

(1997) tento jev vysvětlili zvýšenou proteolytickou a deaminační aktivitou kvasinek v souvislosti s degradací škrobu, proteinů a peptidů v bacheru.

V bacheru v souvislosti se zkrmováním kvasinek dochází i ke zvyšování koncentrace těkavých mastných kyselin jako výsledek degradačního působení celulolytických bakterií, které se mohly v plné míře uplatnit po stabilizaci bacherového pH. Dojnice, které přijímají v krmné dávce kvasinkové kultury, mají signifikantně vyšší obsahy mléčného tuku, jako důsledek zvýšení koncentrace volných mastných kyselin, které jsou jeho prekurzory (Chiquette et al. 2008).

Dojnice, kterým jsou podávány kvasinky v TMR (total mixed ratio) vykazují i vyšší koncentrace amoniakálního dusíku oproti kontrolní skupině jako výsledek proteolytické a deaminační aktivity.

Nedávné výzkumy přidavku živých bakterií do krmné dávky potvrdily i pozitivní vliv sníženého pH na rozvoj nežádoucích patogenních mikroorganismů (Nocek et al., 2002, Beauchemin et al., 2003). Zkrmování kvasinek prokazuje selektivní inhibiční působení například proti *E. coli* (Jensen et al., 2008).

Kvasinky mohou stimulovat i ochranný imunologický systém zvířat. Jejich buněčná stěna vykazuje vazební afinitu k toxinům, podávání kvasinek tak limituje nebezpečí vzniku toxikóz u přežvýkavců.

Opakované testace potvrzují, že přídavek kvasinkových kultur do krmné dávky může zvýšit efektivitu využití krmiva zejména při teplotních stresech u dojníc (Schingothe et al., 2004). Hypertermie negativně ovlivňuje celou řadu parametrů mléčné produkce. Teplotní stres snižuje příjem krmiva více než o 50% a mléčná produkce klesá. Ekonomické ztráty mohou dosahovat až 30% (Fox and Tylutki, 1998). V souvislosti se sníženou dostupností energie a naopak s nárůstem potřeby energie dojnice se dostávají v souvislosti s teplotním stresem do negativní energetické bilance (Ebal et al., 2005).

Zkrmování kvasinek se může významně podílet i na eliminaci nežádoucího působení mykotoxinů na zdravotní stav dojníc. Mykotoxiny jsou nízkomolekulární sloučeniny, které jsou produktem sekundárního metabolismu plísní. Jsou součástí přirozených destruktivních pochodů rostlinných materiálů, vyskytují se tedy v krmivech, koncentrátech i stelivu. Chemicky je identifikováno okolo 300 druhů mykotoxinů a jsou stanoveny maximální přípustné limity pro jednotlivé kategorie zvířat. Relativně nejodolnější je skot vzhledem k degradaci v bacheru. Dojnice však jsou nejcitlivější vzhledem k vysoké spotřebě krmiva, produkčnímu stresu a imunitní odezvě organismu. Zkrmování krmiv obsahujících nadlimitní množství toxinů vyvolává celou řadu onemocnění. Má vliv na imunitní a reprodukční systém, zvyšuje se embryonální mortalita. Je zaznamenán nárůst metabolických onemocnění jako ketóza, objevuje se vyšší četnost mastitidního onemocnění. Suplementace selenu, metioninu, karotenoidů a vitaminů vůbec působí vysoce pozitivně na fyziologické pochody zvířat krmných krmiv s obsahem mykotoxinů. Jako nejslibnější způsob dekontaminace se jeví biologická

detoxikace tzv. biotransformace (Yinnikouris a Jouanny, 2002). Je identifikováno více než 20 bakterií a kvasinek se schopností detoxikovat mykotoxiny (Schatzmayr et al., 2004). Řadí se k nim i pivovarské kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, které prokázaly schopnost snížit jedovatý vliv aflatoxinu na zvířata. Detoxikační roli sehrává esterifikovaný glukomanan, polymer z buněčné stěny kvasinky, který je schopen mykotoxiny poutat, aniž by vznikaly vedlejší toxické produkty nebo metabolity. Nedochází ke změnám nutričních hodnot, obsahu minerálních látek ani dostupnosti vitaminů. Izolace a charakteristika kvasinek, které jsou schopny biotransformovat mykotoxiny, je významným průlomem zavedení biotechnologie do praxe.

