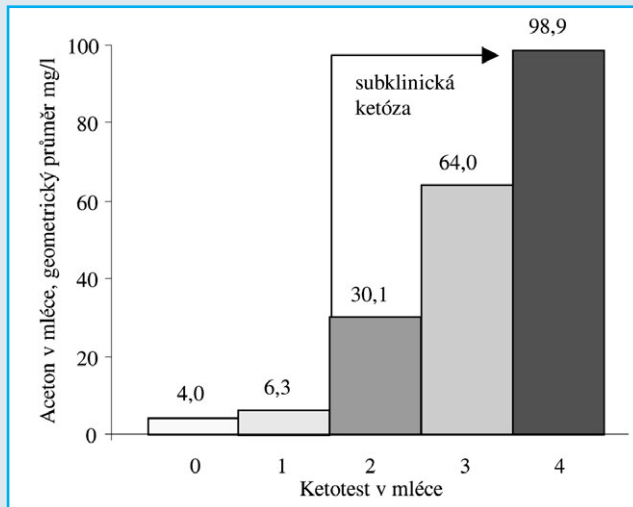


**Obr 3** Obsahy acetonu v mléce pro jednotlivé třídy reakce Ketotestu v mléce.



pomocí kalibrované infračervené spektroskopie na principu MIR-FT provedl rovněž Hansen (1999), který zjistil u vzorků kolísajících od 0 do 2,8 mM acetonu a při koeficientu determinace 0,81 a správnosti 0,27 mM uspokojivou přesnost pro klasifikaci dojníc do dvou skupin, zdravá a pravděpodobně ketózní. Podobně Heuer a kol. (2001), zde byl zjištěn treshold (práh) pro subklinickou ketózu v hodnotě od 0,4 do 1,0 mM.

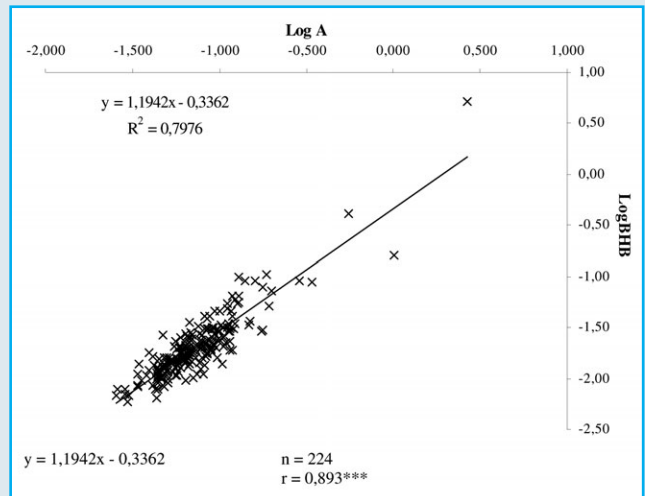
V namátkově vybrané stáji, v individuálních vzorcích mléka, byla stanovena koncentrace ketonů (A aceton, BHB betahydroxybutyrát) v log jednotkách na zařízení Foss 6000 FT technologií MIR-FT, bez referenčních výsledků, na stávajících hladinách kalibrace. Na Obr. 4 je výsledek lineární regrese mezi hodnotami log A a log BHB. Byl zjištěn vysoký a také vysoce významný korelační koeficient 0,893 ( $P < 0,001$ ) pro 224 párových měření vzorků mléka (krav). Hodnota ukazuje, že 79,8 % variability v BHB je vysvětlitelných variabilitou v A. Uvedené potvrzuje logický fakt, že se vzrůstající ketózou u dojníc vzrůstají souběžně koncentrace všech ketonů v tělních tekutinách. Výsledek však nevypovídá o vztahu k referenční metodě. Ten je teprve prověřován. Také nelze usuzovat na prakticky použitelné identifikační limity pro ketózu nebo vztahy těchto hodnot k případným limitům. Výsledek je zatím pouze informací o trendech ketonů v prověřovaném souboru dojníc.

