

a kmenů, které v daném mlékárenském provozu představují technologické nebo zdravotní riziko. Výsledky mohou být aplikovány jak na nesporetné bakterie, tak na vegetativní buňky sporetných bakterií.

Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou MŠMT při řešení projektu 2B06048 "Mikrobiologická rizika mlékárenských výrob - detekce a preventivní opatření" a výzkumného záměru MSM 2672286101 "Mléko - významná součást zdravé a bezpečné výživy".

Literatura

- BARTOSZEWICZ M., HANSEN B.N., SWIECICKA I. (2008): The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated milk. *Food Microbiol.* 25, s. 588 - 596.
- BATT C.A. (2000): *Bacillus, Bacillus cereus*. In book ROBINSON R.K., BATT C.A., PATEL P.D. (Eds.): *Encyclopedia of food microbiology*, s. 119 - 124. Academic Press, London, U.K. ISBN 0-12-227070-3.
- BYRNE B., DUNNE G., BOLTON D.J. (2006): Thermal inactivation of *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens* vegetative cells and spores in pork luncheon roll. *Food Microbiol.* 23, s. 803 - 808.
- CARLIN F., BRILLARD J., BROUSSOLLE V., CLAVIL T., DUPOUR C., JOBIN M., GUINEBRETIERE M.H., ANGU S., SOROKINE A., NGUYEN-THÉ CH. (2010): Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Res. Int.* 43, s. 1885 - 1894.
- COSENTINO S., MULARGIN A.F., PISANO B., TUVERI, P., PALMAS, F. (1997): Incidence and biochemical characteristics of *Bacillus* flora in Sardinian dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 38, s. 235 - 238.
- HARRIGAN W.F. (1998): *Laboratory methods in food microbiology*, s. 123 - 127. Academic Press, London, U.K. ISBN 978-0-12-326043-7.
- HAVLOVÁ J., JIČIŇSKÁ E., HRABOVÁ H. (1993): *Mikrobiologické metody v kontrole jakosti mléka a mlékárenských výrobků*, s. 50 - 59, 110 - 113. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, ISBN 80-85 120-37-2.
- JANŠTOVÁ B., LUKÁŠOVÁ J. (2001): Heat resistance of *Bacillus* spp. spores isolated from cow's milk and farm environment. *Acta Vet. Brno* 70, s.179 - 184.
- LOGAN N.A., DEVOS P. (2009): Genus I. *Bacillus*. In book DEVOS P., GARRITY G.M., JONES D., KRIEG N.R., LUDWIG W., RAINLEY F.A., SCHLEIFER K.H., WHITMAN W.B. (Eds.): *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 3 *The Firmicutes*, 2nd Edition, s. 21 - 108. Springer Science + Business Media, New York, USA. ISBN 978-0-387-95041-9.
- MOLVA C., SUDAGIDAN M., OKUKLU B. (2009): Extracellular enzyme production and enterotoxigenic gene profiles of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains isolated from cheese in Turkey. *Food Control*, 20, s.829 - 834.
- NAZAROWEC-WHITE M., FARBER J.M. (1997): Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Lett. Appl. Microbiol.* 24, s. 9 - 13.
- ROBINSON R.K. (2002): *Dairy microbiology handbook*. The microbiology of milk and milk products, s. 44 - 49. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA. ISBN 9780471385967.
- STEPANIAK L. (2003): Psychrotrophic bacteria. Bacteria other than *Pseudomonas* spp. In book ROGINSKI H., FUQUAY J. W., FOX, P. F. (Eds.): *Encyclopedia of dairy science*, s. 2344 - 2351. Academic Press, London, U.K. ISBN 0-12-227235-8.
- TE GIFFEL M., BEUMER R., HOEKSTRA J., ROMBOUTS F.M. (1995): Germination of bacterial spores during sample preparation. *Food Microbiol.* 12, s. 327 - 332.
- VAN ASSELT E.D., ZWIETERING M.H. (2006): A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 107, s. 73 - 82.
- ČSN EN ISO 4833 Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C, ČNI, Praha, 2003.

Přijato do tisku 3. 2. 2011
Lektorováno 14. 3. 2011

VYBRANÉ POZNATKY V OBLASTI MIKROBIOLOGIE SYROVÉHO KRAVSKÉHO MLÉKA V ČR

Snášelová Jana

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Selected findings in the field of raw cow milk microbiology in the CR

Abstrakt

Literární přehled shrnuje výsledky a poznatky v oblasti mikrobiologické kvality syrového kravského mléka v ČR v letech 2008-2010, a to zejména:

Monitoring mikrobiologické kvality mléka ke zjištění užítkovosti dojníc a proplácení mléka

Studium skupin patogenních a technologicky nežádoucích mikroorganismů, zejména rodů *Bacillus*, *Listeria*, *Mycoplasma*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*. Výzkumné instituce ve spolupráci s mlékárenskými společnostmi řešily problémy spojené s výskytem, pomnožováním, detekcí a stanovením výše uvedených rodů mikroorganismů a dále také postupy účinné desinfekce a čištění.

Výběr vhodných mikrobiálních kmenů kontaminující mikroflóry jako vhodných matric vzorků pro referenční a instrumentální mikrobiologické metody.

Abstract

The literature review summarizes the results and findings in the field of the microbiological quality of raw cow milk in the CR in 2008-2010.

These include:

Monitoring of microbiological quality of raw milk to determine milk production and milk payment.

