

Tab. IV Stanovení BMK po skladování 18 dnů / 4 °C (odběr mléka začátek laktace, farma II.)

Způsob dojení	Označení	Mléčné streptokoky a laktokoky*	Laktobacily*	Σ jogurtových bakterií*	Ent. faecium*
ruční	CCDM 1	1,7 x 10 ⁷	-	-	-
	CCDM 17	1,9 x 10 ⁷	-	-	-
	CCDM 176	4,0 x 10 ⁸	2,8 x 10 ⁷	4,3 x 10 ⁸	-
	CCDM 144	6,9 x 10 ⁶	-	-	-
	CCDM 922	-	-	-	5,6 x 10 ⁷
	CCDM 154	-	1,6 x 10 ⁸	-	-
strojní	CCDM 1	1,3 x 10 ⁷	-	-	-
	CCDM 17	9,8 x 10 ⁶	-	-	-
	CCDM 176	1,2 x 10 ⁸	9,1 x 10 ⁷	2,1 x 10 ⁸	-
	CCDM 144	2,1 x 10 ⁷	-	-	-
	CCDM 922	-	-	-	3,6 x 10 ⁷
	CCDM 154	-	1,2 x 10 ⁸	-	-

*KTJ/1 ml

binaci s mezofilní kulturou CCDM 17 by mohl tvořit novou směsnou kulturu pro nápoj z ovčího mléka. Velmi dobře byl hodnocen kmen CCDM 154, u kterého nebyly zjištěny žádné senzoričké vady.

Žádná kultura nedává odlišné výsledky u mléka získaného ručním nebo strojním dojením. Denzita BMK po fermentaci (Tabulka III) byla minimálně 10⁷ KTJ /1ml, u jogurtové kultury až 10⁸ KTJ /1ml, takto by byla splněna vyhláška 370/2008 Sb. o zastoupení živých mikroorganismů v kysaných mléčných výrobcích.

V průběhu skladování nedošlo k výraznému poklesu počtu BMK (Tabulka IV).

Závěr

Z výsledků hodnocení ovčího mléka jako technologické suroviny pro zpracování na fermentované výrobky a čerstvé sýry vyplývá, že ovčí mléko je velmi dobrou surovinou (vysoká sušina a obsah vápníku). Při výběru vhodných kultur BMK je zapotřebí volit cíleně kmeny ne s tvorbou diacetylu, ale naopak s tvorbou EPS. Tak bude možné vyrobit kvalitní fermentovaný výrobek bez přídavku aditiv.

Ovčí mléko má velmi dobrou syřitelnost a velmi kvalitní a tuhou syřeninu (vysoký obsah vápníku a bílkovin), bude tak zaručena velmi dobrá výtěžnost při výrobě sýrů.

Fermentací ovčího mléka se zvyšuje jeho nutriční hodnota. BMK optimalizují trávení a imunomodulaci, potlačují růst nežádoucích klostridií redukujících sulfidy a tak snižují riziko karcinomu střev. Příznivě ovlivňují lipidový metabolismus snížením celkového cholesterolu a LDL cholesterolu a současně zvyšují hladinu HDL cholesterolu. BMK potlačují metabolický stres, mají pozitivní vliv na činnost jater. Fermentované výrobky mají nižší obsah laktózy a jsou tak vhodnější pro konzumenty s intolerancí vůči laktóze.

Literatura

ES 853/2004 Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 853/2004 kterým se stanoví zvláštní hygienická pravidla pro potravinu živočišného původu.

DRAGONOVÁ H., HEJTMÁNKOVÁ A. (2006): Změny základních ukazatelů kvality ovčího mléka v průběhu laktace, Celostátní přehledky sýrů, VŠCHT Praha, s. 120 - 123.

ČERNÁ E., CVAK Z. (1986): Analytické metody pro mléko a mlékárenské výrobky.

DE VUYST L. (2000): Technology aspects related to the application of functional starter cultures. *Food Technol. Biotechnol.* 38, s. 105-112.

VASILJEVIC T., SHAH N.P. (2008): Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *Int. Dairy J.*, 18, s.714-728.

ZWEIFEL C. A KOL. (2005): Influence of different factors in milk production on standard plate count of raw small ruminant's bulk-tank milk in Switzerland. *Small Ruminant Research*, 58, 63-70.

