

Hegyi Ferenc, Perjéssy Judit, Zalán Zsolt

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólium-bromid) kolorimetriás módszer adaptálása *Lactobacillus* törzsek vizsgálatához

A szerzők elérhetősége

Hegyi Ferenc | tudományos munkatárs
hegyi.ferenc@uni-mate.hu | levelező szerző

Perjéssy Judit | tudományos segédmunkatárs
perjessy.judit@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0002-4872-9402>

Zalán Zsolt | tudományos főmunkatárs
zalan.zsolt@uni-mate.hu | <https://orcid.org/0000-0001-8976-3263>

A szerzők munkahelye

MATE ÉTTI Élelmiszertudományi Kutatócsoport
Munkahely címe: 1118 Budapest, Villányi út 29-43.



Összefoglalás

A tejsavbaktériumok és azon belül a *Lactobacillus* törzsek széles körben megtalálhatóak a természetben és az emberi béltraktus mikroflórájának is fontos tagjai. Számos kutatás foglalkozik ezen mikroorganizmusok számunkra előnyös tulajdonságaival, amelyek egyre világosabbá teszik, hogy nélkülük elképzelhetetlen lenne az életünk. Ezért is fontos, hogy minél több információval rendelkezünk ezen nélkülözhetetlen mikroorganizmusokról. Munkánk során egy eredetileg humán sejtek vizsgálatához alkalmas kolorimetriás módszert adaptáltunk és optimalizáltunk az általunk vizsgált tesztmikroorganizmusok enzimaktivitásának méréséhez. Az irodalomban közölt módszer módosításával, paramétereinek beállításával egy gyors eljárást kaptunk, amelynek segítségével kevesebb mint négy óra alatt közvetlenül kimutatható a baktérium sejtek enzimaktivitása és közvetve azok sejt száma is. Az adaptáció során megállapítottuk az optimális paramétereket (baktériumsejt koncentrációt, MTT koncentrációt, inkubációs időt, pH hatást), amelyek esetén szoros korreláció áll fenn a sejt szám és a keletkezett formazán koncentráció között. Méréseink során azt tapasztaltuk, hogy a *Lactobacillus* törzsek enzimaktivitását nagymértékben befolyásolja azok pillanatnyi szaporodási fázisa, a táptalaj minősége, továbbá a törzsek között is jelentős különbség figyelhető meg.

Kulcsszavak: MTT, *Lactobacillus*, enzimaktivitás, kolorimetria

Bevezetés

A tejsavbaktériumok és köztük a *Lactobacillus*-ok évezredek óta közeli kapcsolatban állnak az emberrel, amely nem annyira meglepő, mivel ezek a mikroorganizmusok a környezetünkben számos helyen megtalálhatóak, mint például a növények felszínén, a

talajban és még az emberi béltraktusnak is szerves részét képezik, amelyek így nagymértékben hozzájárulnak az egészséges immunrendszer fenntartásához és az emésztési folyamatokat is segítik. A *Lactobacillus*-ok jótékony hatásukat az anyagcseréjük során termelt elsődleges és másodlagos anyagcseretermékeik segítségével fejtik ki. Már időszámításunk előtti korszakokban kihasználta az

ember ezeket az előnyös tulajdonságokat, zöldség, hús és tej fermentációjára is, így hosszabbítva meg az élelmiszereik eltarthatóságát. Az élelmiszerek tartósításán túl élvezeti értéküket és emészthetőségüket is nagymértékben növelik e mikroorganizmusok. Mindezen áldásos tevékenységükön felül, a napi rendszerességgel megfelelő mennyiségben fogyasztott, laktobacillust tartalmazó, úgynevezett probiotikus élelmiszerek bizonyítottan javítják az immunrendszerünk működését, illetve számos betegség kialakulásának kockázatát csökkentik.

„Nincs a baktériumoknak még egy olyan csoportja, amely az emberrel olyan sokoldalú viszonyban állna, mint a tejsavbaktériumok. Ezért fontos és szükséges őket jobban megismerni” (Deák, 2005).

Számos ma is használt mikrobiológiai vizsgálati módszer több mint száz éve alakult ki. Világszerte a vizsgálatok millióit végzik évente ezekkel a hagyományos tenyésztési módszerekkel annak ellenére, hogy idő- munka- és anyagigényesek, az eredmény gyakran csak több napos vizsgálatssorozat után értékelhető (Deák, 2006a; Deák, 2006b). A mikrobiológiai vizsgálati módszerek továbbfejlesztéseinek céljai, hogy gyorsabban, több mintából, kevesebb élő munkával, olcsóbban és mégis informatívabban jussunk eredményekhez.