Studies of pathogenic and technologically undesirable microorganisms especially of genera *Bacillus*, *Listeria*, *Mycoplasma*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*. Research institutions in cooperation with dairy companies solved the problems associated with the occurrence, propagation, detection and determination of the above genera of microorganisms and procedures for effective disinfection and cleaning.

Selection of suitable microbial strains of contaminating microflora as a suitable matrix reference samples for reference and instrumental microbiological methods.

Úvod

Předložený literární přehled shrnuje výsledky a poznatky v oblasti mikrobiologické kvality syrového kravského mléka v ČR v letech 2008-2010. Problémy řešené v ČR korespondují s evropskými a světovými trendy v uvedené

oblasti. Mikrobiologickou kvalitu syrového mléka lze rozdělit do následujících směrů (<http://www.foodsci.uoguelph.ca>, 2010):

Mikroorganismy: Bakterie, plísňe a kvasinky

Růst mikroorganismů

Detekce a stanovení počtu

Z hlediska skupin mikroorganismů je pozornost zaměřena zejména na sporulující a patogenní.

Bakterie, plísňe a kvasinky v syrovém mléce, růst, pomnožení

Současné poznatky o mikrobiálních rizicích ze syrového mléka a jejich prevenci byly shrnuty v příspěvku na semináři věnovaném farmářským výrobám (Kalhotka, 2009). Autor se zabývá mikroorganismy, které často kontaminují syrové mléko, věnuje pozornost zejména popisu a vlivu patogenních mikroorganismů, způsobujícím alimentární infekce a alimentární intoxikace a to: rodům *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Yersinia*, *Camphylobacter*, *Brucella* a rovněž se zabývá vlivem konkrétních druhů mikroorganismů a to: *Clostridium per-fringens*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticum*. Publikace rovněž zahrnuje základní postupy prevence a ochrany syrového mléka před bakteriální kontaminací.

Sledování mikrobiologické kvality syrového mléka pro účely zpeněžování je pravidelně popisováno a hodnoceno v publikaci "Ročenka chovu skotu v České republice", která je vydávána svazy chovatelů (www.cmsch.cz, 2010).

Z dále uvedené tabulky je patrné, že průměry většiny ukazatelů jakosti syrového mléka nevykazují v období 2007 až 2009 větší rozdíly. Počty somatických buněk, v mnoha podnicích značně přesahující vykázaný průměr (cca 264 tis. v ml mléka), poukazují na výskyt subklinických mastitid a na ekonomické ztráty způsobené především nižší užitkovostí krav. I když průměrný počet somatických buněk odpovídá požadavkům EU i ČR na jakostní mléko, není zcela v souladu s požadavky na zdravé stádo (do 200 tis. v 1 ml). Jednou z možných příčin tohoto stavu může být nedostatečné zohlednění ukazatelů jakosti v nákupní ceně mléka. Podíl pozitivně reagujících vzorků mléka na inhibiční látky se přibližuje hodnotám vykazovaným v mlékařsky vyspělých zemích. I přes uvedené dílčí nedostatky lze konstatovat, že hlavní jakostní ukazatele mléka stanovené předpisy EU (klouzavý geometrický průměr CMP za poslední dva měsíce do 100 tis. a klouzavý geometrický průměr SB za poslední tři měsíce do 400 tis. v 1 ml, negativní test na obsah reziduí inhibičních látek) byly v roce 2009 dodrženy. Zjištěné průměry dosáhly 41 % (CPM) a 66 % (PSB) maximálních hodnot stanovených pro mléko k dalšímu zpracování.

Hlavní patogeny mléčné žlázy, koliformní bakterie a gramnegativní nekoliformní bakterie, k celkovému počtu bakterií v syrovém mléce hodnotí Rysanek a kol. (2009). Studie byla prováděna na 268 českých mléčných stádech

s přibližně 29.000 kravami v bazénových vzorcích syrového mléka. Nejčastěji detekovanými patogeny byly *Enterococcus faecalis* a *Streptococcus uberis*. Pozitivní korelace mezi počtem bakterií dominantních patogenů a relevantním CPM byla zaznamenána u *E. faecalis* a *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *E. faecium* a *Staphylococcus aureus*. Také byla prokázána pozitivní korelace mezi celkovým počtem bakterií a počtem koliformních bakterií i gramnegativních nekoliformních bakterií. Výsledky naznačují soudobou dominanci environmentálních patogenů, zejména streptokoků a enterokoků, nad kontagiózními patogeny mléčné žlázy v bazénových vzorcích.

Vlivem negativního působení dvou mastitidních patogenů a to kvasinky *Candida lusitanae* a řasy *Prototheca zopfii* na biochemické změny syrového mléka se zabývala Seydlová a kol. (2009). Přítomnost těchto patogenů v mléce může být důsledkem probíhajících mykotických mastitid u dojníc. Přídavek takového mléka k mléku na technologické zpracování, bez ohledu na pasterační efekt, má významný negativní vliv na změny obsahu bílkovin, tuku a laktózy vzhledem k enzymatické výbavě mikroorganismů. Tento vliv je pak velmi výrazný při koncentracích mikroorganismů 10^3 a vyšší.

Současný stav mikrobiologické a bakteriologické kvality syrového mléka byl sledován v bazénových vzorcích syrového mléka se zaměřením na záchyt vybraných skupin mikroorganismů (Seydlová, Snášelová, 2010). Ve vybraných vzorcích byly diagnostikovány bakteriální zástupci jako je *S. aureus*, *S. PK-*, *B. cereus*, *E. coli*, plísňe a kvasinky, *Str. agalactiae*, *Str. uberis*, *Enterococcus* spp. Na základě zjištěných nálezů autorky doporučují podrobnější bakteriologickou identifikaci mikroorganismů, jako doplněk standardního posuzování hygienické kvality mléka. Podobné sledování bylo rovněž provedeno v ekologických chovech (Seydlová, 2010).

