

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

Tab. I Výsledky rozborů z prvovýroby mléka provedené v roce 2007

	Salmonella 25g/25 ml	Koagulasa pozitivní stafylokoky (<i>St. aureus</i>) 1g/1ml	Listeria <i>monocytogenes</i> 25g/25 ml	Escherichia coli O157 25g/25 ml	Escherichia coli glukuronidasa pozitivní 1g/1ml	Příslušníci čeledi <i>Enterbacteriaceae</i> 1g/1ml
Syrové mléko	Negativní Negativní Negativní	9x10 ⁵ 3,5x10 ³ 3,3x10 ³	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní	<1 <1 <1	1x10 ⁶ 60 2,3x10 ⁴
Zelené krmivo	Neprovedeno Negativní Negativní	Neprovedeno <50 4,1x10 ³	Neprovedeno Negativní Negativní	Neprovedeno Negativní Negativní	Neprovedeno 5,3x10 ² 2,9x10 ⁴	Neprovedeno 6,1x10 ⁵ >1,5x10 ⁶
Seno	Negativní Negativní Negativní	Negativní 3,5x10 ² <50	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní	Negativní 80 <10	Negativní 5,5x10 ⁵ 6,5x10 ⁴
Krmná směs	Negativní Negativní Negativní	<50 Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní	1,5x10 ⁵ Negativní Negativní
Faeces	Negativní Negativní Negativní	<50 <50 <50	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní 1,5x10 ⁴	Negativní 4,2x10 ⁴ 1,5x10 ⁶
Stěr struků	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní

1. řádek odběr 15.3.2007, 2. řádek odběr 11.7.2007, 3. řádek odběr 17.9.2007

mléčné dětské výživě. Řešitelský tým měl k dispozici kompletní spektrum normovaných (ČSN ISO) postupů, které byly použity pro analýzu odebraných vzorků.

Materiál a metody

Všechny odebrané vzorky byly zpracovány nejpozději do 24 h po odběru. Postupovalo se podle normovaných metod, uvedených v seznamu literatury. Odběry byly prováděny na třech farmách, dvou mlékárnách a ve čtyřech automatech na odběr syrového mléka. Výsledky vyšetření na přítomnost *Enterobacter (Cronobacter) sakazakii* jsou sice uvedeny jen v tabulce III., ale byly prováděny ve všech odběrech mléka, viz tabulka II. Vzhledem ke skutečnosti, že všechny nálezy byly negativní, nebyly do tabulky zařazeny.

Výsledky a diskuse

V prvních dvou letech projektu (2007 a 2008) byl hlavní důraz věnován zjišťování výskytu hledaných patogenů přímo na mléčných farmách. V různých ročních obdobích, jak ukazuje tab. I. byl proveden mikrobiologický rozbor v prostředí mléčných farem. Hlavní sledované patogeny, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli* O157 nebyly nalezeny v žádném vyšetřovaném vzorku. Syrové mléko však ve všech odběrech obsahovalo koagulasa pozitivní stafylokoky (*Staphylococcus aureus* a další druhy), i když stěry struků byly negativní. Opakování v dalším roce prakticky potvrdilo výsledky uvedené v tab. I. Lze konstatovat, že situace ve sledovaných prvovýrobách je uspokojivá.

V roce 2009 jsme sledovali výskyt stejných mikroorganismů v mlékárnách, počínaje kvalitou syrového svozového mléka, dále syrové mléko před pasterací, po pasteraci

a také jsme analyzovali syrovátku. Tyto výsledky ukazují tab. II. Jednotlivé řádky ukazují data získaná v různých mlékárnách v letech 2009 až 2010. Pouze v jednom případě byla v příjmovém tanku prokázána přítomnost *Listeria monocytogenes*. Výskyt *Salmonella* sp. a *Escherichia coli* O157 nebyl potvrzen za celou dobu trvání projektu v žádném z analyzovaných vzorků. Pasterace účinně snižovala množství koagulasa pozitivních stafylokoků, ale k absolutnímu odstranění této bakterie v mlékárenských provozech nedochází.

