*, 2015, (18):20-23.
10. Delves-Broughton J., Blackburn P., Evans R.J., Hugenholtz J. Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*.1996, (69):193-202.
11. De Vuyst L., Vandamme E.J. Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Microbial Genetics and Application*, Ed. Blackie Academic and Professional 1994: 91-503.