## Shrnutí a závěr

Relativní variabilita individuálních rozdílů při kalibraci (MIR i MIR-FT) pro majoritní složky mléka jako tuk, bílkoviny a laktózu dohromady a minoritní složky jako močovinu, kyselinu citrónovou a obsah volných mastných kyselin (VMK) byla odhadnuta na 1,00 a 6,12 %, 7,20 a 34,40 %. Metody nepřímého stanovení minoritních složek mléka (MIR-FT, případně MIR) byly pak označeny za vhodné screeningové postupy pro účely monitoringu zdravotního stavu krav, včetně stanovení VMK.

Ačkoliv je mléko, jako multikomponentní systém, velmi náročné na simultánní nepřímou analýzu složek (zejména

**Obr 4** Vztah mezi výsledky určení ketonů ve vybrané stáji metodou MIR-FT (Foss 6000 FT).



z hlediska konstrukce metody a provedení relevantních kalibrací), také pro četné možné interferenční efekty mléčné matrice (především z hlediska eliminace interference a tzv. "očistění" signálu), lze v současné době velmi dobře docílit věrohodných výsledků majoritních složek mléka. Slibné (věrohodné a prakticky interpretovatelné) výsledky však mohou zajistit i některé systémy infraanalýzy, především MIR-FT, také u vybraných, prakticky důležitých složek minoritních jako močovina, kyselina citrónová, volné mastné kyseliny nebo případy ketony.

*Použitá literatura je dostupná u autorů příspěvku.*

*Příspěvek byl podporován prostředky vzdělávacího projektu MŠMT-CZ.1.07/2.3.00/09.0081 a aktivitami Národní referenční laboratoře pro syrové mléko Rapotín.*

*Přijato do tisku 11. 4. 2011*

## BIOFILMY A HYGIENA VÝROBY V MLÉKÁRENSKÝCH PROVOZECH

**Gabriela Kunová<sup>1</sup>, Marta Pechačová<sup>2</sup>, Zoran Jaglič<sup>3</sup>, Jarmila Pazlarová<sup>4</sup>, Petr Roubal<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>- MILCOM a.s.

<sup>2</sup>- Výzkumný ústav mlékárenský s r.o.

<sup>3</sup>- Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno, v.v.i.

<sup>4</sup>- Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

### Biofilms and hygiene in milk processing plants

#### Abstrakt

Jedním z nejčastějších problémů, se kterým se mlékaři potýkají, je problém tvorby biofilmů na povrchu technologických zařízení. V rámci řešení výzkumního projektu MŠMT 2B08074 a záměru 2672286101 byla vypracována certifikovaná metodika 2010/5365/SVS pod názvem Detekce a určení kritických míst výskytu biofilmů v mlé-

kárenských provozech, která se zabývá problematikou výskytu biofilmů, metodami hodnocení hygieny a čistoty výrobních zařízení a prostor mlékárenských závodů. Metodika poskytuje souhrn nejdůležitějších postupů a způsobů kontroly či samokontroly výrobců, kterými je možné uskutečňovat hygienický monitoring a přehled kritických míst v technologii jednotlivých provozů. Důraz je kladen na komplexnost přístupu k problematice, která je nezbytná pro úspěšnou eliminaci rizik spojených s výskytem biofilmů.

**Klíčova slova:** biofilmy, hygiena mlékárenských provozů, sanitace, certifikovaná metodika

## Abstract

One of the most common problems which face the dairy-man is the problem of biofilms on the surface of technological equipment. The outcome of the research project No. 2B08074 and No. 2672286101 of Ministry of education, youth and health is the certified methodology called Detection and identification of critical points of biofilm formation in milk processing plants. This methodology deals with the occurrence of biofilms and evaluation methods of hygiene and cleanliness of manufacturing equipment in dairy plant environment. The methodology provides a summary of important procedures and methods of control or self-control of manufacturers, through which one can make hygienic monitoring. There is also a review of critical points in the dairy technology and operations. Emphasis is placed on the approach to complexity which is necessary for the successful elimination of risks associated with the occurrence of biofilms.