Suplementace krmné dávky zejména živými kmeny kvasinek zvyšuje stravitelnost a možnost využití krmné dávky, zvýšenou úroveň využití vlákniny a v souvislosti s tím i produkci kyselin (propionové), které se řadí mezi prekurzory mléčného tuku. Aplikace probiotických kvasinkových kultur do krmné dávky zásadně pozitivně ovlivňuje mikrobiální bacherový metabolismus, zvyšuje příjem sušiny v krmné dávce a má příznivý vliv na obsah nutričních složek mléka (zejména tuku a bílkovin). Přídavek živých kvasinkových kultur potencuje zvýšenou energetickou bilanci krmné dávky. Má jednoznačně vliv na welfare dojníc, jejich užitkovost a reprodukční ukazatele.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (výzkumný záměr MSM2672286101).

Literatura

Literatura je k dispozici u autorů.

VYUŽITÍ NEPŘÍMÉ IMPEDANČNÍ METODY PRO STANOVENÍ SPÓR KLOSTRIDIÍ NA PŘÍSTROJI RABIT

Š. Havlíková, E. Kvasničková, V. Černý

Výzkumný ústav mlékárenský, s. r. o. Soběslavská 841, 390 02 Tábor

Application of indirect impedant method for determination of Clostridium spores by RABIT apparatus

Souhrn

V této práci byla testována možnost stanovení spór klostridií máselného kvašení nepřímou metodou měření změny vodivosti v důsledku tvorby a absorpce CO₂ v přístroji RABIT na modelových kmenech. Pro tuto metodu bylo

vyvinuto vlastní živné médium s rychlou odezvou. Byly sestaveny kalibrační grafy pro stanovení počtu spór klostridií.

Summary

Clostridium spores of butyric fermentation were examined by indirect impedant method of conductivity changes as a result of CO₂ formation and absorption by RABIT apparatus on model strains. It was developed nutrient medium with fast response. Calibration grafts for spores count determination were obtained.

Klíčová slova: klostridia, máselné kvašení, spóry, CO₂, RABIT, absorpce

Úvod

Rod *Clostridium* představuje heterogenní skupinu přibližně 100 druhů anaerobních bakterií tvořících endospóry. Zahrnuje prominentní producenty toxinů jako je *Cl. difficile*, *perfringens*, *botulinum* nebo *tetani* stejně jako producenty organických sloučenin jako je *Cl. acetobutylicum* nebo technologicky škodlivé *Cl. butyricum* a *tyrobutyricum*.

Nacházejí se v půdě, vodě, lidských i zvířecích organismech. Jsou heterofermentativní a jejich metabolické profily se velmi liší. Některá klostridia jsou významnými producenty plynů, metabolizují cukry, jiná cukry jako zdroj uhlíku nepotřebují a rozkládají za anaerobních podmínek především bílkoviny. Označují se jako striktní anaeroby, ale jejich vztah ke kyslíku se liší jak podle druhů, tak podle fází růstu. Některá klostridia jsou schopna se na počátku růstu vypořádat s určitým malým množstvím rozptýleného kyslíku a anaerobní prostředí si de facto vytvořit (Kawasaki et al.). Jednotné nejsou ani podmínky sporulace, tj. vytváření dormantních forem - spór - ani podmínky jejich klíčení. Proto je velmi obtížné na základě jejich biochemické aktivity je identifikovat jednotným testem nebo určit univerzální metodu stanovení těchto bakterií.

Problémy se stanovením těchto bakterií se odrážejí i ve skutečnosti neexistence normované metody pro mlékařskou oblast, pouze ČSN 570529 pro syrové mléko jako surovinu pro mlékařský průmysl uvádí jako požadavek nulový výskyt SPAN (sporulujících anaerobních bakterií). Není přitom uvedena metoda, jakou se má nepřítomnost prokazovat.