Cempirkova a Mikulova (2009) sledovaly výskyt psychrotrofních lipolytických bakterií v bazénových vzorcích syrového kravského mléka na osmi mléčných farmách po dobu dvou let. Podrobně byly analyzovány korelace mezi skupinami psychrotrofních lipolytických bakterií a celkovým počtem psychrotrofních a celkovým počtem mezofilních bakterií. Byla prokázána vysoká korelace mezi hodnotami celkového počtu psychrotrofních a počtem psychrotrofních lipolytických bakterií, zatímco korelace mezi celkovým počtem mezofilních a celkovým počtem psychrotrofních bakterií, stejně jako mezi psychrotrofními lipolytickými bakteriemi a celkovým počtem mezofilních bakterií byla na střední úrovni.

Sledované hodnoty volných mastných kyselin se zvyšovaly v závislosti na době skladování a teplotě vzorku mléka.

Významná pozornost byla zaměřena na studium působení bakterií z rodu *Bacillus* od syrového mléka po finální výrobek. Je konstatováno, že tento druh mikroorganismů přechází do výrobků ze syrového mléka (Němečková a kol., 2007; Němečková a kol., 2010 a). Zástupci rodu *Bacillus* jsou aerobní nebo fakultativně

anaerobní grampozitivní bakterie, které jsou schopné tvořit vysoce rezistentní endospory. V rámci rodu vykazují značnou rozmanitost fyziologických vlastností (vztah k hodnotě pH, aktivitě vody, teplotě, koncentraci NaCl). Rod *Bacillus* se vyznačuje značnou proteolytickou a lipolytickou enzymovou aktivitou. Nejsilněji proteolytické kmeny patří k druhům *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. polymyxa*, *B. amyloliquefaciens*. V publikacích je věnována pozornost vadám, které tento rod působí ve sterilovaných výrobcích, sýrech, sušeném mléce a kysaných výrobcích.

Podrobně byl studován výskyt rodu *Bacillus* ve fázových vzorcích z výroby eidamu, kde byl stanoven celkový počet mezofilních mikroorganismů, termorezistentní mikroorganismy a *B. cereus* (Němečková a kol., 2008). Mezi izolovanými mikroorganismy byly zjišťovány *Bacillus cereus* a *Bacillus licheniformis*. Z 83 izolátů rodu *Bacillus* bylo 57 identifikováno jako *Bacillus licheniformis* a 6 jako *Bacillus cereus*. Nižší záhyt *Bacillus cereus* mohl být mj. způsoben vyšším podílem vegetativních buněk (které nepřežívají inaktivační zářev při stanovení termorezistentů) psychrotrofních kmenů v chlazených vzorcích. Naopak stanovené počty termorezistentů mohou být navýšeny, jestliže jsou ve vzorcích přítomny termorezistentní kmeny bakterií mléčného kvašení v počtu vyšším než $1,0 \times 10^5$ JTK/g. Experimentální práce výše uvedeného kolektivu autorů přinesly řadu konkrétních výsledků a zkušeností, které byly poskytnuty výrobním mlékárenským závodům a dalším uživatelům.

Studie působení rodu *Bacillus* byly dále rozšířeny o vliv nežádoucího působení enzymové aktivity *B. cereus* a *B. licheniformis* v mléce. Bylo zjištěno, že na rozdíl od *B. cereus* nepředstavuje *B. licheniformis* významné riziko kažení při chladiřských teplotách (Němečková a kol., 2010 b)

Dalším velmi často sledovaným mikroorganismem byl v posledních dvou letech patogenní druh *Listeria monocytogenes* představující v mléčných výrobcích určité zdravotní riziko pro konzumenty.

Listeria monocytogenes je kataláza pozitivní, malá krátká grampozitivní pohyblivá nesporeující bakterie (tyčinka) z čeledi *Listeriaceae* (Wikipedia, listopad 2010). Jako saprofyt a epifyt kolonizuje trávicí trakt člověka i zvířat, žije také ve vodě, bahně nebo půdě, je schopna kontaminovat potraviny a krmiva a jako potenciální patogen je původce onemocnění lidí i zvířat, listeriózy. Tvoří i kokoidní formy, delší buňky naopak připomínají korynebakterie. Jsou aerobní nebo fakultativně aerobní, nenáročné a schopné růst i při vysokých koncentracích soli. Netvoří spory ani pouzdra, nejsou acidorezistentní, zato jsou pozoruhodně odolné vůči nízkým teplotám a dokážou se množit i při 4 °C. Při teplotě (20-25) °C tvoří pohyblivé bičíky. *L. monocytogenes* je fakultativní intracelulární parazit, schopný proniknout do hostitelské buňky a množit se v ní. Faktory virulence jsou proteiny, které umožňují bakterii žít a množit se v hostitelském organismu.

L. monocytogenes je citlivá k penicilinu, ampicilinu, vancomycinu, ciprofloxavinu, lizenolidům, azithromycinu

a kotrimoxazolu. Betalaktamová antibiotika jsou účinná jen v kombinaci s aminoglykosidy.

