

s vyšší dojivostí u plemene České strakaté, což se nepotvrdilo u plemene Holštýn v České republice ($2,10 > 1,38$ a $1,45 < 1,95$ mg/l; (Janů et al., 2007 a Hanuš et al., 2007). Podle posledních ještě nepublikovaných výsledků (Hanuš et al., 2008) jsou pro ekologické farmaření typické vyšší hodnoty acetonu v mléce krav ve srovnání s chovy konvenčními ($6,8 > 1,6$ mg/l) a ukázaly tak na trvalý energetický nedostatek ve výživě ekologických stád. Dále byla registrována významná korelace mezi koncentrací acetonu v mléce krav a poměrem tuk/bílkoviny v hodnotě 0,33. Uvedené může mít význam zejména při zpřesnění sofistikovaného modelu interpretace výsledků složení mléka a koncentrace ketonů v mléce při praktické aplikaci měření v rutinní kontrole mléčné užitkovosti (software expertního systému). Pokud se týká mléka malých přežvýkavců, podobný trend vztahu byl potvrzen u ovcí, ale nikoliv u koz (Hanuš et al., 2008).

Rizikost zvýšených hladin ketonů v mléce pro jeho kvalitu jako potravinářské suroviny

Kvalita mléka od dojníc s metabolickými problémy je zhoršena. V subklinických případech takové mléko nelze ve stáji z dodávky rutinně vyřazovat narozdíl od subklinických mastitid. Bez této možnosti eliminace se dostává do mlékárny. Zde může metabolicky zatížené mléko ohrožovat kvalitu průběhu mlékárenských technologií. Korelace acetonu k jogurtovému testu činila -0,21 (Hanuš et al., 1993). Byla však spíše dána souběžně změnami ostatními vlastnostmi mléka, než samotnou zvýšenou koncentrací acetonu.

Při vyhodnocování souborů dat o ketonech v tělních tekutinách, zejména v individuálních vzorcích mléka, je nezbytné použít nějakou formu matematických transformací pro pravidelnou existenci nenormální frekvenční distribuce v takových materiálech (Hanuš et al., 2001). Vhodné jsou medián nebo geometrický průměr jako primární reprezentativní statistické momenty datových souborů, pokud si přejeme pragmaticky zůstat v oboru původních reálných čísel měřených dat tak, aby výsledky byly srozumitelné při interpretaci pro praktické uživatele. V opačném případě je nutná aplikace neparametrických testů (chí-kvadrát, znaménkový test, Wilcoxonův test) a v případě hodnocení vzájemných vztahů k ostatním mléčným ukazatelům např. Spearmanův koeficient pořadové korelace. Klasické statistické testy hypotéz a základní statistické parametry jsou použitelné pouze u bazénových vzorků mléka, tyto však mají zase nižší vypovídací schopnost vzhledem ke zdravotnímu stavu krav.

Závěr pro případný další výzkum.

Základní hypotéza projektu pro zlepšení interpretace ketonů v mléce by mohla být: "Pokud by bylo vývojem dosaženo dostatečně efektivní a věrohodné metody pro sériové analýzy ketonů v mléce, pak by při rutinním nasazení této metody v kontrole užitkovosti bylo možno pomocí zlepšených interpretačních pravidel a prevence docílit lepší zdravotní stav dojníc, jejich lepší reprodukci a kvalitnější

mléko pro potravinářské zpracování. Tato cílená intervence do metodických postupů kontroly užitkovosti by zvýšila její efektivitu i finanční stabilitu a prospěla by provozní jistotě chovatelů dojníc i bezpečnosti mléčného potravinového řetězce. Cílem takového projektu pak: Vyvinout účinnější metodu stanovení ketonů v individuálních vzorcích mléka pro účely kontroly užitkovosti dojníc; analyzovat příčinné faktory variability ketonů v mléce; zlepšit praktické interpretační postupy pro variabilitu výskytu ketonů v mléce v postupu kontroly mléčné užitkovosti dojníc; posoudit vliv ketonů na kvalitu potravinové suroviny a navrhnout postupy k zamezení případného rizika.

Použitá literatura je dostupná u autorů.

Príspevek byl podporován prostředky pro řešení projektů, NAZV, 1G46086 a MŠMT - CZ.1.07/2.3.00/09.0081.