RAMOS M., JUAREZ M. (2002): Sheep milk, Ve: ROGINSKI H., FUQUAY J. W. FOX P. F.: *Encyklopedia of dairy sciences*, s. 2539 - 2545, U.K., ISBN 0-12-227235-8.

SVENNERSTEN K., CLAESON C. O., NELSON L. (1990): Effect of local stimulation of one udder quarter on milk production and milk components. *J. Dairy Sci.*, 73, s. 970-974.

Přijato do tisku 1. 8. 2011

Lektorováno 31. 8. 2011

APLIKACE PRŮTOKOVÉ CYTOMETRIE PRO SLEDOVÁNÍ VLIVU HLUBOKÉHO ZMRAZOVÁNÍ NA POŠKOZENÍ MIKROBIÁLNÍCH BUNĚK

Dráb V., Vilímková M., Samcová L.

MILCOM a.s., Soběslavská 841, 390 02 Tábor

Application of flow cytometry to monitor the impact of deep freezing damage to microbial cells

Abstrakt

Cílem práce bylo porovnat výsledky klasické plotnové metody s metodou průtokové cytometrie pro stanovení obsahu živých buněk probiotických kmenů bifidobakterií a laktobacilů dlouhodobě skladovaných při -70 °C. V případě sledovaných kmenů bifidobakterií byla dosažena vysoká hodnota korelace mezi metodou průtokové cytometrie využívající BacLight™ RedoxSensor™ Green Vitality kit a plotnovou metodou. V případě laktobacilů byla pozorována vyšší variabilita výsledků související s vlastnostmi testovaného kmene.

Abstract

The aim of this work was compare the results of classic plate method with the flow cytometry method for determination of viable cells of probiotic strains of bifidobacteria and lactobacilli stored long term at -70 °C. In case of monitoring bifidobacterium strains was reached the high level of correlation between flow cytometry method using BacLight™ RedoxSensor™ Green Vitality kit and plate method.

Higher variability of results was observed for lactobacilli associated with the properties of the strain tested.

Úvod

Zmrazování se často používá pro dlouhodobou úchovu bakterií mléčného kvašení, ale zároveň vytváří stresující podmínky často ovlivňující životaschopnost buněk a některé technologické vlastnosti kmenů (Rault a kol., 2007). Oxidačně-redukční aktivita bakterií poskytuje důležitou informaci o zdravotním stavu mikrobiální buňky. Oxidasy a reduktasy se podílí na řadě důležitých funkcí a proto měření aktivity reduktáz může být citlivým indikátorem změn ve zdravotním stavu buněk způsobených vnějšími stimuly jako je působení antibiotik nebo změna kultivačních podmínek. Přesné stanovení počtu bakterií ve vzorku je důležitý aspekt mnoha experimentů v mikrobiologii a biotechnologii. Klasická metoda stanovení počtu na agarových médiích je zdoluhavá, pracná, zatížená značnou chybou a neumožňuje stanovit některé druhy bakterií (živé, nekultivovatelné - VNC). Naproti tomu metoda průtokové cytometrie umožňuje analyzovat 100.000 i více buněk za méně než jednu minutu a přitom zkoumat biochemické a fyzikální vlastnosti každé z analyzovaných buněk. V této práci jsme se zaměřili na sledování vlivu dlouhodobého zmrazení mikrobiálních buněk při -70 °C na obsah živých buněk stanovený pomocí průtokové cytometrie s využitím měření oxidačně-redukčního potenciálu a klasickou plotnovou metodou.

Materiál a metody

Bakteriální kmeny a podmínky růstu.