MTT kolorimetriás módszer

A 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólium-bromidot (MTT) 1957-után szintetizálták és kezdték el tanulmányozni (Altman, 1976). A mérőoldékot a Mosmann (1983) által leírt módszer jelentette az MTT alapú eljárások tekintetében. Mosmann eredetileg emlős sejtek aktivitásának, növekedésének és túlélésének tanulmányozására fejlesztette ki az MTT kolorimetriás módszert (Mosmann, 1983), a későbbiekben számos publikáció jelent meg, amely Mosmann modelljét alapul véve kisebb-nagyobb módosításokkal átalakítva kiterjesztette alkalmazhatóságát (Gerlier & Thomasset, 1986; Scudiere et al., 1988). A továbbfejlesztett módszereket sikeresen alkalmazzák az immunológiában, toxikológiában, a sejtszociológiában különböző emlőssejtek, köztük daganatos sejtek, életképességének, növekedésének és vegyszerérzékenységének (Carmichael et al., 1987; Twentyman & Luscombe, 1987; Alley et al., 1988; Campling et al., 1991; Berridge & Tan, 1993; Liu et al., 1997; Takahashi et al., 2001), valamint a mikrobiológiában számos mikroorganizmus, baktérium, élesztő- és penészgomba szaporodásának, életképességének, antibiotikum rezisztenciájának vizsgálatára is (Peck, 1985; Stowe et al., 1995; Abate et al., 1998; Freimoser et al., 1999; Dias et al., 1999; Stentelaire et al., 2001; Gabrielson et al., 2002; Saravanan et al., 2003; Wang et

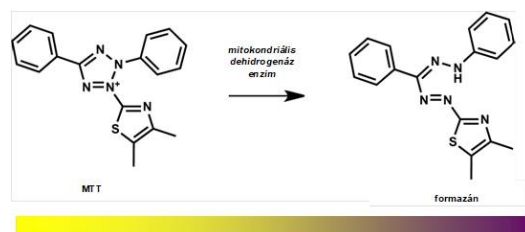
al., 2007; Wang et al., 2010; Wadhawan et al., 2010).

Az MTT és általában a tetrazólium sók redukcióján alapuló kolorimetriás módszerek legnagyobb előnye az egyszerűségükben és a gyorsaságukban rejlik. Azonban ahhoz, hogy a lényegesen több munkát, időt és vegyszert igénylő hagyományos módszerek alternatívájaként szolgáljanak, számos paraméter pontos meghatározása és beállítása szükséges. A módszer az élő sejtek azon tulajdonságán alapszik, miszerint képesek a vízoldható tetrazólium sötét vízoldhatatlan formazánná alakítani (Twentyman & Luscombe, 1987) és az így keletkezett formazán mennyisége spektrofotometriás úton meghatározható, amiből az élő sejtek számára következtethetünk (Mosmann, 1983; Peck, 1985; Denizot & Lang, 1986). Ezek a megállapítások emlős és bakteriális eredetű sejtekre egyaránt igazak (Abate et al., 1998). Az MTT esetében a sárga színű, vízben jól oldódó tetrazólium sötét redukálják a sejtek vízben oldhatatlan lila formazán kristályokká (Plumb et al., 1989).

Az MTT próbát annak ellenére, hogy széles körben alkalmazzák sejtéletképesség és sejt szaporodás mérésére, a redukció mechanizmusa és a felelős enzimek pontos elhelyezkedése nem teljesen ismert (Collier & Pritsos, 2003). Egy korai tanulmányban Slater és munkatársai 1963-ban megállapították, hogy a szukcinát függő MTT redukciója a patkány máj sejtek mitokondriumában megy végbe. Későbbi tanulmányok bebizonyították, hogy a szukcinát dehidrogenáz függő MTT redukció mellett NADH és NADPH függő formazán termelés is történik, amely a mitokondriumon kívül a belső membránban megy végbe (Berridge & Tan, 1993). További tanulmányok eredményei is megkérdőjelezték a mitokondrium kizárólagos szerepét az MTT redukciójában (Liu et al., 1997), illetve bebizonyították azt is, hogy sok más, nem mitokondriális dehidrogenáz enzim és flavin oxidáz is képes redukálni az MTT-t. Számos eredmény található az irodalomban arra is, hogy az MTT redukciója élő sejtek jelenléte nélkül, különböző flavonoidok, magnézium oxid vagy akár porózus szilícium (PSi) mikrorészecskék hatására is spontán végbemehet, amely így hamis pozitív jelet eredményezhet (Peng et al., 2005; Laaksonen et al., 2007; Talorete et al., 2007; Fischer et al., 2010).

Az MTT vizsgálati módszer két fő részre, a redukciós és az oldódási folyamatra osztható fel. A redukciós folyamat pontos megértése és az esetleges hamis pozitív vagy negatív jelet produkáló tényezők kiküszöbölése mellett a keletkezett formazán kristályok hatékony feloldása is elengedhetetlen a pontos eredmény elérése érdekében. Oldódás szempontjából a tetrazólium sókból keletkezett formazán kristályok lehetnek vízben, illetve vízben nem, csak valamilyen szerves oldószerben oldhatóak. A vízoldható formazánok esetében az oldási folyamat nem igényel

külön lépést, mivel a kristályok a sejtek szaporodását biztosító táptalajban intenzív színreakció mellett feloldódnak. A vízben oldhatatlan formazán kristályt képző tetrazólium sók esetében, amilyen az MTT is, azonban az oldószer kiválasztása is fontos lépés. Az MTT redukálódásának folyamatát az **1. ábra** szemlélteti.



1. ábra: Az MTT redukálódása formazánná

Munkánk során célul tűztük ki, hogy az MTT kolorimetriás módszert – amely azon alapul hogy az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzimje az MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil terazólium-bromid) tetrazólium gyűrűjét vízben oldhatatlan színes formazánná alakítja, így annak mennyisége jól korrelálva az élő sejtek számával, kolorimetriásan meghatározható – alkalmassá tesszük ezen mikroorganizmusok gyors és egyszerű vizsgálatához.

