
DETERMINATION OF DEKARBOXYLASE ACTIVITY THE SELECTED BACTERIA HAZARRDOUS

Rejchrtová E., Sládková P., Komprda T., Zorníková G.

Department of Food Technology, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno,
Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

E-mail: xpetirov@node.mendelu.cz

ABSTRACT

Biogenic amines (BA) are low-molecular nitrogenous bases formed in foods and food raw materials by decarboxylation of precursor amino acids by the action of bacterial decarboxylases. An ability of lactic acid bacteria (LAB), including genus *Enterococcus* (proved BA producers), to form tyramine and histamine was evaluated in the present experiment. Two methods for testing an ability of the isolates to form tyramine/histamine were used: liquid decarboxylating medium (LDM) and confirmation of BA formation by the HPLC method.

Regarding *Enterococcus* spp., all tested isolates were positive using both methods. As far as LAB are concerned however, only 10.5% of the isolates was identified as positive in LDM, while 41.7% positive isolates was confirmed by the HPLC. In the HPLC-positive isolates, only tyramine was detected, histamine was not present in any of the tested samples. Members of the genus *Enterococcus* were confirmed by the PYRA-test, species identification was consequently performed using the ENCOCCUS-test. Except one sample that was identified as *E. faecium*, all other enterococci isolates were identified as *E. faecalis*.

Key words: dekarboxylase activity, Enterococcus

Acknowledgement: Thank Internal Grant Agency for financial support our projects 234/2101 SP 21 10 181.

ÚVOD

Biogenní aminy (BA) vznikají v potravinách působením bakteriálních enzymů (dekarboxyláz), které odštěpují karboxyl z aminokyselin. Pro vznik BA je třeba tří podmínek: výskyt volných aminokyselin, bakterie vybavené dekarboxylázami a prostředí příznivé pro pomnožení těchto bakterií.

Mezi bakterie vyznačující se dekarboxylázovou aktivitou patří i krom jiných bakterie rodu *Enterococcus* a bakterie mléčného kvašení (BMK). Zástupci bakteriálního rodu *Enterococcus* se vyskytují jako saprofyty a komenzálové trávícího ústrojí. Jsou poměrně rezistentní, přežívají záhřev při 60 °C po dobu 30 min. Jejich výskyt v potravinách nelze dávat do souvislostí s přímou kontaminací fekáliemi, protože enterokoky se nezávisle na fekálním znečištění nacházejí i v životním prostředí (Burdychová a kol.,2007)

Někteří zástupci bakterií mléčného kvašení se přidávají do potravin jako kulturní či startovací mikroflóra nebo jako probiotika. Mnozí příslušníci skupiny BMK jsou často uváděny jako významní producenti biogenních aminů, včetně tyraminu a histaminu (Del Prete a kol.,2009).

MATERIÁL A METODIKA

V experimentu byly použity mikroorganismy (MO) získané při mikrobiologických rozborech sýrů zrajících pod mazem, které byly odebrány v různých fázích výroby. Kromě dalších MO jenž byly stanoveny, byly na selektivním mediu Slanetz-Bartley (NOACK, Francie) se suplementem TTC, který zajišťuje selektivitu media, stanoveny také počty bakterií rodu *Enterococcus* a na půdě MRS (NOACK, Francie) BMK vyznačující se dekarboxylázovou aktivitou.

Stanovení dekarboxylázové aktivity probíhalo nejprve pomocí tzv. Dekarboxylačního media (Tab.1). Před vlastní analýzou pomocí media jsme vzorky enterokoků přeočkovali na živnou půdu Plate count agat (PCA), aby výsledek nebyl ovlivněn červenou barvou kolonií. Dekarboxylační medium (Tab.1) se kromě aminokyselin (AMK) navázilo a doplnilo destilovanou vodou. Po vysterilizování byly přidány AMK rozpuštěné v HCl (M 0,1) na závěr bylo upraveno pH na hodnotu 5,3 čímž bylo vytvořeno vhodné prostředí pro mikroorganismy. Mezi toxikologicky nejvýznamnější biogenní aminy patří tyramin a histamin (Bover-Cid et al., 2000), proto byly do dekarboxylačního media přidány AMK tyrozin, histidin, z kterých dané BA vznikají. Médium bylo rozpipetováno do sterilních zkumavek a po přidání vzorků MO bylo inkubováno airobně při 37 °C 5 dní v případě enterokoku a při 30 °C 5 dní v anairobním prostředí v případě BMK. Pozitivní výsledek se projevil změnou barvy media po odezvě změnu pH. Změna pH je závislé na vzniku více alkalických BA vytvořených z aminokyselin.