Pro testování byly použity probiotické kmeny bifidobakterií CCDM 369, 373, 481, 486, 492, 495, 498 a 501 a laktobacilů CCDM 214, 215, 216 a 233. Kultury použité pro testování byly obnoveny z hluboko zmrazených kultur skladovaných při -70 °C v MRSC bujónu s 15 % glycerolu (výsledná koncentrace) a 0,05 % L-cystein HCl (MRSC-C). Kryozkumavky (2 ml) s mraženou kulturou určenou k obnově byly vyjmuty z mrazicího boxu, přeneseny do očkovacího boxu, kde byly šetrně rozmrazeny při pokojové teplotě (30 minut stání). Poté bylo 9 ml sterilního média MRSC s 0,05 % L-cystein HCl (MRSC-C) zaočkováno 10 % (obj.) rozmražené kultury a kultivováno 20-48 hodin při 37 °C. V případě bifidobakterií byly obnovené kultury následně znovu zaočkovány do MRSC-C bujónu (inokulum 1-2 %) a kultivovány při 37 °C do nárůstu kultury (16 - 36 hod). Aktivní kultura byla smíchána s kryoprotekčním médiem MRSC-C +20 % glycerolu (85 %) a rozplněna po 1,55 ml do 2 ml hnědých kryozkumavek (Axygen Scientific, Union City, USA). V případě laktobacilů byly jednotlivé kmeny souběžně kultivovány v MRS bujónu s různými sacharidy (celobiosa, glukosa, sacharosa a trehalosa). Výsledná koncentrace sacharidu v MRS bujónu byla 1 % (m/v). Po druhém přeočkování byla aktivní kultura smíchána s kryoprotekčním médiem (identické složení jako kultivační bujón + 20 % glycerolu (85 %) + 0,05 % L-cys-

tein HCl) ve stejném poměru jako v případě bifidobakterií. Po 60 minutách stání při pokojové teplotě byly kryozkumavky uloženy a skladovány při -70 °C do použití.

Příprava vzorků před počítáním FC a plotnovou metodou

Kryozkumavky s testovanou mraženou kulturou byly po určené době skladování vyjmuty z mrazicího boxu a po 30 minutách stání při pokojové teplotě byly desetkrát naředěny fyziologickým roztokem. Po rozmíchání byly sterilně odebrány 3 ml vzorku na stanovení počtů průtokovou cytometrií a zbytek byl dále desítkově ředěn fyziologickým roztokem na potřebná ředění a očkován přelivem na příslušný agar. Vzorek určený pro průtokovou cytometrii byl dále desítkově ředěn PBS7P pufrém na koncentraci přibližně 10^5 - 10^6 JTK (jednotek tvořících kolonie)/ml vzorku. Veškeré používané ředící roztoky pro průtokovou cytometrii byly připravovány z 18 MΩ vody a filtrovány přes membránové filtry s velikostí pórů maximálně 0,22 μm.

Stanovení počtu mikrobiálních buněk plotnovou metodou

Počty bifidobakterií byly stanoveny po 72 hodinách anaerobní kultivace při 37 °C na ARC agaru (RCM agar CM0151, Oxoid, pH před sterilací upraveno na 7,1) s přísadkou 0,05 % L-cystein HCl a 0,03 % aniline blue (Sigma- Aldrich, Praha, ČR). Počty laktobacilů byly stanoveny na MRS agaru (Merck 1.10660, Darmstadt, Německo) s přísadkou 0,05 % L-cystein HCl po 72 hodinách kultivace při 37 °C v anaerobním prostředí.

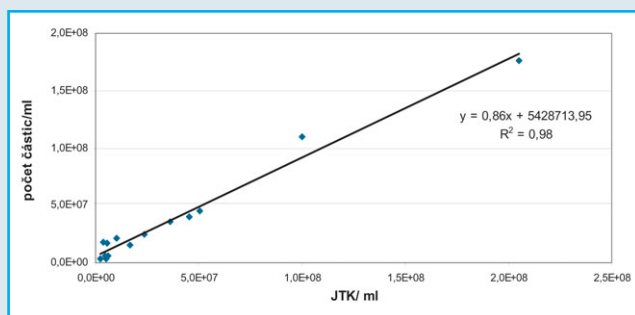
Stanovení počtu živých buněk metodou průtokové cytometrie s využitím BacLight™ RedoxSensor™ Green Vitality kitu metodou průtokové cytometrie

Pro měření aktivity reduktáz byl použit kit B34954 od firmy Invitrogen, který je založen na činidle RedoxSensor™ Green reagent, které snadno penetruje gram pozitivní i gram negativní mikroorganismy a během 10 minut způsobuje v živých buňkách produkci stabilní zelené fluorescence různé intenzity podle použitého kmene. Mrtvé buňky mohou být odlišeny barvením propidium jodidem. Vzorky s koncentrací buněk přibližně 10^5 - 10^6 JTK/ml byly obarveny podle doporučení výrobce pro gram pozitivní mikroorganismy (B34954, Invitrogen Corp., Carlsbad, USA). Po obarvení a promíchání vzorků byly vzorky před měřením inkubovány po dobu minimálně 15 minut ve tmě při 37 °C. Počet živých buněk byl odečten z grafu získaného vynesením intenzity zelené fluorescence na kanále FL1 proti intenzitě červené fluorescence na kanále FL3.