Tab. II Mikrobiologická kvalita mléka v mlékárně

	Syrové mléko tank	Syrové mléko před pasterem	Pasterizované mléko
<i>Salmonella</i> sp. 25 ml	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> 25 ml	Pozitivní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní
koagulasa pozitivní stafylokoky (<i>St. aureus</i> a další) 1 ml	8,9x10 ² 4,6x10 ³ 5x10 ²	9,5x10 ² 2,5x10 ⁵ 3x10 ²	<5 <5 <5
<i>Escherichia coli</i> O157 25 ml	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní	Negativní Negativní Negativní
<i>Escherichia coli</i> glukuronidasa pozitivní 1 ml	20 1,5x10 ³ 3,3x10 ²	10 1,8x10 ³ 2,1x10 ²	<1 <1 <1
<i>Enterbacteriaceae</i> 1 ml	1,1x10 ⁵ 2,6x10 ⁴ 1,3x10 ⁴	7,5x10 ³ 2,5x10 ⁵ 1,1x10 ⁴	<1 <1 <1

A₂₆₀/nm / A₂₈₀ nm -----poměr absorbancí DNA

Tab. III

Odběrové místo/ datum	<i>Listeria monocytogenes</i> 25 ml	<i>Salmonella</i> 25 ml	<i>Escherichia coli</i> β -glukuronidázo pozitivní 1 ml	Koaguláza pozitivní stafylokoky (<i>St. aureus</i> a další druhy) 1 ml	Enterobacteriaceae 1 ml	<i>Enterobacter sakazakii</i> 25 ml
A 6.3.2010	negativní	negativní	<1	<5	4	negativní
B 8.3.2010	negativní	negativní	<1	18	138	negativní
B 21.3.2010	negativní	negativní	<1	<5	2,5x10 ³	negativní
C 21.3.2010	negativní	negativní	<1	<5	4x10 ²	negativní
A 22.3.2010	negativní	negativní	3	<5	89	negativní
B 6.4.2010	negativní	negativní	1	<5	11	negativní
A 6.4.2010	negativní	negativní	5	<5	16	negativní
D 18.4.2010	negativní	negativní	<1	<5	71	negativní
C 18.4.2010	negativní	negativní	<1	<5	1,2x10 ³	negativní
A 3.5.2010	negativní	negativní	22	<5	2,3x10 ²	negativní
B 3.5.2010	negativní	negativní	<1	<5	18	negativní
C 8.5.2010	negativní	negativní	<1	<5	1,8x10 ²	negativní
A 17.5.2010	negativní	negativní	<1	<50	3	negativní
B 17.5.2010	negativní	negativní	<1	4	48	negativní
C 5.6.2010	negativní	negativní	<1	<5	36	negativní
D 5.6.2010	negativní	negativní	<1	<5	15	negativní
B 7.6.2010	negativní	negativní	<1	<5	2	negativní
D 19.6.2010	negativní	negativní	<1	<5	10	negativní
C 19.6.2010	negativní	negativní	<1	<5	1,3x10 ³	negativní
B 21.6.2010	negativní	negativní	2	34	2,6x10 ²	negativní

1. řádek odběr 15.3.2007, 2. řádek odběr 11.7.2007, 3. řádek odběr 17.9.2007

V průběhu řešení projektu došlo k masovému rozšíření prodejních automatů na syrové mléko. Pokládali jsme za nutné zjistit možná mikrobiologická rizika u takto distribuovaného syrového mléka. Odběry jsme zahájili v březnu 2010 a pokračovali jsme do června téhož roku. Vzorky mléka byly odebírány z celkem čtyř odběrových míst (v tabulce označeny A, B, C a D). Nejvíce vzorků bylo odebráno z místa B a C. Kromě hodnot uvedených v Tab. III. jsme sledovali přítomnost termofilních bakterií rodu *Campylobacter*, všechny vyšetřované vzorky mléka byly negativní, podobně jako byly negativní výsledky kulturačního vyšetření na přítomnost *Enterobacter (Cronobacter) sakazakii*. Během doby sledování byly výsledky u všech odběrových automatů vyrovnané a hygienicky nezávadné. Odběrové místo C po celou dobu sledování vykazovalo vyšší počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, jednalo se o stovky bakterií na jeden ml. Ve dvou odběrech, které byly v dubnu a červnu 2010