Přijato do tisku 23. 2. 2010

Lektorováno 8. 3. 2010

SLEDOVÁNÍ FYZIOLOGICKÝCH A BIOCHEMICKÝCH VLASTNOSTÍ LISTERIA MONOCYTOGENES IN VITRO

Marta Pechačová, Jitka Peroutková, Irena Němečková, Gabriela Kunová, Petr Roubal

MILCOM a.s., Praha

Monitoring of physiological and biochemical properties *Listeria monocytogenes* in vitro

Abstrakt

U izolovaných kmenů *Listeria monocytogenes* byla zjišťována schopnost přežít v různých podmínkách. Testována byla odolnost vůči žlučovým solím a nízkému pH. Tyto vlastnosti jsou rozhodující pro přežití v trávicím traktu. Byla otestována citlivost vůči dvěma humánním antibiotikům používaným k léčbě. Další provedené testy simulovaly podmínky používané v mlékárenské technologii tj. odolnost k vysoké koncentraci NaCl, termizačnímu a pasteračnímu záhřevu a test pohyblivosti bakterií. K modelovým pokusům byly použity tyto matrice vzorku: bujon BHI, smetana 32 g tuku /100 g, odstředivkový tvaroh (sušina 18 g/100 g, pH 4,90)

Abstract

Isolated strains of *Listeria monocytogenes* were tested at various conditions, it was examined their survive ability. It was tested tolerance to bile salt and low acidity, these properties are deciding for survival in intestinal tract. Another performed experiments simulated conditions used in a dairy technology such as tolerance to high concentra-

tion of NaCl, termization and pasteurization heat and motility of bacteria. For model tests were used the follow matrix of samples: broth BHI, cream 32 g of fat/ 100 g, centrifugal quark (solid 18/100 g, pH 4,90).

Úvod

Výskyt *Listeria monocytogenes* je pro konzumenta zdravotním rizikem, jedná se o potravinového patogena, který způsobuje onemocnění listeriózu. Množství bakterií *Listeria monocytogenes*, potřebné ke kolonizaci trávicího traktu a k rozvoji nemoci, je u zdravého jedince 10^9 , ale u rizikových osob pouze 10^3 , což představuje 10 g potraviny s denzitou bakterií pouze 100 KTJ/1 g (Nařízení Komise 2005, 2007).

Na mlékárnách je zdrojem kontaminace syrové mléko nebo nedokonale sanitované výrobní zařízení. Zvýšené riziko pomnožení *Listeria monocytogenes* je dáno variabilitou růstu, a to jak podmínek teplotních (2-45 °C), tak nároků na kyselost prostředí (pH 4-9). Listerie nejsou inhibovány ani vysokou koncentrací NaCl.

Materiál a metody

Na modelových pokusech in vitro u 6 kmenů izolátů *Listeria monocytogenes* byly sledovány biochemické a fyziologické charakteristiky s ohledem na parametry mlékárenských technologií (Gelbčíková a kol., 2008).

Byla sledována rezistence vůči žlučovým solím a nízkému pH, tyto podmínky simulují podmínky zažívacího traktu.

Ověřena byla účinnost pasteračního režimu používaného při výrobě sýrů tj. 74 °C/15-40 sekund.

Dále byl na modelových pokusech ověřen vliv matrice vzorku na účinnost termizačního záhřevu, pro testování byl použit živný BHI bujón, smetana a tvaroh.

V závislosti na podmínkách skladování byla sledována rezistence vůči vysoké koncentraci NaCl.

Vzhledem k tomu, že jsou tyto bakterie při pokojové teplotě pohyblivé, mají schopnost ulpívat na technologických zařízeních a jsou proto součástí biofilmů (Lemon, KP, Higgins DE, Kolter, R., 2007). Zvýšené riziko je v lokalitách s tvrdou vodou (Purkrťová a kol., 2009). Na speciálním agaru byl proveden test pohyblivosti v závislosti na různém pH (pH 4, 5, 7) a různé teplotě (6, 22, 37 °C).

Prověřena byla také rezistence vůči antibiotikům používaným v humánní medicíně při léčbě listeriózy.

Pro testování bylo vybráno 6 izolátů *Listeria monocytogenes* viz tab. č. 1.

Tab. 1 Označení izolátů kmenů *Listeria monocytogenes*

Pracovní označení	Komodita
L-1	zrající sýr
L-2	stěr-technologické zařízení
L-3	plísňový sýr
L-4	stěr-obklad u umyvadla
L-5	zelenina košťál
L-6	salám

Izoláty kmenů *Listeria monocytogenes* byly uchovány v BHI bujónu s přidavkem glycerolu při -40 °C.

Před započítím modelových pokusů byla potvrzena čistota těchto kmenů na diagnostickém Chromocult *Listeria* Selektiv agaru (Merck). Vlastní testování bylo provedeno na referenční půdě TSA.