Analýza vzorků pomocí průtokové cytometrie a stanovení korelace mezi výsledky získanými průtokovou cytometrií a plotnovou metodou

Analýza vzorků probíhala podle postupu identického s postupem popsáním v aktivitě A06/09. Pro výpočet korelačních koeficientů byl využit program Excel 2003 (Microsoft Corp., Remont, USA).

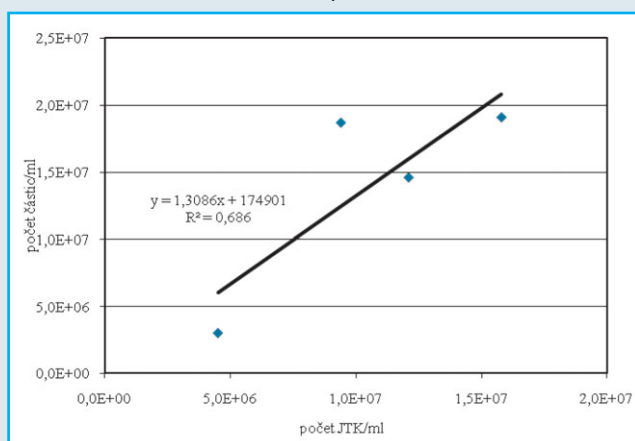
Obr 1 Porovnání výsledků plotnové metody a FC pro hlubokomražené vzorky bifidobakterií skladované 6 a 12 měsíců při -70°C



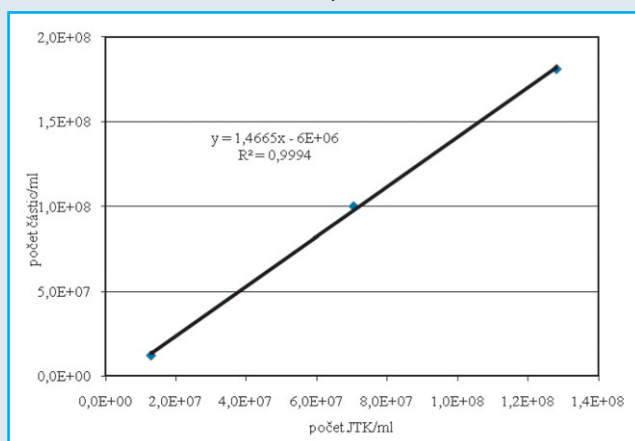
Výsledky a diskuse

Dosažené výsledky jsou uvedeny na obr. 1-5. Obsah živých buněk stanovený průtokovou cytometrií s využitím kitu *BacLight™ RedoxSensor™ Green Vitality* byl porovnáván s výsledky získanými plotnovou metodou u 8 různých kmenů bifidobakterií po 6 a 12 měsících a u 4 kmenů laktobacilů po 12 měsících skladování při -70 °C. V případě buněk bifidobakterií stresovaných

Obr 2 Porovnání výsledků plotnové metody a FC pro hlubokomražené vzorky *Lbc. gasseri* CCDM 214 skladované 12 měsíců při -70 °C

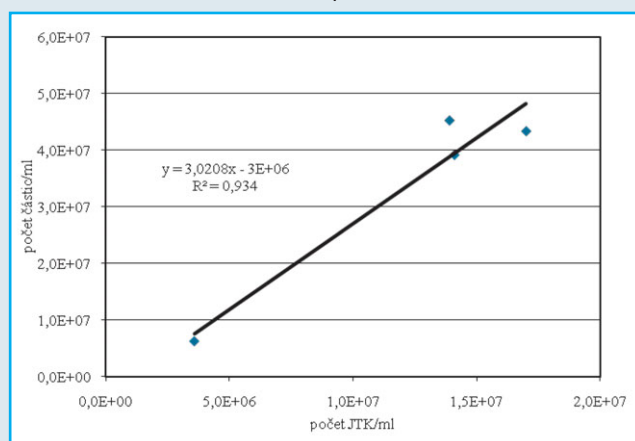


Obr 3 Porovnání výsledků plotnové metody a FC pro hlubokomražené vzorky *Lbc. salivarius* CCDM 214 skladované 12 měsíců při -70 °C