Anyagok és módszerek

Tesztmikroorganizmusok

A vizsgálatainkhoz a következő *Lactobacillus* törzseket alkalmaztuk: *Lactobacillus plantarum* 2142 (Perugia-i Egyetem Mezőgazdasági Tanszék, Tejipari Intézet, Olaszország), *Lactobacillus rhamnosus* VTI (Kémiai Technológiai Intézet, Tej és Zsíritechnológiai Tanszék Prága, Csehország), *Lactobacillus casei* Shirota (Utrecht-i Egyetem, Állatorvosi Kar, Hollandia), *Lactobacillus sakei* (Perugia-i Egyetem Mezőgazdasági Tanszék, Tejipari Intézet, Olaszország).

Táptalajok

A tesztmikroorganizmusok felszaporítására MRS (de Man, Ragosa, Sharpe) táplevest (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) és MRS (de Man, Ragosa, Sharpe) agart (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) alkalmaztunk. Természetes tápközegként csicsóka táplevet alkalmaztunk (Csicsókapor (Dr. Fitokup Kft, Budapest) 100 g + desztillált víz 900 ml).

MTT kolorimetriás módszer

A felszaporított tejsavbaktérium lecentrifugálását követően eltávolítottuk az MRS táplevest a sejtekről, majd 10^8 - 10^9 sejt/ml-re állítottuk be a sejtkoncentrációt fiziológiás sóoldat segítségével. A beállított sejtszámot

mikrotiterlemez-leolvasó segítségével 630 nm-en ellenőriztük. A megfelelő sejtszám esetén 1 ml-t pipettáztunk a mintából egy 2 ml-es Eppendorf csöbe, majd hozzáadtunk a vizsgálni kívánt gátlóanyagból 100 μ l-t, illetve 100 μ l előzőleg elkészített 8 - 9 mg/ml koncentrációjú MTT-t. A tetrazólium-bromidot foszfát puffereelt sóoldatban (pH 7,2) oldottuk fel majd 0,2 μ m-es fecskendőszűrőn átszűrtük. Az összemért mintákból minden esetben 3 párhuzamost készítettünk, amelyeket 37 °C-os inkubátorba helyeztünk 2 órára. Az inkubációs idő elteltét követően a csöveket 9000 g-n lecentrifugáltuk, majd a felülúszót elöntöttük. A visszamaradt formazán kristályokat 1 ml DMSO hozzáadásával és 400 fordulat/perces rázatással szobahőmérsékleten 10 perc alatt oldottuk fel. Az így kapott oldat színintenzitását spektrofotométer segítségével mértük 595 nm-en. Egyes méréseknél az MTT kolorimetriás módszer miniatürizált, mikrotiterlemezre kidolgozott változatát (mMCA) alkalmaztuk, amely idő, energia és vegyszer megtakarítást tett lehetővé. E módszer annyiban különbözik az előzőekben leírt eljárástól, hogy a mintákat steril 96 lyukú mikrotiterlemezre mértük össze, így a *Lactobacillus* sejteket tartalmazó fiziológiás sóoldatból 200 μ l-re, a gátlóanyagból 20 μ l-re és a feloldott MTT-ből is (8 mg/ml) csak 20 μ l-re, illetve a 2-órás inkubáció elteltével és a felülúszó eltávolítását követően a DMSO-ból is mindössze 200 μ l-re volt szükség, amely a fent leírt módszerhez képest ötöd annyi mennyiségeket jelent.

Eredmények és értékelésük

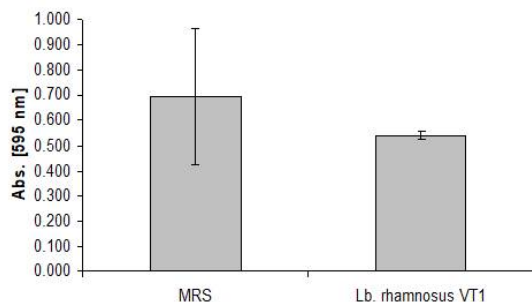
MTT kolorimetriás módszer adaptálása és alkalmazása

Az elsőként Mosmann (1983) által leírt MTT kolorimetriás módszert, amelyet eredetileg emlős sejtek vizsgálatára dolgozott ki, sokan alkalmazták saját kutatásaikhoz különböző módosításokkal. A számos módosítás közül az egyik ilyen a Wang Fang és munkatársai (2007) által leírt MTT módszer, amelyet a *Micrococcus luteus* Gram-pozitív baktérium vizsgálatához fejlesztettek ki. Ezt az eljárást alapul véve kívántuk átalakítani a módszert úgy, hogy a *Lactobacillus* törzseink vizsgálatához alkalmas legyen. A módszer két fontos részre osztható fel, az egyik az élő sejtek dehidrogenáz enzimeit által a tetrazólium-bromidból képzett formazán képződése, a másik pedig a keletkezett, vízben oldhatatlan kristályok feloldása szerves oldószerrel. A keletkezett formazán kristályok mennyisége függ a sejtek számától, illetve azok dehidrogenáz enzimeinek aktivitásától, valamint nagymértékben függ a hozzáadott kezdeti tetrazólium só koncentrációjától. A vízoldhatatlan formazán kristályok maradéktalan feloldása is elengedhetetlen