Testování odolnosti vůči žlučovým solím:

Žlučová sůl (Oxoid L55) byla dávkována do BHI agaru v koncentraci 0,3 a 0,7 %, kultivační podmínky 37 °C/24 hodin.

Vliv nízkého pH na denzitu bakterií:

Vliv nízkého pH byl testován v BHI bujónu o pH 3 (pH na potřebnou hodnotu bylo upraveno roztokem HCl), jako kontrolní vzorek sloužil BHI bujón s pH 7, skladování 37 °C/3 hodiny.

Vliv matrice vzorku na termizační záhřev s různou výdrží:

Při testování vlivu matrice vzorku na termizační teplotu byly reálné vzorky (smetana, tvaroh) tepelně ošetřeny, aby byla eliminována doprovodná mikroflóra, termizační záhřev při teplotě 65 °C s výdrží 5 a 10 minut.

Tab. 2 Vliv nízkého pH na růst vybraných kmenů

kmen	BHI bujón pH 7 KTJ/1 ml	BHI bujón pH 3 KTJ/1 ml	BHI bujón pH 3 rezistentní MO (%)
L-1	$7,2 \times 10^5$	$3,2 \times 10^2$	0,05
L-2	$9,8 \times 10^4$	neg.	-
L-3	$4,0 \times 10^5$	$1,5 \times 10^2$	0,04
L-4	$1,0 \times 10^5$	neg.	-
L-5	$6,3 \times 10^4$	neg.	-
L-6	$1,8 \times 10^4$	$2,2 \times 10^2$	1,2

Tab. 3 Vliv matrice vzorku *Listeria monocytogenes* na odolnost kmenů vůči termizačnímu režimu

Kmen LM	BHI bujón, rezistence (%)		tvaroh, rezistence (%)		smetana, rezistence (%)	
	65 °C/5 minut	65 °C/10 minut	65 °C/5 minut	65 °C/10 minut	65 °C/5 minut	65 °C/10 minut
L-1	0,4	-	1,5	-	4,6	0,1
L-2	3	-	3,1	0,01	1	-
L-3	3,7	-	5,3	-	3,8	0,02
L-4	0,4	-	1,1	-	0,8	-
L-5	0,2	-	0,5	-	0,7	0,09
L-6	0,3	0,01	0,5	0,06	0,2	0,01

Tab. 4 Rezistence kmenů *Listeria monocytogenes* k NaCl v závislosti na teplotě a době skladování

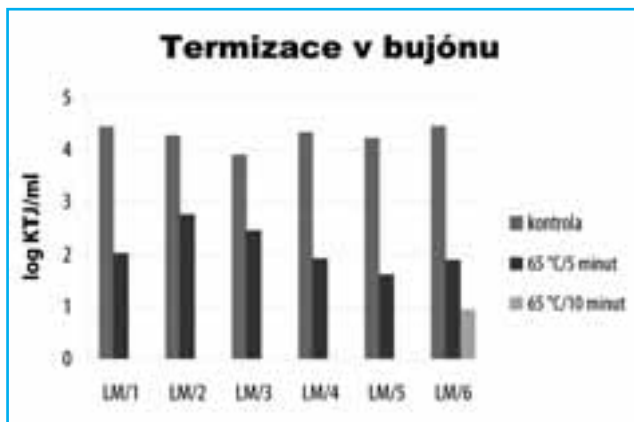
Kmen LM	BHI bujón, 22 °C/24 hodin rezistence (%)			BHI bujón, 6 °C/5 dnů rezistence (%)		
	2 % NaCl	5 % NaCl	7 % NaCl	2 % NaCl	5 % NaCl	7 % NaCl
L-1	95	16	0,05	103	19	0,52
L-2	96	0,2	0,21	113	1,1	0,13
L-3	121	7,9	0,004	125	7,9	0,14
L-4	92	0,13	0,2	100	3,3	0,41
L-5	63	4,3	0,4	106	12,6	1,86
L-6	10	2,1	0,05	123	40	0,01

Tab. 5 Pohyblivost kmenů v závislosti na teplotě a pH

Kmen LM	6 °C/5 dnů		22 °C/24 hodin		34 °C/24 hodin	
	pH 7,2	pH 4,5	pH 7,2	pH 4,5	pH 7,2	pH 4,5
L-1	-	-	+	-	-	-
L-2	-	-	+	+	+/-	-
L-3	-	-	+	-	-	-
L-4	-	-	+	-	-	-
L-5	-	-	+	-	+/-	-
L-6	-	-	+	-	-	-