## Úvod

Vzhledem k obecnému výskytu různých typů bakterií v potravinářských provozech jsou biofilmy vážným problémem celého potravinářského průmyslu. Mlékárenské závody se i přes dobrou sanitaci potýkají s rekontaminací v průběhu technologického zpracování mléka, čímž může být ohrožena hygienická nezávadnost a zdravotní bezpečnost výrobků nebo může docházet k jejich znehodnocení změnami senzorických vlastností (tvorba plynu, ztekucení, chuťové vady, tvorba toxinů a nežádoucích metabolitů, aj.). Tyto ložiskové zdroje rekontaminace mohou být způsobeny přítomností biofilmů v technologickém zařízení. Vznik biofilmu je přirozený jev, který probíhá všude tam, kde jsou mikroorganismy a kontaktní povrchy (Schlegelová a kol., 2003). Lázničková a Láznička (2007) uvádějí, že pro mikroby v přírodě je forma existence v biofilmových strukturách naprosto přirozená, vytvářejí komplexní ekosystémy, které představují vyšší a složitější způsob života (předznamenání tkání vyšších organismů). Hlavními faktory, které určují schopnost mikroorganismů tvořit biofilmy jsou jejich povrchové struktury, jako jsou bičíky, fimbrie a složení lipopolysacharidové vnější membrány gramnegativních bakterií, které jsou geneticky

kódované. Je známo, že vlastnosti bakterií rostoucích ve formě biofilmů mohou být výrazně odlišné od vlastností stejných bakterií rostoucích v planktonické formě (Costerton a kol., 1995), což z hlediska bezpečnosti potravin představuje závažný problém. Rychlou detekcí biofilmů je možné minimalizovat zdravotní rizika, ale také finanční ztráty podniků v důsledku pozastavené nevyhovující výroby.

## Certifikovaná metodika

Jedním z výstupů čtyřletého výzkumného projektu MŠMT 2B08074 pod názvem Metody hodnocení úrovně hygieny a účinnosti sanitace výrobních zařízení a prostředí mlékáren, postupy detekce a eliminace perzistentních kmenů jako nástroje kontroly zpracování mléka na kvalitní a bezpečné potraviny, je certifikovaná metodika 2010/5365/SVS. Metodika shrnuje důležité postupy kontroly zpracování mléka a poukazuje na kritická místa jednotlivých technologií, která představují potenciální riziko pro výrobu nezávadných potravin. Metodika je pomůckou pro mlékárny a kontrolní orgány a měla by sloužit k zajištění výroby kvalitnějších a konkurenceschopných mléčných výrobků. Uplatnitelná je zejména v provozech, jako jsou sýrárny, máslárny a výroby pasterovaného, UHT, fermentovaného, sušeného a zahuštěného mléka.

## Popis metodiky

K cílenému odběru stěrů biofilmů byly navrženy zdrsňené odběrové škrabky - vysterilované stěrky z plastu a natáček typu suchý zip. Cílem bylo získat drsnou plochu pro seškrab biofilmů nejenom z povrchových vrstev. Odběr stěrů je vhodné provést do dvou hodin od ukončení pravidelné sanitace v provozech. Kromě stanovení celkového počtu mikroorganismů je vhodné se zaměřit na vybrané rody, resp. druhy bakterií, které se vyznačují afinitou k tvorbě biofilmů, a to např. *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*, koaguláza-pozitivní i negativní stafylokoky, bakterie z rodu *Pseudomonas*, případně další.