Výskytem *L. monocytogenes* v mlékárenských výrobcích a možnostmi jejího potlačení se zabývala Šviráková a kol. (2008). V mlékárenské prvovýrobě může být zdrojem kontaminace *L. monocytogenes* syrové mléko, a to zejména během dojení při nedodržení podmínek správné hygienické praxe. Cílem teoretické studie bylo shrnout poznatky o základní charakteristice a výskytu druhu *L. monocytogenes* v souvislosti s jeho zdravotním rizikem při výrobě mlékárenských výrobků. Studie se také zaměřuje na hledání přirozených způsobů inhibice *L. monocytogenes* v mlékárenských technologiích.

Během mlékárenského zpracování může být růst *L. monocytogenes* významně omezen řadou vnějších faktorů. Jedná se např. o šetrnou pasteraci, která je dostatečná pro tepelnou inaktivaci *L. monocytogenes*. Dále, vyšší tlak oxidu uhličitého prodlužuje lag fázi subletálně poškozených buněk *L. monocytogenes*. Další možností inaktivace *L. monocytogenes* v mlékárenských výrobcích je použití komerčních preparátů obsahujících specifické bakteriofágy atakující listeriální buňky, které pro spotřebitele nepředstavují zdravotní riziko, a které nemají negativní vliv na funkční a organoleptické vlastnosti finálních výrobků (např. bakteriofágový preparát Listex™ P100, O.K. Servis BioPro, Česká republika). Autoři konstatují, že všechna výše zmíněná opatření jsou účinná pouze za předpokladu, že výrobci mlékárenských výrobků dodržují ve všech fázích výroby a distribuce výrobků předepsané postupy.

Purkrtová a kol. (2009) studovaly podmínky pro tvorbu biofilmu u *Listeria monocytogenes* v modelovém systému za použití mikrotitračních destiček a nalezení účinného desinfekčního prostředku k odstranění biofilmu a inaktivace mikroorganismu v něm. Sbírkový kmen *Listeria monocytogenes* CCM 7202 (ATCC 13932) a průmyslový izolát *Listeria monocytogenes* byly porovnány ve svých schopnostech tvořit biofilm. Z testovaných médií a teplot (8, 25, 30 a 37) °C byly jako optimální pro tvorbu biofilmu vyhodnoceny pufovaná peptonová voda obsahující 0,05 % glukosy a teplota 30 °C. Na vzniklý biofilm byly vyzkoušeny desinfekční přípravky Merades Alco (směs ethanolu a propanolu) a 50 % etanol. Žádný z testovaných přípravků nebyl schopen zcela odstranit vzniklý biofilm, ale při testování následného růstu po ošetření desinfektantem, se jako nejúčinnější ukázalo 30 minutové působení prostředku Merades Alco.

Sledování fyziologických a biochemických vlastností *Listeria monocytogenes* *in vitro* prováděly Pechačová a kol. (2010). U izolovaných kmenů uvedeného mikroorganismu byla zjišťována schopnost přežít v různých podmínkách, simulujících podmínky mlékárenských technologií a zaživacího traktu. Z výsledků plyne, že *Listeria monocytogenes* byla poměrně odolná vůči teplotním podmínkám (2-45)°C, kyselosti prostředí pH (4-9) i vysoké koncentraci NaCl. Ze studie vyplývá, že k zajištění bezpečnosti vyráběného mléčného produktu plyne nutnost dodržovat předepsané teploty a výdrže zářevu k odstranění nebezpečí kontaminace bakterií *Listeria monocytogenes*.

Jaglic a kol. (2010) testovali epidemiologickou příbuznost pomocí pulzní gelové elektroforézy a za využití *in-vitro* metod na schopnost vytvořit biofilmovou a antimikrobiální rezistenci geograficky příbuzné izoláty *Staphylococcus epidermidis* z lidských pacientů, mléčných farem (farmáři a syrové kravské mléko) a také mlékáren. Bylo zjištěno, že izoláty od zemědělců a dojníc jsou geneticky příbuzné, zatímco izoláty od lidských pacientů byly velmi rozmanité. Rovněž byly identifikovány a charakterizovány methicilin-rezistentní kmeny. Tato studie naznačuje možný přenos *S. epidermidis* mezi skotem a farmáři. Neprokázalo se, že by mléčné výrobky byly významným zdrojem infekcí lidí nebo tvorby methicilin-rezistentních kmenů.

Dalším sledovaným mikroorganismem vyskytujícím se v syrovém mléce je *Mycoplasma bovis* (<http://fv1.vfu.cz>, 2010). Jsou to nejmenší prokaryotické buňky trvale postrádající buněčnou stěnu, protože nemají schopnost syntetizovat peptidoglykan. Z toho vyplývá, že buňky mají různý tvar, od sférické struktury až po větvená nebo helikální vlákna. Na povrchu jsou buňky opatřené flexibilní trojvrstevnou vnější membránou. Baktérie rodu *Mycoplasma* se běžně vyskytují buď ve tvaru kulatých a ovoidních buněk průměrné velikosti 0,3-0,8 μm , nebo vláken dlouhých několik až 150 μm , nebarví se metodou podle Grama. Fylogeneticky se klasifikují ke grampozitivním bakteriím, netvořícím endospory, obvykle jsou nepohyblivé a fakultativně anaerobní. Většina druhů je hostitelsky vysoce specifická, k replikaci nedochází v prostředí mimo hostitele. Druhy patogenní pro zvířata jsou řazeny do rodů *Mycoplasma* a *Ureaplasma*. Vzhledem k absenci peptidoglykanu ve stěně jsou přirozeně rezistentní k penicilinu a ostatním betalaktamům. Velmi dobrou citlivost prokazují vůči účinkům substancí ze skupin makrolidů, tetracyklinů, aminoglykosidů, pleuromutilinů a fluorovaných chinolonů.