Tab. 6 Rezistence kmenů vůči antibiotikům

Kmen LM	TSA/ kontrola	TSA/ Vankomycin	TSA/ Clindamycin	rezistence %
	KTJ/1 ml	KTJ/1 ml	KTJ/1 ml	
L-1	$1,8 \times 10^8$	neg.	$2,4 \times 10^3$	0,001
L-2	$1,0 \times 10^8$	neg.	$1,9 \times 10^4$	0,02
L-3	$1,4 \times 10^8$	neg.	$3,1 \times 10^2$	0,0002
L-4	$1,0 \times 10^8$	neg.	$5,8 \times 10^3$	0,006
L-5	$1,3 \times 10^8$	neg.	$6,2 \times 10^3$	0,005
L-6	$9,0 \times 10^7$	neg.	$1,8 \times 10^2$	0,0002

Graf 1 Termizace bujónu**Testování odolnosti vůči NaCl:**

Vliv vysoké koncentrace NaCl byl testován v BHI bujón, úprava koncentrace NaCl na požadovanou hodnotu sterilním nasyceným roztokem NaCl na výslednou koncentraci 2, 5 a 7 %, skladování 22 °C/24 hodin a 6 °C/5 dnů.

Pohyblivost izolátů kmenů:

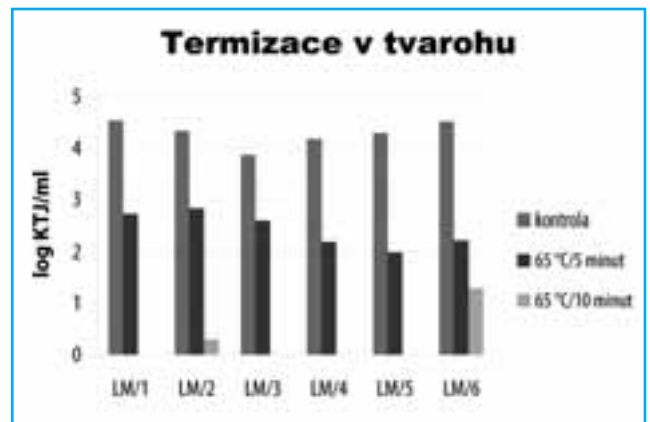
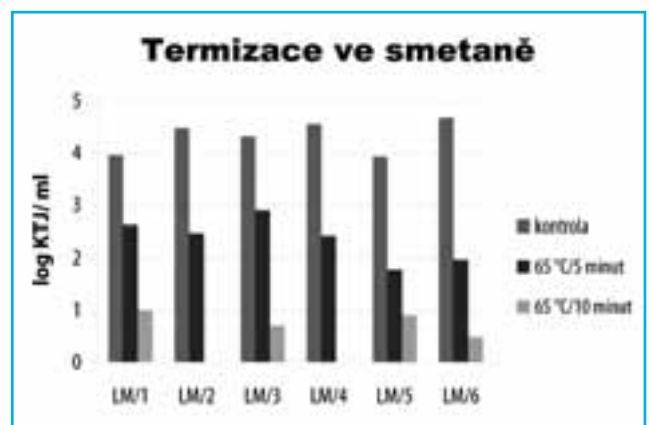
Byla použita půda k testování pohyblivosti BBL-Motility Test Medium, úprava pH agaru na 4,5 (HCl), kontrolní vzorek pH 7,2, test proveden vpichem do agaru, kultivace 6 °C/5 dnů, 22 °C/24 hodin, 34 °C/24 hodin.

Testování humánních antibiotik:

Antibiotika Vankomycin (0,5 mg/100 ml TSA agaru) a Clindamicin (0,1 mg/100 ml TSA agaru) byla asepticky dávkována do média před inokulací, kultivace ploten 37 °C/48 hodin.

Výsledky

Výsledky testovaných charakteristik jsou uvedeny v tabulkách č. 2-6.

Graf 2 Termizace tvarohu**Graf 3** Termizace smetany

Při stanovení odolnosti kmenů byla použita tato kritéria vztahující se ke kontrolnímu vzorku:

- kmeny odolné: přežívá 70-100 %
- kmeny tolerantní: přežívá 10-70 %
- kmeny citlivé: přežívá 0-10 %

Vliv matrice vzorku při termizačním záhřevu znázorňují grafy č. 1 -3.