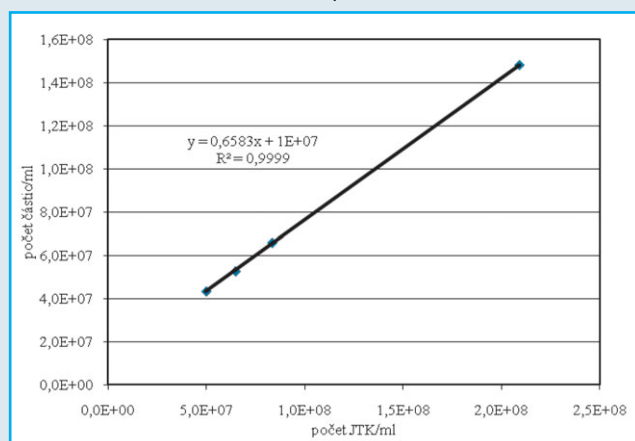


mražením byla zjištěna výrazná korelace mezi stanovením obsahu živých buněk průtokovou cytometrií a plotnovou metodou (obr. 1). V případě laktobacilů byla pozorována různě vysoká hodnota korelace mezi výsledky získanými průtokovou cytometrií a plotnovou metodou pro jednotlivé kmeny (obr. 2-5). V případě kmenů *Lbc. gasseri* CCDM 215 byly počty živých buněk zjištěné pomocí průtokové cytometrie výrazně vyšší, než pomocí plotnové metody, zatímco u kmene *Lbc. rhamnosus* CCDM 233 to bylo obráceně. Domníváme se, že pozorované rozdíly jsou způsobeny v prvním případě tím, že použité médium (MRS agar) neposkytovalo optimální podmínky pro růst *Lbc. gasseri* CCDM 215. V případě kmene *Lbc. rhamnosus* CCDM 233 se jedná o silně agregující kulturu, což mohlo vést k tomu, že při počítání buněk průtokovou cytometrií došlo k podcenění skutečného počtu buněk v důsledku počítání agregátů jako jedné buňky. Rozdíly mezi stanovením obsahu živých buněk metodou průtokové cytometrie a plotnovou metodou pozorované u některých kmenů mohou být rovněž způsobeny velkou populací živých, metabolicky aktivních, ale nekultivatelných buněk. Tyto buňky se za příhodných podmínek mohou vrátit do fyziologicky aktivního stavu (Kaprelyants a spol., 1996).

Obr 4 Porovnání výsledků plotnové metody a FC pro hlubokomražené vzorky *Lbc. gasseri* CCDM 215 skladované 12 měsíců při -70 °C



Obr 5 Porovnání výsledků plotnové metody a FC pro hlubokomražené vzorky *Lbc. rhamnosus* CCDM 233 skladované 12 měsíců při -70 °C



Závěr

Metoda průtokové cytometrie využívající *BacLight*TM RedoxSensorTM Green Vitality kit je vhodná pro rychlé stanovení obsahu živých buněk ve vzorcích dlouhodobě uchovávaných při -70 °C. Její výhodou je rychlost získání výsledků - na rozdíl od 72 hodin v případě plotnové metody je reálné získání výsledku během dvou hodin. V případě silně agregujících kultur dochází k podhodnocení skutečného počtu v důsledku počítání agregátu jako jedné buňky.

Poděkování:

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT v rámci grantu 2B06053.

Literatura

- KAPRELYANTS A.S., MUKAMOLOVA H.M., DAVEY H.M., KELL D.B.: Quantitative analysis of the physiological heterogeneity within starved cultures of *Micrococcus luteus* by flow cytometry.
- RAULT A., BÉAL C., GHORBAL S., OGIER J.-C., BOUIX M (2007): Multiparametric flow cytometry allows rapid assessment and comparison of lactic acid bacteria viability after freezing and during frozen storage. *Cryobiology* 55, s. 35-43.