ahhoz, hogy pontos eredményeket kapjunk. Az MTT-ből keletkezett formazán kristályok oldásához alkalmazott megfelelő oldószerekkel kapcsolatban eltérő eredmények találhatóak az irodalomban. Huamin és munkatársai (2002) szerint az izopropanol a legmegfelelőbb oldószere az MTT-ből keletkezett formazán kristályoknak, azonban az irodalmi adatok nagyobb számban utalnak arra, hogy a legalkalmasabb erre a célra a dimetil-szulfoxid (DMSO), amely maradéktalanul képes feloldani a formazán kristályokat, illetve kellőképpen stabil, színes oldatot eredményez (Carmichael et al., 1987; Twentymán & Luscombe, 1987; Alley et al., 1988; Campling et al., 1991). Vizsgálataink során is azt tapasztaltuk, hogy a törzsek által termelt formazán kristályokat maradéktalanul feloldja a dimetil-szulfoxid, amely 24 óra elteltével is változatlan abszorbanciával rendelkezett. A módszer adaptálásakor tehát fontos a különböző paraméterek, MTT koncentráció, inkubációs idő, sejtkoncentráció pontos meghatározása, valamint a megfelelő oldószer kiválasztása is.

A táptalaj redukáló hatása

Amint azt sokan mások is tapasztalták a tetrazólium sók alkalmazása során igen sok tényező okozhatja azok redukálódását a vizsgálni kívánt élő sejtek dehidrogenáz enzimein kívül (Peng et al., 2005; Laaksonen et al., 2007; Talorete et al., 2007; Fischer et al., 2010). A vizsgálataink során azt tapasztaltuk, hogy a tejsavbaktériumok szaporítására alkalmazott MRS táptalaj igen nagy mértékben képes redukálni a hozzáadott tetrazólium-bromidot mikroorganizmusok jelenléte nélkül, fals pozitív jelet eredményezve. Az MRS táptalaj MTT-t redukáló hatását a **2. ábra** szemlélteti. A hiba kiküszöbölésére a vizsgálatok során minden esetben szükséges az MRS táptalaj maradéktalan eltávolítása a sejtekről az MTT hozzáadása előtt. A **2. ábra** jól szemlélteti, hogy az MRS tápleves élő mikroorganizmusok jelenléte nélkül is képes redukálni az MTT-t. A sejtek szaporítására alkalmazott különféle táptalajok MTT-t redukáló hatásairól korábban számos esetben beszámoltak már (Denizot & Lang, 1986; Dias et al., 1999; Wang H. et al., 2010), ezzel szemben Wang F. és

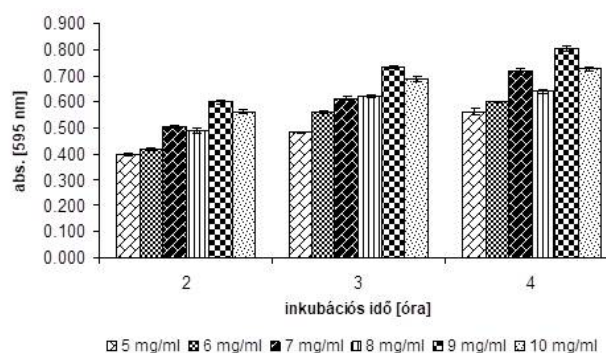


2. ábra: Az MRS-táptalaj redukáló hatása

munkatársai (2007) nem tettek említést a szaporító tápközeg redukáló hatása által okozott problémáról.

Az inkubációs idő és az MTT koncentráció kiválasztása *Lactobacillus* törzsek dehidrogenáz enzimaktivitásának méréséhez

A vizsgálni kívánt sejtektől és mikroorganizmusoktól függően az alkalmazott MTT koncentráció igen tág határok között mozoghat, az irodalmi adatok szerint 1 mg/ml és 10 mg/ml koncentrációk között alkalmazzák (Stowe et al., 1995; Abate et al., 1998; Dias et al., 1999). Leggyakrabban az eredeti módszert alapul véve (Mosmann, 1983), 5 mg/ml koncentrációban alkalmazzák az MTT-t (Wang et al., 2010; Saravanan et al., 2003). Az ideális inkubációs idő megválasztása is fontos, e paraméter is tág határok között mozoghat, pár órától akár 24 óráig is (Abate et al., 1998; Dias et al., 1999; Saravanan et al., 2003; Wang et al., 2007). Az optimális MTT koncentráció és az inkubációs idő meghatározásához *Lactobacillus plantarum* 2142 törzset alkalmaztunk, amelynek sejtszámát $6-7 \cdot 10^8$ sejt/ml koncentrációra állítottunk be. A beállított sejtszámú mintából 1-1 ml-t pipettáztunk 2 ml-es Eppendorf csövekbe, amelyekhez hozzáadtunk 100 μ l ismert koncentrációjú (5, 6, 7, 8, 9, 10 mg/ml) MTT oldatot. Az összemért oldatokat 37 °C-os inkubátorba helyeztük, majd 2, 3 és 4 óra elteltével mértük az abszorbanciát 595 nm-en spektrofotométer segítségével. Az eredményeket az **3. ábra** mutatja be. A 9 mg/ml koncentrációjú MTT esetében kaptuk a legnagyobb jelet mindegyik inkubációs idő esetében. A 10 mg/ml koncentrációjú MTT esetében megfigyelhető jel csökkenés oka az lehet, hogy ebben a koncentrációban az MTT már gátló hatást fejthet ki a tesztmikroorganizmusra (Tengerdy et al., 1967; Stowe et al., 1995). Az inkubációs idő növelésével a keletkezett