Přežívání mikroorganismu *Mycoplasma bovis* při teplotách $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ studovala Vyletělová (2010). Výše uvedené teploty byly voleny s ohledem na stanovení, které nenásleduje bezprostředně po odběru vzorků. Skladování při výše uvedených teplotách bylo prováděno po dobu 5 týdnů. Při dvou nižších teplotách bylo prováděno stanovení jednou týdně a byl také sledován vliv rozmrazování a opětného zmrazení. Při tomto způsobu byl úbytek počtu kolonií *M. bovis* vyšší než při jednorázovém rozmrazení. Teplota $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ umožnila stanovení nejpozději do 3 dnů po odběru, pak byl pokles počtu již velmi rapidní. Nejstabilněji po dobu 5 týdnů se chovaly vzorky při skladovací teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (nejmenší úbytek počtu kolonií *Mycoplasma bovis*).

Z dalších sledovaných skupin mikroorganismů syrového mléka je možno uvést např. rod *Enterococcus*, kterým se zabývala práce Kučerové a kol. (2009). Celkově 33 izolátů rodu *Enterococcus* (ze syrového mléka s počtem 10^3 - 10^5 CFU ml^{-1} , z čerstvých sýrů 10^2 - 10^6 CFU ml^{-1} a z polotvrdých sýrů 10^3 - 10^5 CFU g^{-1}) bylo testováno na dekarboxylázovou aktivitu s cílem zjistit tvorbu biogenních aminů. Z celkového počtu izolátů bylo vybráno 8 kmenů s nejvyšší dekarboxylázovou aktivitou, tyto kmeny pak

byly identifikovány a dalšími speciálními metodami byla sledována produkce biogenních aminů.

Detekce, stanovení, sanitační

Konsorcium několika evropských společností, asociací a výzkumných center (MILCOM a.s., 2009) společně pracovalo na projektu 6. rámcového programu, projektu nazvaném PATHOMILK. Předmětem tohoto projektu bylo vyvinout rychlý analyzátor pro více patogenů pro detekci většiny obecných patogenů, které mohou nakazit zvířata na mléčných farmách. Přístroj PATHOMILK je netradiční biosenzor založený na metodě DNA/RNA - hybridizace a využívající k detekci povrchovou plasmonovou rezonanci. Prototyp přístroje, který je průběžně testován, umožňuje detekci patogenů *E. coli* a *S. aureus* za cca 15 minut s limitem detekce 10^2 - 10^3 CFU/ml, což znamená, že má kapacitu k rozeznání subklinických případů mastitidy.

Klasickými kultivačními metodami stanovení proteolytických mikroorganismů a jejich enzymů v mléce se zabývala Němečková a kol. (2009 a). Testovány byly jednoduché, levné a v provozních podmínkách dostupné plotnové metody stanovení proteolytických mikroorganismů a jejich enzymů. Porovnány byly půdy pro kultivační stanovení proteolytických mikroorganismů - Calcium Caseinate agar, Calcium Caseinate agar s přidáním mléka a GTK agar s 10 % obj. sterilního mléka. Všechny tři poskytly kvantitativně srovnatelné výsledky, navíc počet všech mikroorganismů narostlých na GTK agaru s mléka odpovídal celkovému počtu mikroorganismů podle ČSN EN ISO 4833. Difuzní agarová metoda stanovení proteolytických enzymů je vhodná zejména ke studiu vlastností jednotlivých enzymů. Aplikace metody na mléko je limitována relativně nízkou koncentrací enzymů a rozdílnými podmínkami jejich aktivity.

Kmenově specifickou detekci *Bacillus cereus* a *Bacillus licheniformis* v syrovém a pasterovaném mléce a jogurtu během zpracování studovali Banyko a Vyletělová (2009). Náhodně vybrané izoláty rodu *Bacillus* byly podrobeny analýze PCR, kde jeden primer, odvozený od repetitivní sekvence elementu BOX, byl použit pro druhovou identifikaci s použitím fingerprintů (spekter amplifikačních produktů). Izoláty byly rozděleny do 6 rozdílných fingerprintů. Výsledky ukazují, že metoda PCR BOX mapování je vhodná pro charakteristiku populace rodu *Bacillus* v mlékárenském prostředí. Může být použita k potvrzení kontaminace životního prostředí, případně přenosu klonů kmenů *Bacillus* v průběhu technologického zpracování mléka.

Možnosti impedančních metod pro mlékárenskou praxi studoval Černý a kol. (2008). Pro stanovení termoresistentních aerobních mikroorganismů byla testována nepřímá impedanční metoda, s použitím Tryptone soya broth (TSB) s 1% sušeného mléka podle doporučení výrobce přístroje RABIT (DWS, UK). Ukázalo se, že metoda je vhodná pro studium vlastností jednotlivých čistých kmenů rodu *Bacillus*, ale není vhodná pro stanovení skupiny termoresistentních aerobních plynotvorných mikroorganismů

v syrovém mléce. Stejný kolektiv autorů použil tuto metodu, v aranžmá doporučeném výrobcem přístroje, pro stanovení skupiny psychrotrofních mikroorganismů v syrovém mléce. V tomto případě je možno uvažovat o využití této metody v praxi.