Tab.1: Složení dekarboxylačního media (Bower-Cid S. et al.,1999)

Dekarboxylační médium	
Složení	1l
Kryptone	5 g
Kvasničný extrakt	5 g
Masový extrakt	5 g
NaCl	2,5 g
Glukoza	0,5 g
Tween 80	1 g
MgSO ₄	0,2 g
Mn SO ₄	0,05 g
Fe SO ₄	0,04 g
citrát amoný	2 g
Thiamin	0,01 g
K ₂ PO ₄	2 g
Ca CO ₃	0,1 g
Pyrodoxal-5- fosfát	0,05 g
Bromcresol pyrole	0,06 g
pH	5,3
aminikyseliny	10 g

Výsledky z měření pomocí dekarboxylačního media nejsou zcela stoprocentní, protože v některých případech může docházet i k barevným reakcím bez současného vzniku biogenních aminů způsobené např. produkcí metabolitů alkalické povahy.

Proto byly výsledky v rámci experimentu prověřeny kontrolním měřením pomocí kapalinového chromatografu (HPLC). Z dekarboxylačního media (BOVER-CID, HOLZAPFEL,1999) bylo po kultivaci odebráno 0,5 ml vzorku, smícháno s 0,5 ml 0,1 M HCl, centrifugováno. Před HPLC analýzou proběhla derivatizace vzorku. Do vialky (8 ml) bylo přidáno 0,5 ml nasyceného Na₂CO₃ a 1 ml derivatizačního činidla dansylchloridu (5-dimethylaminoheptan-sulfonil chlorid, DCL), směs byla promíchána 1 minutu (MS2 Minishaker IKA, IKA Werme GmbH, Staufen, Německo). Derivatizace probíhala 1 hodinu při 40 °C. Po té došlo k přidání 0,250 ml roztoku NH₃ a k promíchání vzniklé suspenze. NH₃ zreagoval se zbytkem dansylchloridu, hydrofobní deriváty aminů byly pak následně extrahovány 3 krát 1 ml diethyletheru. Organická fáze byla odpařena dosucha dusíkem a vzniklý odparek byl rozpuštěn v 1 ml acetonitrilu (ACN). Roztok byl zfiltrován přes nylonový membranový filtr 0,45 um a nastříknut na chromatografickou kolonu. BA obsažené ve vzorku byly separovány pomocí kapalinového chromatografu HP 1100 (Agilent Technologies, Wilmington, USA) s použitím fotometrického UV/VIS detektoru při 245 nm.

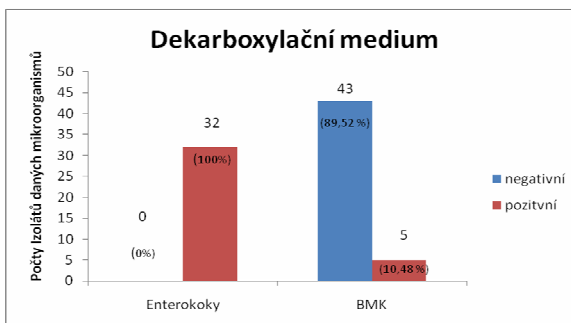
Získané mikrobiální kultury enterokoků byly prověřeny pomocí PYRAtestu (Pliva-Lachema Diagnostika, ČR), jenž je určen pro rychlou detekci aktivity pyrrolidonylarylamidázy, sloužící pro potvrzení příslušnosti k rodu *Enterococcus*, tedy k rodivé identifikaci enterokoků.