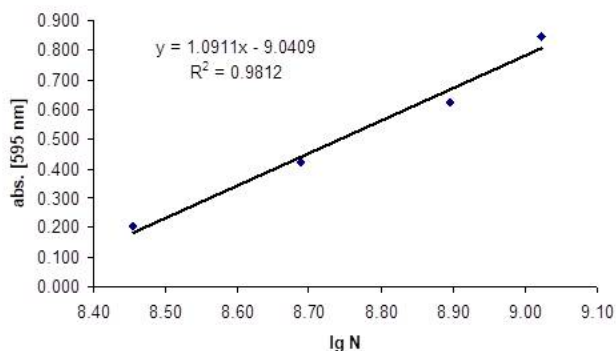


3. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 formazán képzése különböző MTT koncentráció és eltérő inkubációs idő esetén

formazán mennyisége is növekszik. Mivel egy gyorsmódszert létrehozása volt a célunk, a 2 órás inkubációs időt választottuk a további vizsgálatainkhoz.

A legkedvezőbb sejtkoncentráció meghatározása

Az optimális mérési tartomány meghatározásához hígítási sort készítettünk a *Lactobacillus plantarum* 2142 törzsből 10^9 és 10^6 sejt/ml koncentráció között. Ebben az esetben is 1 ml mintához adtunk 100 μ l 9 mg/ml MTT oldatot és 37 °C-os 2 órás inkubációt követően mértük a keletkezett formazán mennyiségét. Az eredményeket a **4. ábra** mutatja, ahol látható, hogy *Lactobacillus plantarum* 2142 esetében, 10^8 – 10^9 sejt/ml koncentráció tartományban lineáris összefüggés tapasztalható a sejtszám és a keletkezett formazán kristályok



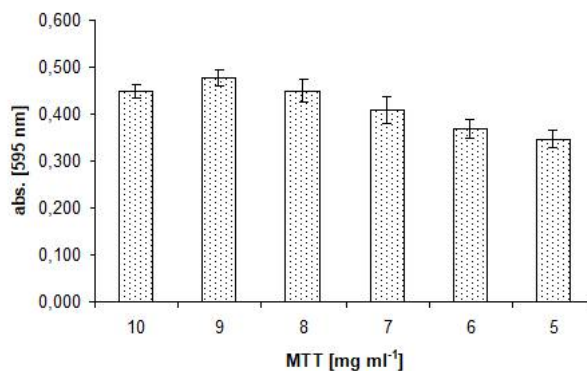
4. ábra: Optimális méréstartomány meghatározása *Lactobacillus plantarum* 2142 esetén

mennyisége között. *Lactobacillus plantarum* 2142 esetén 10^8 sejt/ml sejtkoncentráció alatt nem kaptunk értékelhető jelet.

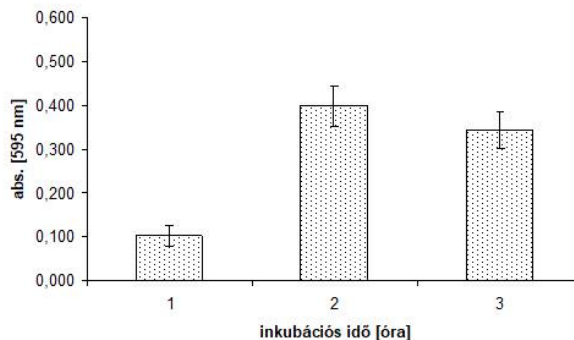
MTT módszer alkalmazása mikrotiter lemezen

Az MTT kolorimetriás módszer mikrotiter lemezen történő alkalmazása számos törzs és paraméter egyidejű vizsgálatát teszi lehetővé, illetve igen lényeges szempont, hogy a kísérletek során kevesebb mennyiségű vegyszer és táptalaj felhasználása szükséges. Azonban ahhoz, hogy a módszer ilyen módon is alkalmazható legyen, ebben az esetben is elengedhetetlen a paraméterek előzetes optimalizálása. Az inkubációs idő és az ideális MTT koncentráció meghatározásához mikrotiter lemezen *Lactobacillus plantarum* 2142 törzset alkalmaztunk $7 \cdot 10^7$ sejt/ml sejtkoncentrációban. A megfelelő MTT koncentráció meghatározásához, foszfát pufferelt sóoldatban feloldva 5, 6, 7, 8, 9 és 10 mg/ml koncentrációjú oldatokat készítettünk. Az abszorbanciát 2 órás 37 °C-os inkubációt követően mértük. A kapott eredményeket a **5. ábra** szemlélteti. A keletkezett formazán mennyisége függ az alkalmazott MTT koncentrációjától. Mivel a 8 és 9 mg/ml koncentráció között nincs szignifikáns különbség 95%-os biztonsági szinten (Minitab 13.1), ezért a további vizsgálatokhoz a 8 mg/ml MTT koncentraciót alkalmaztunk. Az ideális inkubációs idő megállapításához előzőleg optimálisnak talált 8 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot alkalmaztunk $7 \cdot 10^7$ sejt/ml

koncentrációjú *Lactobacillus plantarum* 2142 törzs esetében. A lemezeket 37 °C-os inkubátorba helyeztük 1, 2, illetve 3 órára. A kapott eredményeket a **6. ábra** szemlélteti. A keletkezett formazán mennyisége négyszer nagyobb volt a 2 órás inkubációs idő esetében, mint az 1 órás inkubációt követően, azonban az inkubációs idő tovább növelésével, az Eppendorf csőre kidolgozott módszerrel ellentétben, itt már nem volt elérhető nagyobb formazán mennyiség. Ez az eltérés azzal magyarázható, hogy a mikrotiterlemez módszer esetében lényegesen kisebb a reakcióelegy térfogata, amely így rövidebb idő alatt elérte a



5. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 formazán képzése különböző MTT koncentrációk esetén

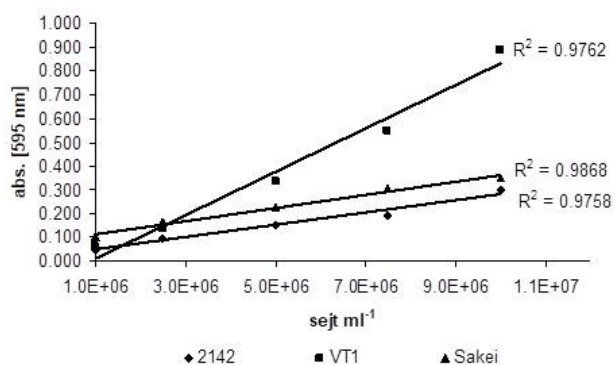


6. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 formazán képzése 8 mg/ml MTT koncentráció és különböző inkubációs idők esetén

reakcióhoz szükséges ideális hőmérsékletet. A további kísérletekhez a 2 órás inkubációs időt és 8 mg/ml koncentrációjú MTT oldatot alkalmaztunk.

MTT redukáló képesség vizsgálata különböző törzsek esetében

Az előzőekben megállapított optimális paramétereket alkalmazva mikrotiter lemezen vizsgáltuk a különböző tejsavbaktérium törzsek enzimaktivitását. Ahogyan azt a **7. ábra** is jól szemlélteti, a különböző *Lactobacillus* törzsek eltérő dehidrogenáz enzim aktivitással rendelkeznek ugyanakkora sejtszám mellett. A legnagyobb mennyiségű formazánt a *Lactobacillus*

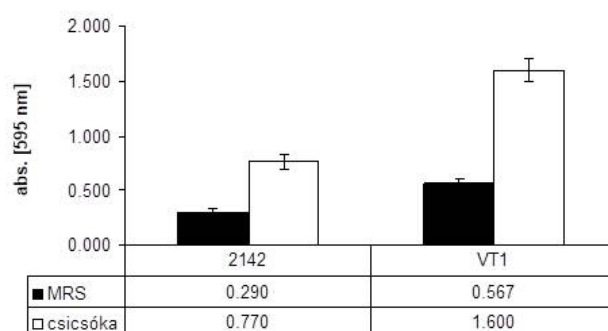


Lactobacillus rhamnosus VT1 képezte a vizsgált törzsek közül, míg a **7. ábra**: Formazán képződés és a sejtszám összefüggése

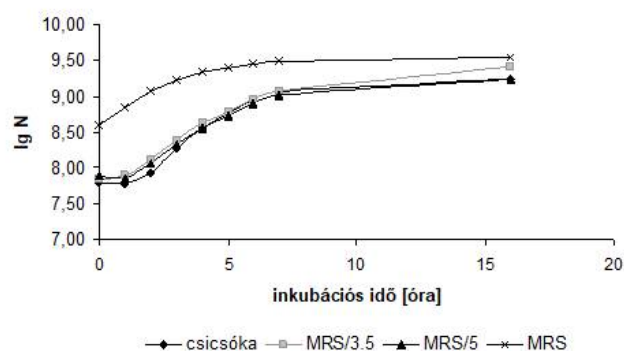
Lactobacillus plantarum 2142 és *Lactobacillus sakei* DSM 20017 közel azonos mennyiséget képeztek.

A táptalaj hatása az enzimaktivitásra

Az előző kísérletekből világossá vált, hogy a különböző tejsavbaktérium törzsek azonos sejtszám mellett eltérő enzimaktivitással rendelkeznek, vagyis adott mennyiségű MTT-ből eltérő mennyiségű formazánt képesek redukálni. A további kísérletekben megvizsgáltuk, hogy miként változik a törzsek enzimaktivitása, ha mesterséges táptalaj helyett természetes csicsóka táptalajon szaporítjuk azokat. A természetes és mesterséges táptalajokat egyaránt 10^5 sejt/ml induló sejtszámmal oltottuk be, amelyeket 30 °C-os inkubátorba helyeztünk. Tizenhét órás inkubációt követően a mintákat lecentrifugáltuk, a felülúszókat eltávolítottuk és a sejtszámokat azonosra állítottuk be fiziológiás sóoldat segítségével. Ezt követően mértük a sejtek dehidrogenáz enzimaktivitását, amelynek eredményét a **8. ábra** mutatja. Az eredmények azt mutatták, hogy ugyanakkora sejtszám mellett különböző táptalajon szaporítva az azonos törzsek esetében is eltérő enzimaktivitás figyelhető meg. A csicsóka táptalajon szaporított baktériumok enzimaktivitása mind a két törzs esetében lényegesen nagyobb volt, mint az MRS-en szaporított mikroorganizmusoké. Azt feltételeztük, hogy az azonos törzsek különböző táptalajon mutatott dehidrogenáz enzimaktivitásbeli különbsége az egyes táptalajok eltérő szubsztrátumából eredő különböző szaporodási sebességekből is következhet. Ennek a hipotézisnek az igazolására a következő kísérleteket végeztük el. Mesterséges MRS táptalaj hígításával értük el, hogy a teszt mikroorganizmus azonos szaporodási görbét mutasson mindkét táptalajon, melynek eredményét a **9. ábra** mutatja. A szaporodási görbékből arra következtethetünk, hogy az ötszörösére hígított MRS táptalajon és a csicsóka táptalajon a *Lb. rhamnosus* VT1 törzs azonos sebességgel szaporodott.