Vývoj a odzkoušení moderní metody pro simultánní detekci rodu *Listeria* a *Listeria monocytogenes* popisuje Blažková (2007). Stanovení *Listeria monocytogenes* v potravinách normou předepsaným způsobem je časově náročná klasická kultivační metoda (cca 5-8) dnů. Včasná diagnostika je, vzhledem k progresivnímu průběhu onemocnění listeriózou, velmi důležitá, a proto je v posledních letech vyvíjen značný tlak na vývoj rychlých screeningových metod. Během uvedené práce se podařilo připravit imunochromatografický test (NALFIA - Nucleic Acid Laterál Flow ImmunoAssay), který dokáže spolehlivě určit přítomnost nukleových kyselin *Listeria monocytogenes*. Vyvinutý test je spolu se specifickou detekcí *L. monocytogenes* je schopen odhalit také přítomnost ostatních bakterií z rodu *Listeria*.

Výzkumem a způsoby likvidace biofilmů na kontaktních površích technologických celků v zemědělské prvovýrobě i mlékárenském průmyslu představuje prokazatelné zdravotní riziko (Vlková a kol., 2007). Důvodem je skutečnost, že vedle zdravotně nevýznamných mohou obsahovat i patogenní mikroorganismy, které mohou sekundárně kontaminovat produkované výrobky. Ke kvalitní likvidaci biofilmů v potrubních systémech dojřen a mlékárenských závodů se používají sanitační agens (biocidy) používané v těchto systémech a podmínkách v souladu s platnou legislativou EU. Testování účinnosti biocidů je prováděno pomocí standardních suspenzních testů. Všechny suspenzní testy prokázaly, že mikroorganismy v nich použité jsou likvidovány snadněji v modelových podmínkách laboratoří než v reálných podmínkách prvovýroby nebo potravinářského průmyslu.

Enterotoxigenní kmeny *Staphylococcus aureus* v syrovém mléce představují možné zdravotní riziko pro spotřebitele a identifikace takových kmenů by měla být používána jako součást analýzy rizik mléka a mléčných výrobků. Hlavním účelem této studie bylo zkoumat výskyt enterotoxigenních kmenů *S. aureus* v syrovém mléce dodaného ke zpracování v České republice (Zouharova a Ryšánek, 2008). Studie byla prováděna pomocí vícenásobné polymerázové řetězové reakce (PCR) a reverzní pasivní latexové aglutinace (RPLA). Bylo vyšetřeno 440 bazénových vzorků mléka z 298 mléčných stád. Výsledkem studie je podrobná identifikace nalezených stafylokokových enterotoxinů.

Slaná a kol. (2008) sledovali šíření *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* v individuálních a bazénových vzorcích syrového mléka detekované prostřednictvím IS900 a F57 pomocí real-time kvantitativní PCR metody. Byl vyvinut systém využívající PCR v reálném čase s dvěma páry primerů, který je specifický pro detekci uvedeného mikroorganismu. Tato metoda PCR v reálném čase amplifikuje při kvalitativní analýze vícekopiový

vícenásobný element IS900 a jednokopiový element F57 při kvantitativní analýze. Výše uvedený postup je možno využít jako rychlé, levné a citlivé detekční metody pro *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* v syrovém mléce pro běžné používání. Na 345 jednotlivých vzorcích mléka byly porovnávány výsledky vyvinutého metodického postupu (real time qPCR test) a kultivační metody. Jako méně citlivá se projevila kultivační metoda, protože cca 1/3 vzorků byla pozitivní při real time qPCR testech, ale žádný vzorek mléka nebyl pozitivní při kultivaci.

Kontrolu a monitorování úrovně a účinnosti sanitace v mlékárenských provozech řešila Kunová a kol. (2009). V rámci kontroly úrovně a účinnosti sanitace výrobních celků byly vybrány některé rizikové technologie, kde byly testovány různé metody detekce mikroorganismů na povřích a odzkoušeny některé z tzv. nepřímých rychlých kontrolních metod dostupných na našem trhu, a to: přístroj **HY-LITE**[®] na měření adenosintrifosfátu (ATP); test **PRO-TECT**[™] **Clean-Trace, Surface Protein Plus**, za pomoci kterého lze detekovat proteiny a redukující sacharidy zůstávající při nedokonalém vyčištění zařízení; obtiskové testy - **Hygicult**[®] **TPC** na celkové počty a kontaktní misky **TSA - Trypton Soya Agar s disinhibitorem**, médium pro stanovení počtu kolonií po úklidu a dezinfekci; **GTK agar** a **Petrifilm**[™] **Aerobic Count Plates** pro stanovení celkového počtu mikroorganismů.

Metoda bioluminiscence (za pomoci měření ATP) se prokázala jako vysoce citlivá metoda, která je rychlým indikátorem celkového organického znečištění a zahrnuje taky mikrobiální kontaminaci, i když neříká nic o zastoupení jednotlivých druhů. Autoři konstatují, že rychlé screeningové metody mají v praxi své opodstatnění a poskytují některé výhody ve srovnání s tradiční kultivační metodou a doporučují výrobcům je používat v praxi ve větším měřítku.

Prevalenci vybraných bakteriálních druhů na povrchu mlékárenských zařízení zjišťovali Kunová a Roubal (2010). Nejvíce zastoupenými mikroorganismy byly blíže nespecifikované koaguláza-negativní stafylokoky (28 izolátů), následoval *Bacillus cereus* (25 izolátů), dále pak *Staphylococcus epidermidis* (22 izolátů), *Staphylococcus warneri* (8 izolátů), *Klebsiella* sp. (4 izoláty), po dvou izolátech *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii* a po jednom izolátu *Staphylococcus chromogenes*, *Pantoea* sp., *Listeria monocytogenes*, *Bacillus firmus* a *Bacillus laterosporosus*.