Velké rozdíly v metabolických profilech jednotlivých klostridií znesnadňují i jejich identifikaci pomocí enzymatických testů. Firma PLIVA-Lachema Diagnostika s. r. o. nabízela ANAEROTest 23, který je určen mimo jiné i pro identifikaci grampozitivních sporulujících tyčinek. Test uvádí pouze 31 druhů klostridií a vychází z rozkladu různých druhů cukrů, tvorby indolu, močoviny a nitrátů. Tímto testem se nám podařilo identifikovat pouze sbírkový kmen *Clostridium sporogenes* 4423 z CCM Brno s indexem pravděpodobnosti 60% a žádný z izolátů ze sýrů získaných na našem pracovišti nebo z jiných zdrojů.

Vzhledem k tomu, že máme k dispozici přístroj RABIT (výrobce DWS, U. K.), pracující na principu měření a vyhodnocování změn vodivosti při růstu bakterií, využili jsme jej k vývoji metody ke stanovení přítomnosti spór klostridií máselného kvašení.

Materiál a metody

Přístroj RABIT (výrobce DWS, U. K.)

WAB bujón (DWS G50006)

RCM bujón (Oxoid 0149)

CLOAG bujón (MILCOM a.s.)

RCM agar (OXOID 0151)

Glukóza (Sigma G8270)

Glycerol (PENTA)

Neutrální červeň (Sigma N2880) 0,5% roztok v 60% etanolu

L-cystein hydrochlorid (Sigma 30130) roztok 0,5 g/l

Don Whitley Scientific: Standard Mikrobiology Method, SMM/DWS/0119/02

Clostridium sporogenes 4423, CCM Brno

Clostridium tyrobutyricum L3, L2 MILCOM

Pracovní postup

Pro stanovení klostridií máselného kvašení byla nejprve podle doporučení výrobce přístroje RABIT použita přímá metoda, kdy se zaočkovaný bujón pipetuje přímo do měřicích tub, ty se po uzavření vloží do měřicích cel přístroje a ten registruje změny vodivosti v zadaných intervalech v závislosti na změně obsahu organických kyselin jako produktů metabolismu (DWS Limited).

Klostridia jsme naočkovali do bujónu WAB, dodaného výrobcem a doporučeného pro stanovení anaerobních termorezistentních mikroorganismů. *Cl. sporogenes* v něm rostl dobře, ale další klostridia ne, proto jsme podle údajů v literatuře (St. Amans et al.) přidali glukózu (3,3 g/l) a glycerol (30 g/l) a vyzkoušeli ještě pro tato klostridia běžně používaný bujón RCM a bujón CLOAG (30,8 g/l směs peptonů, 25 g/l glukóza, 12,2 g/l směs solí Mg, Mn, Ca a NH₄⁺, 0,5 g/l agar, 30 g/l glycerol). Růst klostridií byl v těchto bujónech dostatečný, ale křivky získané ze záznamu přístroje byly nevyhovující, protože celková změna vodivosti byla řádově 10² μS. Pro získání kvalitního záznamu je třeba změna řádově v 10³ μS.

Proto jsme se rozhodli otestovat pro stanovení klostridií máselného kvašení další jejich vlastnost, a to tvorbu plynů, nepřímou metodou v bujónu WAB, WAB s přidavkem glukózy a glycerolu a CLOAG. Při nepřímé metodě se do agarového můstku s KOH připraveného v měřicí tubě a otestovaného, aby měl vodivost vyhovující pro měřicí rozsah přístroje, absorbuje CO₂, vytvořený při růstu klostridií v bujónu napipetovaném do vložené skleněné zkumavky v těsně uzavřené tubě vložené do měřicí cely. Anaerobní prostředí pro růst klostridií je ve všech případech zajišťováno přidavkem cystein hydrochloridu. Přístroj zaznamenává křivku úbytku vodivosti v μS, přičemž registruje hodnotu TTD (time to detection). Je to

čas, kdy změna vodivosti je třikrát za sebou větší než $-10 \mu\text{S}$ a odpovídá zhruba ohybu křivky a zároveň takovému pomnožení přítomných mikroorganismů, při kterém začíná produkce CO_2 jako v tomto případě sledovaného parametru růstu. Nejlepší výsledky poskytovala kultivace v bujónu CLOAG. Vyhodnocením časů detekce pro různé koncentrace spór klostridií jsme získali kalibrační graf pro jednotlivá klostridia.