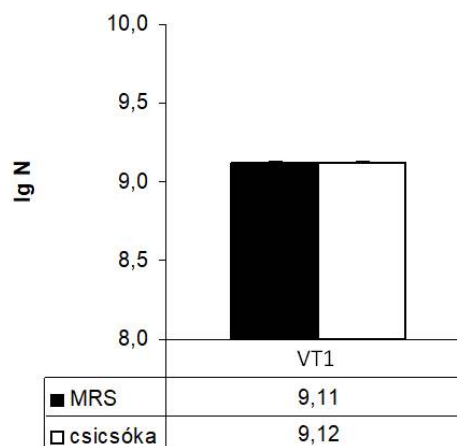


8. ábra: *Lactobacillus plantarum* 2142 és *Lactobacillus rhamnosus* VT1 formazán képzése azonos sejtszám és eltérő táptalaj esetén

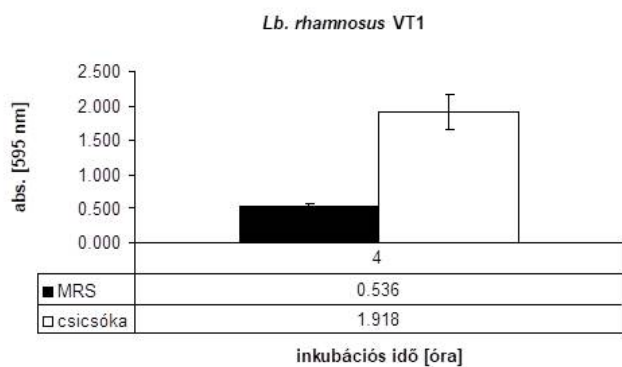


9. ábra: *Lactobacillus rhamnosus* VT1 szaporodási sebességének beállítása

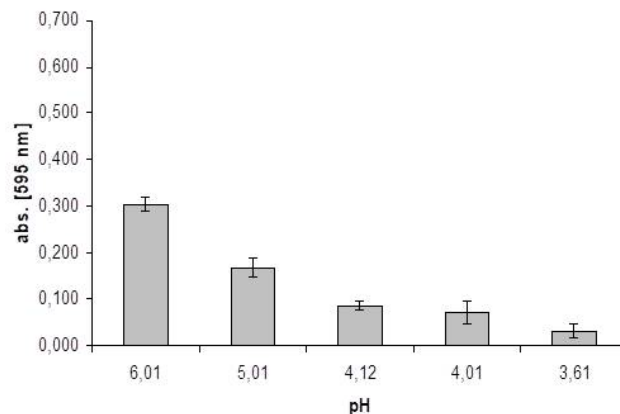
A szaporodási sebességi együtthatókat kiszámolva is közel azonos eredményeket kaptunk (csicsóka: 0.01 1/min MRS/5: 0.009 1/min). A további kísérletben ötszörösösen hígított MRS táptalajt és a csicsóka táptalajt



10. ábra: *Lactobacillus rhamnosus* VT1 sejtszáma 4 órás inkubációt követően csicsóka- és ötszörösére hígított MRS táptalajon szaporítva



11. ábra: *Lactobacillus rhamnosus* VT1 formazán képzése (8 mg/ml MTT) azonos sejtszám és eltérő táptalajon történő 4 órás szaporítást követően



12. ábra: *Lactobacillus casei* Shirota formazán képzése különböző pH-értékeken

azonos induló sejtszámmal beoltva ($5 \cdot 10^8$ sejt/ml) 4 órás inkubációt követően mintát vettünk, majd meghatároztuk a sejtszámukat és az enzimaktivitásukat spektrofotométer segítségével. A **10. ábra** jól mutatja, hogy azonos induló sejtszámmal beoltva a táptalajokat, 4 óra elteltével mind a hígított MRS, mind a csicsóka táptalajon azonos sejtszámot ért el a *Lactobacillus rhamnosus* VT1 törzs. Mint azt a **11. ábra** mutatja, az azonos sejtszám és szaporodási sebesség ellenére a csicsóka táptalajon közel négyszer nagyobb enzimaktivitást mutatott a teszt mikroorganizmus az MRS táptalajon mérthez képest. Megállapíthatjuk, hogy a baktériumok enzimaktivitását a sejtszám, illetve szaporodási sebességen kívül a szaporításukhoz alkalmazott táptalaj minősége is nagymértékben befolyásolja. Ennek oka a különböző táptalajokban lévő eltérő szénhidrát forrás lehet, amelyeknek eltérő metabolizációja során a sejtek különböző mértékű dehidrogenáz enzimaktivitással rendelkeznek (Berridge et al., 1996).

A pH hatásának vizsgálata

A pH okozta változást a sejtek MTT redukálási képességében a *Lactobacillus casei* Shirota törzs példáján keresztül mutatjuk be. A teszt mikroorganizmus sejtszámát $2,36 \cdot 10^9$ sejt/ml-re beállítottuk fiziológiás sóoldatban. A törzsoldatból 3 milliliteret kivettük és beállítottuk külön-külön a pH-kat (6,01, 5,01, 4,01, 3,61). A pH beállítására 0,01 M-os HCl és NaOH oldatot alkalmaztunk. A törzsoldat eredeti pH-ja 4,12. A különböző pH-jú sejtuszpenziókat 37 °C-os inkubátorba helyeztünk 1 órára. Az inkubációt követően mikrotiter MTT módszert alkalmazva mértük az enzimaktivitást.