O řešení projektu s názvem "Mikrobiologická rizika v mlékárenských výrobcích - detekce a preventivní opatření" informuje práce Němečkové a kol. (2009 b). Hlavními cíli projektu je optimalizovat metody detekce a stanovení patogenních mikroorganismů a jejich toxinů (dle Nařízení č. 1441/2007 - *Salmonella* sp., koagulázopozitivní stafylokoky, stafylokokové enterotoxiny, *L. monocytogenes*, *Ent. sakazakii*, *B. cereus*, *Enterobacteriaceae*, *E. coli*), a dále metody detekce a stanovení vybraných technologicky nežádoucích mikroorganismů (*Enterococcus* sp., plyn produkující klostridia, *Bacillus* sp.,

B. cereus, *B. sporothermodurans*), zavést NALFIA metody pro paralelní detekci *L. monocytogenes* a *Listeria* sp. a navrhnout preventivní a nápravná opatření proti výskytu a nežádoucím aktivitám výše zmíněných mikroorganismů.

Potřeby nastavení přístrojů pro instrumentální rutinní stanovení mikrobiologických parametrů syrového mléka vyžadují vybrat vhodnou matici vzorku (Peroutková a kol., 2010). Tyto vzorky jsou obvykle skladovány při teplotě - 40 °C, kdy už dochází k poklesu počtu živých mikroorganismů, které jsou pak pod mezí detekce při stanovení klasickou plotnovou metodou, ale detekovatelné instrumentálními metodami. Práce byla zaměřena na výběr vhodného kmene a zároveň na výběr vhodného kryoprotekčního média pro vzorky sloužící na kontrolu přístrojů, aby bylo zamezeno získání rozdílných výsledků při použití klasických a instrumentálních metod. Na základě zjištěných výsledků autoři navrhli jako nejvhodnější substrát tvořený destilovanou vodou se 4,5 % laktózy v kombinaci s kmenem *Staphylococcus aureus* (CCM 4516).

Závěr

V letech 2008-2010 byla oblast mikrobiologie syrového kravského mléka v ČR zaměřena na:

Monitoring mikrobiologické kvality mléka pod patronací České společnosti chovatelů, a.s.;

Studium skupin patogenních a technologicky nežádoucích mikroorganismů, zejména rodů *Bacillus*, *Listeria*, *Mycoplasma*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*. Tyto práce byly prováděny výzkumnými pracovníci ČR ve spolupráci s výrobními společnostmi. Byly řešeny problémy spojené s výskytem, pomnožováním, detekcí a stanovením výše uvedených skupin mikroorganismů a dále také postupy účinné desinfekce a sanitace.

Výběr vhodných mikrobiálních kmenů kontaminující mikroflóry jako vhodných matic vzorků pro porovnání referenčních a instrumentálních mikrobiologických metod.

Poděkování

Tato práce byla provedena za finanční podpory výzkumného záměru MSM2672286101.

Literatura

BANYKO J., VYLETĚLOVÁ M. (2009): Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Letters in Applied Microbiology* 48, s. 318-323.

CEMPIRKOVÁ R., MIKULOVA M. (2009): Incidence of psychrotrophic lipolytic bacteria in cow's raw milk. *Czech Journal of Animal Science* 54, s. 65-73.

ČERNÝ V., HAVLÍKOVÁ Š., KVASNIČKOVÁ E. (2008): Využití impedančních metod v mlékárenské praxi: Stanovení skupiny psychrotrofních mikroorganismů v syrovém mléce. *Mlékařské listy*, (106), s. 17-21.

ČERNÝ V., HAVLÍKOVÁ Š., KVASNIČKOVÁ E. (2008): Využití impedančních metod v mlékárenské praxi 2: Stanovení skupiny aerobních termoresistentních mikroorganismů v syrovém mléce. *Mlékařské listy*, (106), s. 22-24.

JAGLIČ Z., MICHU E., HOLASOVA M., VLKOVA H., BABAK V., KOLAR M., BARDON J., SCHLEGELOVA J. (2010): Epidemiology and characterisation of *Staphylococcus epidermidis* isolates from humans, raw bovine milk and dairy plant. *Epidemiology and Infection* 138, (5), s. 772-782.

KALHOTKA L. (2009): Mikrobiální rizika ze syrového mléka a jejich prevence. Sborník referátů ze semináře, Farmářská výroba sýrů a kysaných mléčných výrobků VI, MZLU v Brně.

KUČEROVÁ K., SVOBODOVÁ H., TŮMA Š., ONDRÁČKOVÁ I., PLOCKOVÁ M. (2009): Production of Biogenic Amines by Enterococci. *Czech J. Food Sci.* 27, (6).

KVAPILÍK J., RŮŽIČKA Z., BUCEK P. A KOL. (2010): Ročenka chovu skotu v České republice (Hlavní výsledky a ukazatele za rok 2009), Praha, (www.cmsch.cz)

KUNOVÁ G., PECHAČOVÁ M., PEROUTKOVÁ J., ROUBAL P., JAGLIČ Z., PAZLAROVÁ J. (2009): Kontrola a monitorování úrovně a účinnosti sanitace v mlékárenských provozech. *Mlékařské listy*, (116), s. 18-23.