Protože počet spór klostridií máselného kvašení byl při kultivaci v bujonech poměrně nízký, provedli jsme zahuštění následujícím způsobem. V 50 ml bujónu zaočkovaném testovanými klostridii jsme po kultivaci při 37°C po dobu 7 dní inaktivovali vegetativní formy bakterií záhřevem na 85°C po dobu 10 minut. Po ochlazení jsme takto upravenou suspenzi odstředili na laboratorní odstředivce při 9 000 ot/min po dobu 10 minut. Odstranili jsme supernatant a sediment jsme použili jako 0. ředění a k přípravě dalších ředění k zaočkování do bujónu CLOAG pro nepřímou metodu stanovení v přístroji RABIT. Takto jsme získali řádově 10^3 spór v 1 ml jako výchozí hodnotu. U *Cl. sporogenes* byl počet spór v inaktivovaném vzorku dostačující pro inokulaci a nebylo nutné odstředování provádět.

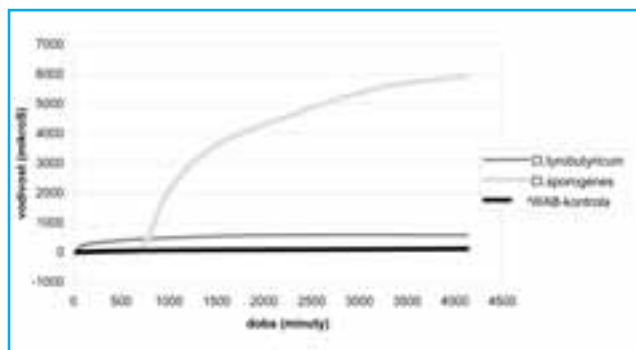
Stanovení počtu spór na počátku kultivace bylo prováděno plotnovou metodou na RCM agaru s neutrální červení.

Výsledky a hodnocení

Graf. č. 1 znázorňuje výsledky přímé metody stanovení TTD v bujónu WAB. Celková změna vodivosti u *Clostridium tyrobutyricum* L2 je nízká, pohybuje se pouze ve stovkách μS a velmi málo se liší od křivky kontrolní tuby s nezaočkovaným bujónem, přestože počáteční koncentrace spór byla $15 \cdot 10^4/\text{ml}$, TTD přístroj nezaznamenává. *Clostridium sporogenes* 4423 s počáteční koncentrací spór $75 \cdot 10^2/\text{ml}$ naopak poskytuje křivku s dostatečnou změnou vodivosti a TTD je zaznamenáno.

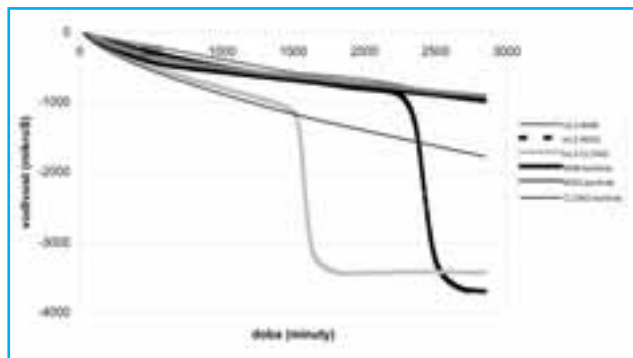
V následujících grafech č. 2 a 3. jsou znázorněny vodivostní křivky *Clostridium tyrobutyricum* L3 a *Cl. tyrobutyricum* L2 v bujonech WAB, WGG a CLOAG.

Graf č. 1: Vodivostní křivky *Cl. tyrobutyricum* a *Cl. sporogenes* ve WAB, přímá metoda

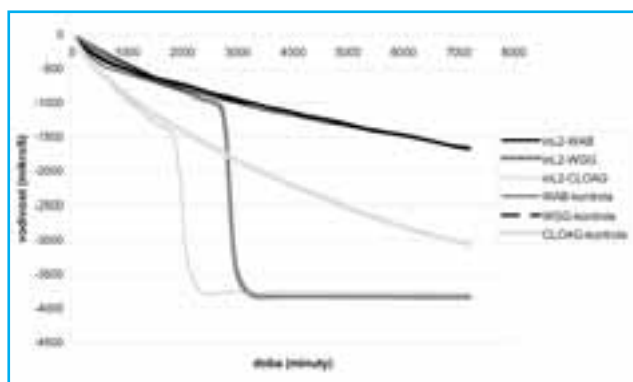


Kalibrační křivky získané nepřímou metodou pro spóry *Cl. tyrobutyricum* L3 a *Cl. sporogenes* 4423 v následujícím grafu č. 4 a 5 a kalibrační grafy z nich získané jsou uvedeny jako graf č. 6.