A **12. ábrán** bemutatott eredményekből jól látható, hogy a sejtek tetrazólium-bromid redukáló képessége a pH esésével csökkenő tendenciát mutat. A pH-

beállítás nélküli sejtuszpenzió a 4,01-re beállított pH-jú mintáéhoz hasonló enzimaktivitást mutatott. Az eredményeink jól egyeznek azokkal a megállapításokkal miszerint a tetrazólium sók redukálódásának a pH optimuma a semlegeshez közeli (Jámbor et al., 1956; Cesari et al., 1969). Az eredményekből az is megfigyelhető, hogy a kapott jelek nagysága elmarad a korábbi mérések során kapott hasonló sejtszám mellett mért eredményektől. Az eltérés azzal magyarázható, hogy a fiziológiás sóoldatban beállított pH-jú sejtuszpenziók enzimaktivitásának mérését 1 órás inkubáció előzte meg, amely során a sejtek élettevékenysége és így az enzimaktivitása is a tápanyagok hiányában lecsökkent.

Következtetések, javaslatok

Sikeresen adaptáltuk Wang és munkatársai (2007), eredetileg Mosman (1983) által humán sejtekre kidolgozott MTT módszerét *Lactobacillus* törzsek élősejtszám meghatározására. Megállapítottuk az optimális paramétereket: baktériumsejt koncentrációt, MTT koncentrációt, inkubációs időt, pH hatást, amelyek esetén szoros korreláció áll fenn a sejtszám és a keletkezett formazán koncentráció között. Az adaptált módszer segítségével kevesebb mint négy óra alatt meghatározható a tesztmikroorganizmusok élő sejtszáma.

A módszer laboratóriumi kutatásokban megkérdőjelezhetetlen létjogosultsága mellett a gyakorlatban is hasznosítható számos élelmiszeripari termék, legfőképpen olyan funkcionális termékek gyors vizsgálatához, amelyeknek a fogyasztás pillanatáig meghatározott számú élő sejtet kell tartalmaznia a hozzáfűzött jótékony hatás kifejtése érdekében (probiotikumok), illetve ami még lényegesebb lehet, az

élelmiszerekben előforduló romlást okozó és patogén mikroorganizmusok gyors kimutatására, ami a módszer paramétereinek további módosításaival megvalósítható.

Irodalomjegyzék

- Altman, F.P. (1976): Tetrazolium salts and Formazans. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 9(3):1-51.
[https://doi.org/10.1016/s0079-6336\(76\)80015-0](https://doi.org/10.1016/s0079-6336(76)80015-0)
- Deák, T. (2005): A mikrobavilág molekuláris szemlélete. *Élelmezési Ipar*, 59(4):105-111.
- Deák, T. (2006a): *Élelmiszer-mikrobiológia*. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Deák, T. (2006b): *Mikrobiológiai vizsgáló módszerek*. Budapesti Corvinus Egyetem, Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Denizot, F., Lang, R. (1986): Rapid colorimetric assay for cell growth and survival Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods*, 89:271-277.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(86\)90368-6](https://doi.org/10.1016/0022-1759(86)90368-6)
- Mosmann, T. (1983): Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63.
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Peng, L., Wang, B., Ren, P. (2005): Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45:108-111.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2005.07.014>
- Twentyman, P.R., Luscombe, M. (1987): A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British Journal of Cancer*, 56:279-285.
<https://doi.org/10.1038/bjc.1987.190>
- Wang, F., Cao, L., Hu, S. (2007): A rapid and accurate 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide colorimetric assay for quantification of bacteriocins with nisin as an example. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 8(8):549-554.
<https://doi.org/10.1631/jzus.2007.b0549>
- Wang, H., Cheng, H., Wang, F., Wei, D., Wang X. (2010): An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. *Journal of Microbiological Methods*, 82:330-333.
<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.06.014>

Adaptation of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) colorimetric assay for the analysis of *Lactobacillus* strains

Hegyi F., Perjéssy J., Zalán, Zs.

Abstract

Lactic acid bacteria, including Lactobacillus strains, are widely found in nature and are important members of the human intestinal microflora. There has been a lot of research into the beneficial properties of these microorganisms for us, and it is becoming increasingly clear that without them, life would be unimaginable. This is why it is important to have as much information as possible about these essential micro-organisms. In our work, we have adapted and optimized a colorimetric method, originally suitable for human cells, to measure the enzyme activity of the test microorganisms we are investigating and to provide information on the importance of these microorganisms. By modifying and adjusting the parameters of the method reported in the literature, we obtained a rapid method for the direct detection of the enzyme activity of bacterial cells and, indirectly, their cell number in less than four hours. During the adaptation, the optimal parameters (bacterial cell concentration, MTT concentration, incubation time, effect of pH) were established, for which there is a close correlation between cell number and the formazan concentration produced. Our measurements have shown that the enzyme activity of Lactobacillus strains is strongly influenced by their instantaneous growth phase, the quality of the medium and that there is a significant difference between strains.

Keywords: MTT, Lactobacillus, enzyme activity, colorimetry