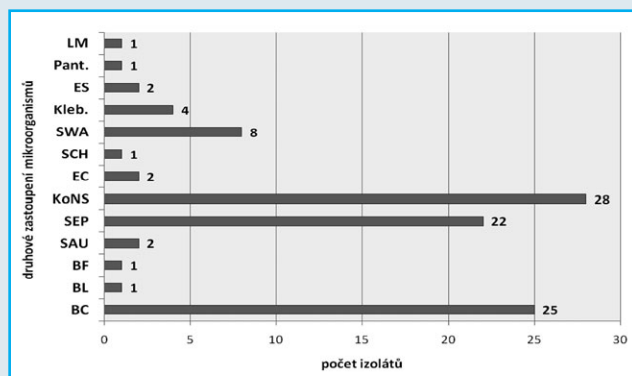
Vhodnou doplňkovou metodou k mikrobiologickému rozboru stěrů je stanovení množství adenosintrifosfátu (ATP, metoda bioluminiscence), kdy prostřednictvím měření ATP je možné přístrojem detekovat přítomnost organických nečistot (zbytků potravin) a zároveň mikrobiologickou kontaminaci. Z dalších doplňkových metod je možné stanovení přítomnosti zbytkových proteinů a redukujících sacharidů, zůstávajících při nedokonalém vyčištění zařízení. Tyto doplňkové metody je výhodné použít v případě potřeby získání rychlé informace o aktuálním stavu hygieny provozu, zda čištění bylo dostatečně efektivní či nikoliv. Výhodami jsou především snadné použití, nezávislost na zkušenostech personálu a rychlá reprodukovatelnost výsledků. Zvláště vhodné jsou tyto metody pro samokontrolu výrobců.

Rizikové technologie se nacházejí v místech s vyšší tvrdostí vody (> 14 °d). Doporučujeme monitorování tvrdosti vody a při zvýšené tvrdosti po ukončení sanitace zařadit cyklus čištění kyselinou citrónovou (2% roztok o teplotě 55 °C, po dobu 30 minut).

Důležitou součástí monitoringu hygieny prostředí je i mikrobiální kontrola ovzduší v jednotlivých provozech. Podle ČSN ISO normy 14698-1,2: 2004 je možné provádět monitoring ovzduší pasivní metodou (tj. spady na Petriho misky), nebo aktivní metodou. Aktivní metody využívají vzorkovače, kdy přesně definovaný objem vzduchu je nasáván do odběrové hlavice a následně usměřován na Petriho misku obsahující agar. Pasivní metoda monitoringu dává lepší obraz toho, co se děje na kritických površích, zatímco pomocí aeroskopu (aktivní aspirace vzduchu) sledujeme mikrobiální obsah v ovzduší (Pitzura, 2001). Výběr konkrétní metody a zařízení bude tedy záviset na účelu, pro který se vzorek odebírá. Sledovat je potřebné celkové počty mikroorganismů a počet kvasinek a plísní (ČSN EN ISO 4833, ČSN ISO 6611). Tyto dvě metody zachycují nejběžnější mikrobiální kontaminanty vzduchu, kterými jsou sporulující mikroorganismy, mikrokoky, kvasinky a plísně. Je obecně známo, že nejvíc zastoupenými bakteriemi v ovzduší ve vnitřních prostorech jsou bakterie z rodů *Staphylococcus*, *Micrococcus* (Bonetta a kol., 2010, Maroni a kol., 1993) a z rodu *Bacillus* (Utescher a kol., 2007). Co se týče zastoupení plísní, nejčastěji jsou v ovzduší přítomny vláknité houby z rodů *Penicillium*, *Aspergillus* a *Cladosporium* (Nevalainen a Seuri, 2005, Utescher a kol., 2007).

Významnou součástí certifikované metodiky jsou standardní operační postupy na izolaci a identifikaci již zmíněných druhů mikroorganismů, které mají vyšší afinitu k tvorbě biofilmů, jsou často izolovány z biofilmových struktur a současně jsou zahrnovány mezi potravinářsky rizikové (z hygienického nebo technologického hlediska). Na základě ISO norem, dostupné literatury a vlastních poznatků byly optimalizovány a zavedeny protokoly pro druhovou identifikaci cílových mikroorganismů. Identifikace mikroorganismů je založena na fenotypových metodách (kultivační vlastnosti, biochemické profily, serotypizace, identifikační

**Obr 1** Prevalence jednotlivých druhů mikroorganismů ve stěrech



LM - *Listeria monocytogenes*, Pant. - rod *Pantoea*, ES - *Enterobacter (Cronobacter) sakazakii*, Kleb. - rod *Klebsiela*, SWA - *Staphylococcus warneri*, SCH - *Staphylococcus chromogenes*, EC - *Escherichia coli*, KoNS - koaguláza-negativní stafylokoky, SEP - *Staphylococcus epidermidis*, SAU - *Staphylococcus aureus*, BF - *Bacillus firmus*, BL - *Bacillus laterosporus*, BC - *Bacillus cereus*

antimikrobiální rezistence apod.) a také na genotypových metodách (PCR identifikace druhově specifických genů včetně vybraných genů virulence).