KUNOVÁ G., ROUBAL P., JAGLIČ Z., PAZLAROVÁ J., PECHAČOVÁ M., PEROUTKOVÁ J. (2010): Monitorování účinnosti sanitace a prevalence některých mikroorganismů v mlékárenských provozech, Sborník přednášek, Kroměřížské mlékařské dny.

MILCOM a.s. (2009): PATHOMILK - nový nástroj managementu pro zdraví stáda, 6. rámcový program EU, projekt PATHOMILK. *Mlékařské listy*, (116), s. 27-28.

NĚMEČKOVÁ I., ČERVENKOVÁ L., ROUBAL P., PECHAČOVÁ M. (2009 a): Plotnové metody stanovení proteolytických mikroorganismů a jejich enzymů v mléce. *Mlékařské listy*, (113-114), s. 14 - 18.

NĚMEČKOVÁ I., HANUŠOVÁ J., BUŇKA F., ROUBAL P. (2010 b): Nežádoucí enzymové aktivity *B. cereus* a *B. licheniformis* v mléce. *Mlékařské listy*, (123), s. X-XIII.

NĚMEČKOVÁ I., KUČEROVÁ K., ROHACKÁ H., TŮMA Š., BLAŽKOVÁ M., PURKRTOVÁ S., RAUCH P., PAZLAROVÁ J., DEMNEROVÁ K., PLOCKOVÁ M., ROUBAL P. (2009 b): Mikrobiologická rizika v mlékárenských výrobcích - detekce a preventivní opatření. Sborník příspěvků XXXV. Seminář o jakosti potravin a potravinových zdrojů, MZLU v Brně.

NĚMEČKOVÁ I., PECHAČOVÁ M., ROUBAL P., VYLETĚLOVÁ M., NEJESCHLEBOVÁ L., TŮMA Š. (2008): Výskyt termoresistentních aerobních mikroorganismů, *Bacillus cereus* a *Bacillus licheniformis* ve výrobě sýrů eidamského typu. *Mlékařské listy*, (108), s. 17-21.

NĚMEČKOVÁ I., ROUBAL P., PECHAČOVÁ M., UHROVÁ B., SOLICHOVÁ K., PLOCKOVÁ M. (2010 a): *B. cereus* a další bacily v mléce - význam pro mlékárenské technologie, Sborník přednášek, Kroměřížské mlékařské dny.

NĚMEČKOVÁ I., ROUBAL P., PECHAČOVÁ M., VYLETĚLOVÁ M., NEJESCHLEBOVÁ L. (2007): Význam bakterií z rodu *Bacillus* při výrobě sterilovaných a jiných mlékárenských výrobků. *Mikrobiologie potravin*, Sborník ze semináře, Třešť.

PECHAČOVÁ M., PEROUTKOVÁ J., NĚMEČKOVÁ I., KUNOVÁ G., ROUBAL P. (2010): Sledování fyziologických a biochemických vlastností *Listeria monocytogenes* in vitro. *Mlékařské listy*, (119), s. 25-28.

PEROUTKOVÁ J., ELICH O., PECHAČOVÁ M., ROUBAL P. (2010): Výběr vhodné matrice vzorku pro stanovení mikrobiologických parametrů instrumentálními metodami. *Mlékařské listy*, (118), s. 12-15.

PURKRTOVÁ S., PILCHOVÁ T., ĐURIŠOVÁ J., DEMNEROVÁ K., PAZLAROVÁ J. (2009): Podmínky tvorby biofilmu u *Listeria monocytogenes*. *Mlékařské listy*, (112), s. 12-15.

RYSÁNEK D., ZOUHAROVA M., BABAK V. (2009): Major mammary pathogens as contributors to total bacterial counts in raw milk. *Acta Veterinaria Brno*, 78: 3, s. 455-461.

SEYDLOVÁ R. (2010): Hygienická kvalita mléka v ekologických chovech ČR, *Mlékařské listy*, (123), s. VII-IX.

SEYDLOVÁ R., SNÁŠELOVÁ J. (2009): Vliv obsahu *Prototheca zopfii* a *Candida lusitanae* na kvalitu syrového mléka. *Mlékařské listy*, (112), s. 15-22.

SLANA I., KRALIK P., KRALOVA A., PAVLIK I. (2008): On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *International Journal of Food Microbiology*, 128, s. 250-257.

SEYDLOVÁ R., SNÁŠELOVÁ J. (2010): Sledování mikrobiologické a bakteriologické kvality syrového mléka. *Mlékařské listy*, (121), s. 31-35.

ŠVIRÁKOVÁ E., TICHOVSKÝ P., PLOCKOVÁ M., PAZLAROVÁ J. (2008): Výskyt *Listeria monocytogenes* v mlékárenských výrobcích a možnosti jejího potlačení. *Mlékařské listy*, (111), s. 38-43.

VLKOVÁ H., BABÁK V., HOLASOVÁ M., SCHLEGELOVÁ J. (2007): Biofilmy a sanitace v prvovýrobě mléka a v mlékárenském průmyslu. *Mikrobiologie potravin*, Sborník ze semináře, Třešť, 2007.

VYLETĚLOVÁ M. (2010): The survival of *Mycoplasma bovis* at Different Temperatures, *Czech J. Food Sci* 28, (1).

www.foodsci.uoguelph.ca/dairyedu/micro.html, listopad 2010.

Listeria monocytogenes, http://cs.wikipedia.org/wiki/Listeria_monocytogenes, listopad 2010