nalezený počet bakterií překročil tisíc jedinců na ml. Tyto hodnoty byly nalezeny v pěti ze šesti odběrů. Odběrové místo B, celkem sedm uskutečněných odběrů, pouze dvakrát byly nalezeny podobné hodnoty jaku u místa C.

Závěr

Výsledky projektu ukázaly, že výskyt nejobávanějších patogenů, kterými jsou *Listeria monocytogenes* a *Salmonella* sp. je velice nízký a to jak u producentů mléka až po finální výrobek. Ostatní sledované skupiny mikroorganismů vypovídají spíše o úrovni hygieny výroby a technologie mléka, poskytly vcelku pozitivní situaci. Situace ve výskytu *Enterobacter (Cronobacter) sakazakii*, jehož přítomnost je dle platné legislativy, kterou je Nařízení Komise (ES) č 1441/2007 sledovaná jen v sušené mléčné dětské výživě je podle získaných výsledků rovněž uspokojivá.

Poděkování

Tato práce vznikla za finanční podpory MŠMT v rámci grantu 2B06048.

Literatura

- ČSN ISO 16649-2 Horizontální metoda stanovení počtu β -glukuronidázopozitivních *Escherichia coli* - Část :2 - Technika počítání kolonií
 ČSN ISO 21528-2 Horizontální metoda pro průkaz a stanovení počtu bakterií čeledi *Enterbacteriaceae* - Část 2 - Technika počítání kolonií:
 ČSN EN ISO 6579 Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella*
 ČSN EN ISO 6888-1 Horizontální metoda stanovení počtu koagulázopozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy)
 ČSN EN ISO 11290-1 Horizontální metoda průkazu a stanovení *Listeria monocytogenes* - Část: 1 Metoda průkazu
 ČSN EN ISO 4833 Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 300 °C
 ČSN EN ISO 10272-1 Horizontální metoda průkazu a stanovení *Campylobacter* spp. - Část 1: Metoda průkazu
 ČSN EN ISO 16654 Horizontální metoda průkazu *Escherichia coli* O157
 ČSN P ISO/TS2296 Mléko a mléčné výrobky - Průkaz *Enterobacter sakazakii*
 Nařízení Komise (ES) č. 1441/2007 ve znění Nařízení č.2073/2005

Přijato do tisku 8. 8. 2011

Lektorováno 30. 8. 2011

ŽIVNÁ MÉDIA PRO STANOVENÍ A KULTIVACI PLÍSNÍ A KVASINEK IZOLOVANÝCH Z MLÉČNÝCH VÝROBKŮ (krátké sdělení)

Standarová Eva, Necidová Lenka, Dušková Marta

Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární
a farmaceutická univerzita Brno

Nutrient media for estimation and cultivation of moulds and yeasts isolated from dairy products (research note)

Vedle bakterií hrají důležitou roli v potravinách také plísně a kvasinky. Výskyt vysokých počtů některých druhů kvasinek a plísní v mléčných výrobcích lze přisoudit pro ně nenáročným životním podmínkám. Jsou schopné využívat vzdušnou vlhkost, rozmnožovat se za nízké vodní aktivity prostředí, jsou tolerantní k nízkým hodnotám pH a vysoké koncentraci soli, stejně tak jako růstu při nízké teplotě skladování (Ferreira a Viljoen, 2003). Díky enzymatickému vybavení mají proteolytické, lipolytické a sacharolytické vlastnosti, jsou velmi adaptabilní pro kontaminaci téměř jakéhokoliv substrátu - tedy i potravin.