Zvýšené riziko tvorby biofilmů je u mikroorganismů, které tvoří tzv. extracelulární polysacharidové substance (EPS). Jako orientační metoda pro sledování tvorby EPS může posloužit kultivační metoda na agarové půdě s kongo červení.

### Prevalence vybraných bakteriálních druhů v biofilmech

V průběhu řešení výše uvedeného výzkumného projektu bylo odebráno 90 stěrů z povrchů technologických zařízení různých mlékárenských provozů a byly následně podrobeny mikrobiologickému rozboru. Ve stěrech byla sledována přítomnost následovných bakteriálních druhů resp. rodů: *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Cronobacter (Enterobacter) sakazakii*, koaguláza-pozitivní i negativní stafylokoky a bakterie rodu *Klebsiela*.

Informace týkající se použitého materiálu a metodik jsou podrobně uváděny v předcházejících publikacích (Kunová a kol., 2009 a 2010).

**Tab. 1** Rozdělení mlékárenských provozů dle technologií a doporučená odběrová místa stěrů k detekci biofilmů a doporučená cílená detekce mikroorganismů (MO)

Provoz	doporučená odběrová místa stěrů k detekci biofilmů	doporučená cílená detekce následovných MO
Sýrárny	zásobní tanky, ventily, výpustě, ohřivač mléka, výrobníky, lisovací vany, předlisovací vany - perfore, solné lázně, nože na porcování sýrů	stanovení přítomnosti bakteriofága, heterofermentativní laktobacily, <i>Escherichia coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , kvasinky, koaguláza-pozitivní stafylokoky, sporulující MO (rod <i>Clostridium</i> , rod <i>Bacillus</i> )
Máslárny	zásobní tank na smetanu, zmáseľňovač, těsnění, ventily	čeleď <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Escherichia coli</i> , rod <i>Pseudomonas</i> , koaguláza-pozitivní stafylokoky
Výroba pasterovaného a UHT mléka	cisterny, vyrovnávací nádrže, zásobní tanky na mléko, pastér, aseptické tanky, plnicí hlavy	čeleď <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , kvasinky, rod <i>Pseudomonas</i>
Výroba zahuštěného a sušeného mléka	odparka, standardizační tanky, ventily, rozprašovací tryska, vibrační žlaby na dosoušení aglomerovaného prášku	<i>Cronobacter (Enterobacter) sakazakii</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>
Výroba fermentovaných výrobků	standardizační tank, homogenizátor, výdržník, ventily, čerpadla plnicí hlavy	stanovení bakteriofágové kontaminace, <i>Bacillus cereus</i> , kvasinky, plísně, čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>

## Výsledky

Výsledky týkající se jejich prevalence v odebraných střezech jsou znázorněny graficky (graf 1). Nejvíce zastoupenými byly rody *Staphylococcus* sp. a *Bacillus* sp. Druh *Bacillus cereus* byl zachycen zejména na výrobně tvarohů, ale také v solních lázních, nebo na výrobně sterilovaných výrobků. Stafylokoky byly nejčastěji izolovány ze stěrů pocházejících z prostředí sýrárny (lisovací tvořítka, porcovna a balíčka sýrů, solné lázně), ale také z prostředí máselárny, či UHT provozu.

Podrobnější výsledky, samotná metodika a seznam literatury jsou k dispozici u autorů.

### Poděkování

Tato práce byla podporována projektem 2B08074 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR a výzkumným záměrem MSM č. 2672286101. Poděkování patří i mlékárnám za spolupráci při odběrech vzorků.

Přijato do tisku 10. 7. 2011

Lektorováno 22. 7. 2011

## SLEDOVÁNÍ REZISTENCE KMENŮ BIFIDOBAKTERIÍ VŮČI MODELOVÝM PODMÍNKÁM ZAŽIVACÍHO TRAKTU

Kejmarová M., Drbohlav J., Šalaková A., Kunová G., Peroutková J.