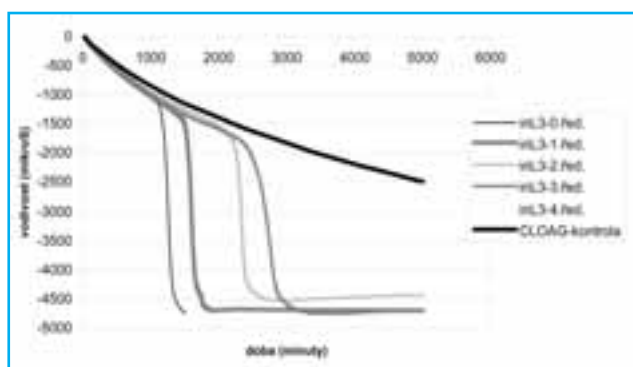
Graf č. 2: Vodivostní křivky inaktivovaného *Cl. tyrobutyricum* L3 ve WAB, WGG a CLOAG, nepřímá metoda



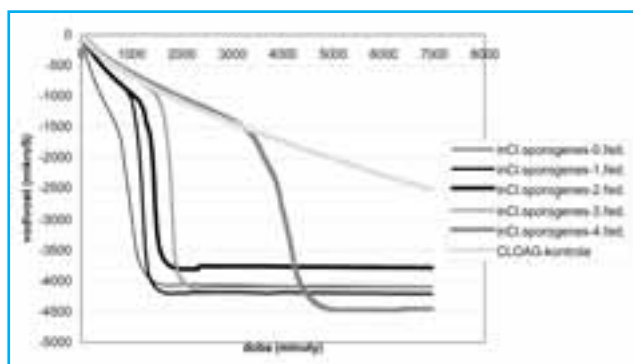
Graf č. 3: Vodivostní křivky inaktivovaného *Cl. tyrobutyricum* L2 ve WAB, WGG a CLOAG, nepřímá metoda



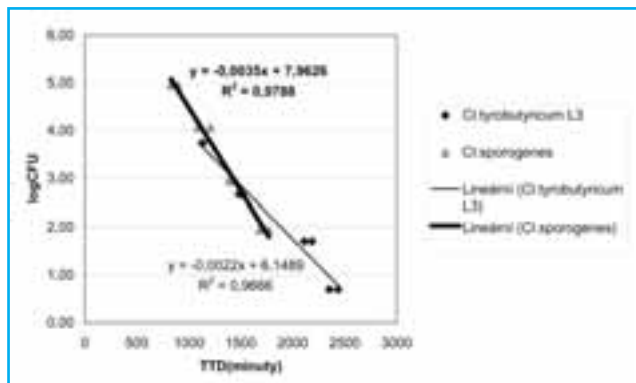
Graf č. 4: Kalibrační křivka inaktivovaného *Cl. tyrobutyricum* L3 v CLOAG při 37°C



Graf č. 5: Kalibrační křivky inaktivovaného *Cl. sporogenes* v CLOAG při 37°C



Graf č. 6: Kalibrační graf *Cl. tyrobutyricum* L3 a *Cl. sporogenes* v CLOAG při 37°C



Diskuse a závěr

Pro stanovení klostridií máselného kvašení nepřímou impedanční metodou v systému RABIT bylo sestaveno a odzkoušeno živné médium CLOAG s vlastní recepturou, v němž tato klostridia tvoří nejrychleji dostatečné množství CO₂ pro detekci přítomnosti a stanovení počtu na základě jeho absorpce v agarovém můstku s KOH, jak je zřejmé z grafů č. 2 a 3.

Metoda stanovení spór klostridií máselného kvašení instrumentálně kultivační metodou na základě jednoho projevu metabolismu - tvorby a následné absorpce CO₂ - je na modelových mikroorganismech použitelná, má však svá omezení.