Některé kvasinky a plísně bývají označovány jako "kulturální" (například *Kluyveromyces marxianus*, *Penicillium roqueforti*, *Penicillium camemberti*) a využívají se při výrobě plísňových sýrů, jako jsou Niva či Hermelín a některých trvanlivých masných výrobků. Kvasinky a plísně jsou zapojeny přímo i nepřímo v procesu zrání sýrů. Na druhé straně mohou být příčinou kažení potravin a typických vad sýrů,

což snižuje nejen přitažlivost výrobku a značky, ale může způsobit i značné ekonomické ztráty pro výrobce, zpracovatele a spotřebitele (Jakobsen a Narvhus, 1996).

Platné právní předpisy týkající se mikrobiologického vyšetření potravin (Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 ve znění pozdějších předpisů) nepožadují u žádné z uvedených komodit stanovení počtu kvasinek a plísní. Toto stanovení je v současné době výrobcům doporučováno u některých druhů potravin (např. sušené mléčné výrobky pro kojeneckou a dětskou výživu, smetanové a tvarohové krémy, tvrdé a tavené sýry, máslo a pomazánky z másla) normou ČSN 56 9609.

Za účelem detekce, stanovení a izolace kvasinek a plísní z potravin byla vyvinuta četná média (Deák, 1991). Pitt a Hocking (2009) uvádějí několik požadavků pro ideální kultivační médium určené pro tyto účely: obsah nutrientů dostatečně podporující růst kvasinek a plísní, maximální využití pro rozborů všech typů potravin za současného potlačení růstu bakterií. Žádné médium však dosud nebylo navrženo tak, aby splňovalo všechny požadavky. Proto správnou volbou je použití média nevhodnějšího k danému účelu.

Stanovení kvasinek a plísní je založeno na použití selektivních kultivačních půd potlačujících růst doprovodné bakteriální mikroflóry. Nejčastěji se jedná o živné půdy s nízkým pH (např. Sladinový agar) nebo živné půdy s přidáním antibiotik (např. GKCH agar - půda s kvasničným extraktem, glukózou a chloramfenikolem). Použití GKCH agaru bylo až do nedávné doby požadováno pro stanovení počtu kvasinek a plísní v potravinách normou ČSN ISO 7954. V současné době lze počet kvasinek a plísní stanovit dvěma ISO metodami pomocí chloramfenikolového agaru s dichloranem a bengálskou červení (DRBC agar) a dichloran glycerolovým agarem (DG18), a to v závislosti na hodnotě aktivity vody (a_w) testovaného výrobku. Tato média se používají pouze pro stanovení počtu živých kvasinek a plísní, pro jejich přesnější identifikaci je vhodné použití jiných růstových médií. Inkubace na agarech DRBC a DG18 probíhá za aerobních podmínek při 25 °C po dobu 5 dní. Výběr kultivačních médií je nutno provést s ohledem na aktivitu vody (a_w) v testované potravine v souladu s požadavky platné normy ČSN ISO 21527-1, 2. Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95 požaduje jako arbitrážní půdu pro stanovení počtu kvasinek a plísní DRBC agar, který se používá nejen u mléčných výrobků (s výjimkou sušeného mléka), ale např. i u vajec, masa, ovoce, zeleniny a čerstvých těstovin.

DG18 agar je určený pro stanovení počtu kvasinek a plísní u výrobků s a_w nižší nebo rovnou 0,95 podle výše uvedené normy Část 2. DG18 je zvláště vhodný pro stanovení počtu a izolaci živých osmofilních kvasinek a xerofilních plísní, které se vyskytují v dehydratovaných a velmi suchých výrobcích, jako jsou vysoce sladké nebo slané potraviny, sušené ovoce, ořechy, cereálie, sladké pečivo, mouka, sušené maso, solené ryby a koření.

Média, která obsahují bengálskou červeň (DRBC agar), jsou citlivá na světlo. Po jeho 2 hodinovém působení