V rámci experimentu byla provedena ještě druhová identifikace a to pomocí EN-COCCTest (Pliva-Lachema Diagnostika, ČR). Souprava umožňuje provést identifikaci 36 druhů pomocí 8 biochemických testů, na základě jejichž změny barvy a pomocí diferenční tabulky proběhne vyhodnocení. Z 24 hodinové kultury byla vytvořena bakteriální suspenze z našich izolátů, ta byla v množství 0,1 ml umístěna do mikrotitračních destiček do 8 jamek, které obsahovali již zmíněné biochemické testy, inkubace proběhla 24 hodin při 37 °C.

VÝSLEDKY A DISKUZE

Při našem experimentu se nám podařilo zjistit, že všechny izoláty enterokoků získané ze sýrů zrajících pod mazem vykazovaly dekarboxylázovou aktivitu (Obr.1). Ercoskun a kol., 2010 označili rod *Enterococcus* jako významného producenta biogenních aminů, což se nám v rámci našeho experimentu potvrdilo. Kromě toho v současné době nabývá jeho význam z medicínského hlediska jako původce mnohých infekcí a to hlavně u pacientů s oslabenou imunitou (Kayser, 2003). Některé druhy jsou však v potravinářství používány jako součást probiotických kultur, nebo se vyznačují produkcí bakteriocinů (Kelein, 2003).

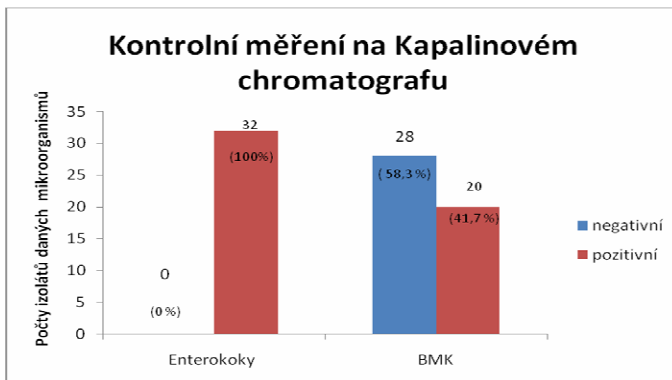
Obr.1 Výsledky měření dekarboxylázové aktivity pomocí dekarboxylačního media



Počty Izolátů daných Mikroorganismů (MO) byly získané při mikrobiologických rozbořech sýrů zrajících pod mazem, které byly odebrány v různých fázích výroby, dané MO byly kultivovány na selektivních mediích, následně byly přečištěny přes jednu kolonii a použity pro stanovení dekarboxylázové aktivity. **Negativní vzorek**- nebyla prokázána dekarboxylázová aktivita, **pozitivní vzorek** - byla prokázána dekarboxylázová aktivita.

V rámci BMK bylo ze 48 vzorků po stanovení v dekarboxylačním mediu jako dekarboxyláza-positivních označeno 5 izolátů (Obr.1). Zbytek vzorků byl posouzen jako negativní. Mnozí příslušníci skupiny BMK jsou často uváděni jako významní producenti biogenních aminů, včetně tyraminu a histaminu (Del Prete a kol.,2009). V našem souboru izolátů BMK bylo jako dekarboxyláza-positivní označeno pouze 10,48 %. Jako kontrolní měření bylo použito stanovení BA v dekarboxylačním mediu pomocí kapalinového chromatografu HP 1100 (Obr.2).

Obr.2 Výsledky měření dekarboxylázové aktivity pomocí dekarboxylačního media prověřeného HPLC



Počty Izolátů daných Mikroorganismů (MO) byly získané při mikrobiologických rozbořech sýrů zrajících pod mazem, které byly odebrány v různých fázích výroby, dané MO byly kultivovány na selektivních médiích, následně byly přečištěny přes jednu kolonii a použity pro stanovení dekarboxylázové aktivity. **Negativní vzorek**- nebyla prokázána dekarboxylázová aktivita, **pozitivní vzorek** - byla prokázána dekarboxylázová aktivita.