Výrobce uvádí, že přístroj zaregistruje hodnotu TTD při koncentraci buněk přibližně 10⁶/ml. Pokud k dosažení této hodnoty dojde dříve, protože koncentrace buněk ve zkoumaném vzorku je vyšší než tato hodnota nebo ke zvýšení koncentrace buněk dojde rychleji než za 1 hodinu a 24 minut, může označit přístroj tuto hodnotu jako TTD. Vysoký počet spór ve vzorku nebo příliš rychlý růst z vyššího počtu spór, který na počátku měření přesáhne hodnotu cca 10⁶ buněk, může poskytovat nesprávné shodné výsledky.

Rovněž při nízkých počtech spór v oblasti náhodného výskytu je možné získat rozdílné výsledky v souběžných stanoveních, a to buď negativní nebo vysoké TTD v nižším

ředění a vysoké TTD v následném vyšším ředění, protože v 1 ml použitého vyššího ředění se může vyskytnout ojedinelá spóra, která se reprodukuje a produkuje CO₂ v dostatečné koncentraci, aby způsobila takovou změnu vodivosti, kterou přístroj vyhodnotí jako TTD, kdežto v nejbližším nižším ředění byl výsledek negativní - TTD nebylo zaznamenáno. Situace je podobná jako u plotnových metod, kde existují doporučená rozmezí počtu kolonií pro získání reprodukovatelného výsledku. Výrobce uvádí, že RABIT systém je schopen detekovat přítomnost méně než 10 živých CFU/ml, což odpovídá našim výsledkům. V grafu č. 6 je nejnižší odečtená hodnota počtu spór log CFU/ml rovna hodnotě 0,6, což odpovídá 4.10⁰ spór v 1 ml.

Z uvedeného tedy vyplývá, že tímto způsobem je možno spolehlivě stanovit počet spór v intervalu od 10⁰ do 10⁵ spór v 1 ml, což je rozmezí, v jakém se spóry klostridií máselného kvašení většinou vyskytují. Pokud by byl předpokládán vyšší obsah, bylo by třeba uvažovat o vhodném naředění vzorku.

Literatura:

1. Kawasaki, S., Nakagawa, T., Nishiyama, Y., Benno, Y., Uchimura, T., Komagata, K., Kozaki, M., Niimura, Y.: Effect of oxygen on the growth of *Clostridium butyricum* (type species of the genus *Clostridium*) and the distribution of enzymes for oxygen and for active oxygen species in Clostridia. J. of Ferm. and Bioengi, Vol 86, Issue 4, 1998, p. 368-372
2. Saint-Amans, S., Girbal, L., Andrade, J., Ahrens, K., Soucaille, P.: Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* VPI 3266 grown on glucose-glycerol mixtures. J. of Bact. Vol 183, No.5, 2001, p.1748-1754
3. MILCOM a. s. SOP: Metodika práce s přístrojem Rabit, obsluha přístroje, příprava detekčních cel a desítkových ředění. Tábor 2006
4. Kong, Q., He, G. Q., Chen F, Ruan H.: Studies on a kinetic model for butyric acid bioproduction by *Clostridium butyricum*. Lett. Appl. Microbiol. 2006 Jul; 43(1): 71-77
5. Don Whitley Scientific Limited: Standard Microbiology Method, SMM/DWS/0/0119/02, 2001

Tato práce byla podporována grantem MŠM 2672286101.

Přijato do tisku 4. 11. 2009

Lektorováno 18. 11. 2009



AarhusKarlshamn Czech Republic, s. r. o.

- Tuky pro mlékařský průmysl
- Tuky pro čokoládovnický a cukrovinářský průmysl
- Tuky a shorteningy pro pekářský průmysl
- Poradenská služba v oblasti technologie procesů výroby a zpracování rostlinných tuků a olejů

VŠEM NAŠIM ZÁKAZNÍKŮM PŘEJEME KRÁSNÉ A KLIDNÉ VÁNOČNÍ SVÁTKY,
HODNĚ ZDRAVÍ, ŠTĚSTÍ A ÚSPĚCHŮ V NOVÉM ROCE!

AarhusKarlshamn Czech Republic spol. s r.o., Na Pankráci 1618/30, 140 00 Praha 4
 Tel: +420 222 212 087; +420 222 210 406, Mobil: +420 602 451 305; +420 602 145 090
 E-mail: info.cz@aak.com, www.aak.com