Test pohyblivosti izolovaných kmenů provedených vpichem do BBL-Motility Test medium byl vyhodnocen po kultivaci zkumavek jako pozitivní + nebo negativní -, viz obrázek č. 1 a 2.

Závěr

Ze získaných výsledků testování fyziologických a biochemických charakteristik u izolátů kmenů listerií lze říci:

- Modelovým pokusem simulace fyziologických podmínek v zažívacím traktu (pH 3 a koncentrace žlučových solí 0,7 %) se prokázalo, že žlučovými solemi není žádný z testovaných kmenů *Listeria monocytogenes* 100% inhibován. Nejodolnější jsou kmeny L-4 (stěr) a L-5 (košťálová zelenina). Naopak nejcitlivější jsou kmeny L-1 (zrající sýr) a L-2 (stěr). Na nízké pH (pH 3) jsou testované kmeny velice citlivé. Zcela inhibovány byly tři kmeny (L-2, L-4 a L-5). U ostatních kmenů je odolnost listerií v rozmezí 0,04 % - 1,2 %. Velice důležitá je proto denzita bakterií v potravinaě při konzumaci.



Obr. 1 A - pozitivní test

- Z pokusu rezistence kmenů *Listeria monocytogenes* vůči termizační teplotě v závislosti na matrici vzorku je zřejmé, že teplota 65 °C s výdrží 5 minut je zcela nedostačující pro bujón, tvaroh i smetanu. Při stejné termizační teplotě, ale dvojnásobné výdrži už je pět kmenů v bujónu (L-1 až L-5) 100 % inhibováno. U kmene L-6 je 0,01 % bakterií rezistentních. U smetany a tvarohu je termizační efekt vždy nižší, protože se uplatňuje ochranný vliv bílkoviny a tuku na bakterie. Rezistence kmenů je 0,1 % - 0,01 %.
- Testování vůči vysoké koncentraci NaCl bylo provedeno při teplotách 22 °C a 6 °C, při ledničkové teplotě byla zjištěna vždy vyšší odolnost kmenů. Vůči 2 % NaCl jsou všechny kmeny rezistentní. Koncentrace 7 % NaCl má na všechny testované kmeny listerií velmi vysokou inhibiční účinnost, ale ani tato koncentrace není 100 % inhibiční.
- Z testu pohyblivosti kmenů *Listeria monocytogenes* v závislosti na teplotě a pH je patrné, že při pH 7,2 a teplotě 22 °C jsou všechny testované kmeny pohyblivé. Při teplotě 6 °C nebyla pohyblivost prokázána. Při pH 4,5 byla pohyblivost potvrzena u kmene L-2 při pokojové teplotě. Při teplotě 37 °C u dvou kmenů L-2 a L-5 byla zjištěna pohyblivost dubiózní v kontrolním agarů (+/-). Při pH 4,5 však nebyla pohyblivost potvrzena.



Obr. 2 D - negativní test

- Při testování rezistence kmenů vůči antibiotikům používaným v humánní medicíně při léčbě listeriózy byl zjištěn 100 % inhibiční účinek u antibiotika Vankomycin. Clindamycin není tak účinný, procento rezistentních bakterií se pohybuje od 0,02 do 0,0002 %.
- Při výrobě termizovaných výrobků je nutné z důvodu bezpečnosti potravin dodržet termizační záhřev 65 °C s výdrží 10 minut. Při výrobě sýrů, kde se využívá pasteurace při nižší teplotě, je důležité dodržet podmínky 74 °C/40 sekund, výdrž 15 sekund je nedostačující.

Poděkování

Tato práce mohla vzniknout díky finanční podpoře Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky při řešení grantu 2B08050.

Literatura:

- PURKRTOVÁ S., PILCHOVÁ T., ĎURIŠOVÁ J., DEMNEROVÁ K., PAZLAROVÁ J. (2009): Podmínky tvorby biofilmů u *Listeria monocytogenes*. Mlékařské listy, 112, 12-15.
- GELBÍČKOVÁ T., ŠTÁSTKOVÁ Z., POSPÍŠILOVÁ M., KARPÍŠKOVÁ R. (2008): Charakteristika izolátů *Listeria monocytogenes* z mléčných výrobků. Veterinářství (58), 5, 324-326.
- LEMON, KP, HIGGINS, DE, KOLTER, R. Flagellar motility is critical for *Listeria Monocytogenes* biofilm formation
- NAŘÍZENÍ KOMISE o mikrobiologických kriteriích pro potraviny 2073/2005 a 1441/2007

Přijato do tisku 19. 2. 2010

Lektorováno 10. 3. 2010