V případě bakterií rodu *Enterococcus* se potvrdily naše poznatky získané dekarboxylačním médiem, kde veškeré vzorky byly pozitivní. Ve všech analyzovaných vzorcích byla zjištěna přítomnost tyraminu, histamin však nebyl detekován ani v jednom ze stanovovaných vzorků.

U výsledků zjištěných pomocí HPLC u BMK bylo procento pozitivních vzorků (detekce histamin/tyramin) výrazně vyšší, což poukazuje na nespolehlivost dekarboxylačního media a opodstatňuje i naše kontrolní měření. Stejně jako u enterokoků tak i u BMK byla stanovena přítomnost tyraminu pomocí HPLC u všech vzorků, histamin opět nebyl detekován ani v jednom ze vzorků.

Při experimentu se u enterokoků, kteří vykazovali dekarboxylázovou aktivitu provedla rodová (PYRAtest) a druhová (EN-COCCUStest) identifikace pomocí biochemických testů. Rodová příslušnost k rodu *Enterococcus* byla potvrzena u všech prověřovaných vzorků. Při druhové identifikaci bylo zjištěno, že kromě jednoho vzorku, který byl diagnostikován jako *Enterococcus faecium*, byly všechny ostatní izoláty na základě EN-COCCUStestu posouzeny jako *Enterococcus faecalis*.

ZÁVĚR

V rámci experimentu se nám podařilo zjistit, že veškeré námi izolované bakterie rodu *Enterococcus*, které byly získány při mikrobiologických rozbořech sýrů zrajících pod mazem vykazovali dekarboxylázovou aktivitu. Výsledky získané objemy metodami (dekarboxylační

medium, HPLC) jež byly použity pro toto konkrétní měření bakterií rodu *Enterococcus* se svými výsledky naprosto shodovaly. Všechny 32 vzorků použitých k danému stanovení bylo pozitivních na tyramin. Histamin nebyl v experimentu zaznamenán ani v jednom ze vzorků.

U BMK jsme v rámci měření na HPLC zjistili vyšší procento pozitivních vzorků než v případě dekarboxylačního media a to z původních 10,48 % na 41,7 %, což poukazuje na nespolehlivost dekarboxylačního media a ukazuje na možnost objevení falešně negativních reakcí a zároveň opodstatňuje i naše kontrolní měření.

Příslušnost k rodu *Enterococcus* byla potvrzena u všech prověřovaných vzorků. Při druhové identifikaci bylo zjištěno, že kromě jednoho vzorku, který byl identifikován jako *Enterococcus faecium*, byly všechny ostatní izoláty posouzeny EN-COCCUstem jako *Enterococcus faecalis*.

V návaznosti na výše uvedené výsledky probíhá v současnosti detekce specifických genu (tyrosindekarboxylázy, histidindekarboxylázy). Pro identifikaci genů se využívá polymerázové řetězové reakce (PCR) se specifickými primery pro sledování genů *tyrdc* (tyrosindekarboxyláza) a *hdc* (histidindekarboxyláza) (Coton et al., 2005).

LITERATURA

- Bover-Cid S., Hoizapfel W. H. (1999): Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Food Microbiology*: 33-41.
- Bover-cid, S., Huga, M., Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C. (2000): Amino-acid decarboxylase activity of bacteria isolates from fermented pork sausages. *International J. Food Microbiology*, vol. 6, p. 185-189
- Burdychová, R., Sládková, P. (2007): Mikrobiologická analýza potravin. MZLZ v Brně, 218s., ISBN 978-80-7375-116-6
- Coton, E., Foton, M. (2005): Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria. *J. Microbiol. Methods* :63, s 296-304
- Del Prete, V., Constantini, A., Cecchini, F., Mossut, M., Garcia-Moruno, E. (2009): Occurrence of biogenic amines in wines: The role of grapes. *Food Chemistry* 112, s 474- 481.
- Kalač P., Krížek M. (2005): Biogenní aminy a polyaminy v potravinách a jejich vliv na lidské zdraví. *Výživa*: 40-43.
- Kayser, F. H., (2003): Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology*,: 88, s.255-256.
- Kelein, G. (2003): Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology*,: 88, s.123- 131