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

### Monitoring of selected *Bifidobacterium* strains resistance to the model conditions of intestinal tract

#### Abstrakt

Cílem práce bylo testovat odolnost vybraných kmenů *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium species*, *Bifidobacterium dentium* ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® a zkoumat jejich chování v simulovaných podmínkách zaživacího traktu. Tak jako v předešlých dvou letech, byl opět sledován vliv nízkého pH, žaludeční šťávy - pepsinu, pankreatické šťávy - pankreatinu a žlučových solí na počty sledovaných bakterií. Výsledky ukazují, že testované kmeny jsou většinou odolné vůči uvedeným inhibitorům. Sledované bakterie přežívají simulované podmínky trávicího traktu v dostatečném množství a jsou vhodné pro další využití a rozšíření spektra využívaných bifidobakterií v probiotických potravinách.

**Klíčová slova:** *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium species*, *Bifidobacterium dentium*, pepsin, pankreatin, žlučové soli, hydrofobita

## Abstract

The evaluation of resistance of selected *Bifidobacterium* strains, concretely *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium species*, *Bifidobacterium dentium* was the aim of this work. The strains originated from Collection of Dairy Microorganisms Laktoflora®. The ability to survive in conditions of intestinal tract as well as in the last two years was observed. It was tested influence of low pH, gastric enzyme pepsin, pancreatic juice pankreatin and bile salt in relation to density of bacteria. The results show, that tested strains have good resistance to inhibitors mentioned above. Tested bifidobacteria survived conditions of intestinal tract in high and sufficient density and therefore they are suitable for next usage and widening of spectrum of bifidobacteria in probiotic food.

**Key words:** *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium species*, *Bifidobacterium dentium*, pepsin, pankreatin, bile salts, hydrophobicity

## Úvod

V naší další práci pro rok 2011 jsme se opět zaměřili na sledování rezistence vybraných kmenů, a to bifidobakterií, ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora®, která je součástí Českého genofondu mikroorganismů a malých živočichů a rostlin podle zákona č. 252/1997 Sb. ve znění pozdějších předpisů, v simulovaných podmínkách zaživacího traktu člověka. Bifidobakterie patří ke známým a významným probiotickým mikroorganismům. Pro výzkum jsme zvolili 5 kmenů *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, 4 kmeny *Bifidobacterium longum*, 5 kmenů *Bifidobacterium species* a 1 kmen *Bifidobacterium dentium*. Tak jako v minulém roce, tak i letos, jsme sledovali rezistenci vůči nízkému pH, žluči a žlučovým solím, žaludeční šťávě a pepsinu, pankreatické šťávě podle stejné, již uvedené metodiky v r. 2009 a 2010. Dalším naším záměrem bylo otestovat možnosti stanovení další probiotické vlastnosti - hydrofobicity. Určení hydrofobicity dává možnost ověření schopnosti bakterií vázat se na buňky střevní sliznice a tím způsobem napomáhat obrannému systému hostitele v ochraně proti střevním infekcím.

V roce 2010 se zabývali studiem probiotických vlastností:

Qingqing Li a kol. (2010) - zkoumali rezistenci vůči nízkému pH a žluči u *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Qg08. Kmen vykázal 84 % rezistenci vůči pH 2 po 4 hodinách inkubace a 90 % rezistenci vůči žluči. Dále zjistili, že tento kmen je aerotolerantní a byl zařazen mezi komerční probiotické kmeny.

Li Jia e kol. (2010) hodnotili *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. adolescentis* s ohledem na jejich citlivost vůči nízkému pH žaludku (3,0 - 3,5 pH) a žlučovým solím (o koncentraci 0,15 a 0,60 %). Jejich citlivost, životaschopnost vyjádřili hodnotou log CFU/ml. První 3 kmeny vykázaly vysokou životaschopnost buněk při pH 3,5 (5,5 log CFU/ml za 5 hodin) a při koncentraci