Přijato do tisku: 19. 7. 2011

Lektorováno: 5. 8. 2011

MIKROBIOLOGICKÁ RIZIKA V MLÉKÁRENSKÝCH VÝROBÁCH - DETEKCE PATOGENNÍCH BAKTERIÍ

Jarmila Pazlarová¹, Kateřina Demnerová¹, Helena Růžičková¹, Petr Roubal², Irena Němečková², Renata Karpíšková³

¹ Vysoká škola Chemicko-Technologická v Praze

² MILCOM a.s.

³ Státní zdravotní ústav, Centrum potravinových řetězců Brno

Microbial hazards in the dairy plants - the pathogens detection

Abstrakt

Zajištění kvalitních a mikrobiologicky bezpečných mléčných výrobků v tržní síti je cílem pracovníků mlékárenského průmyslu. V rámci řešení výzkumného grantu MŠMT 2B06048 účastníci řešení z řad výrobců a výzkumných pracovišť, mapovali výskyt mikrobiologických rizik počínaje situací u producentů mléka a dále v mlékárenských závodech. Byl sledován výskyt a frekvence následujících mikroorganismů: *Cronobacter* (*Enterobacter*) *sakazakii*, *Escherichia coli* O157, příslušníci čeledi *Enterobacteriaceae*, *Listeria monocytogenes*,

Salmonella spp., koagulasa pozitivní *Staphylococcus aureus* a *Campylobacter* sp. v prostředí producentů mléka, dále v mlékárenských závodech a rovněž v prodejních automatech syrového mléka.

Klíčová slova: *Cronobacter* (*Enterobacter*) *sakazakii*, *Escherichia coli* O157, příslušníci čeledi *Enterobacteriaceae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., koagulasa pozitivní *Staphylococcus aureus*

Abstract

Provision of a market by high-quality and microbiologically safe milk products is the main goal of dairy industry. Research grant No. 2B06048 of Ministry of education, youth and sports was targeted on the occurrence of microbial hazards at the dairy farm level and in the dairy plants. The occurrence and frequency of following microorganisms were tracked: *Cronobacter* (*Enterobacter*) *sakazakii*, *Escherichia coli* O157, members of family *Enterobacteriaceae*, *Campylobacter* sp. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. and koagulase positive *Staphylococcus aureus* at farms, dairy plants and raw milk vending machines.

Klíčová slova: *Cronobacter* (*Enterobacter*) *sakazakii*, *Escherichia coli* O157, members of family *Enterobacteriaceae*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., koagulase positive *Staphylococcus aureus*

Úvod

Produkce mikrobiologicky nezávadných potravinářských, zvláště pak mléčných výrobků je naléhavou nutností současnosti. Spotřebitelé jsou znepokojováni periodicky se vyskytujícími epidemiemi vyvolanými kontaminovanými potravinami. Nalezení a následná eliminace možných rizik vyplývajících z přítomnosti patogenních mikroorganismů, dále pak nalezení místa jejich vstupu do výrobního procesu bylo hlavním cílem projektu MŠMT 2B06048. Od samého počátku řešení jsme paralelně sledovali dvě skupiny mikroorganismů, jednak patogeny a dále pak technologicky nežádoucí mikroorganismy. Tato práce představuje výsledky týkající se výskytu patogenních mikroorganismů v mléce. Komplexnost přístupu k problematice byla zajištěna vhodným složením řešitelského týmu.

Všechny mléčné výrobky mají svou specifickou mikrofloru, která se může během zpracování a následného skladování měnit. Nalezená mikroflora sledovaného výrobku je výsledkem typu a počtu bakterií ve výchozí surovině, dále jsou zde mikroby, které jsou eliminovány nebo naopak se pomnožují během zpracování a nakonec vše ovlivňují podmínky skladování. Pro bezpečnost mléčných výrobků v první řadě platí zásady obsažené v Nařízení EU 1441/2007. Na prvním místě v celém spektru mléčných výrobků se jedná o salmonely, dále *Listeria monocytogenes*, příslušníky čeledi *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli* O157 a koagulasa pozitivní stafylokoky (*Staphylococcus aureus* a další druhy). *Enterobacter* (*Cronobacter*) *sakazakii* je nutné sledovat pouze v sušené