

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

Tab. 1 Složení médií pro kultivaci plísní a kvasinek

Složení látek (g, ml)	Kultivační médium			
	GKCH (YGC) ¹	SL ²	DRBC ³	DG 18 ⁴
Glukóza	20	-	10	10
Chloramfenikol	0,1	-	0,05	0,1
Chlortetracyklin chlorhydrát	-	-	0,05	-
KH ₂ PO ₄	-	-	1	1
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	-	-	0,5	0,5
Dichloran (0,2% w/v ethanolu)	-	-	1	1
Polypepton	-	-	5	-
Pepton	-	-	-	5
Glycerol	-	-	-	220
Bengálská červeň	-	-	0,025	-
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	-	-	0,005	-
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	-	-	0,01	-
Tergitol	-	-	1	-
Sladinový extrakt (= malt extract)	-	20	-	-
Agar	15	20	12,4	13
Destilovaná voda (do konečného obsahu)	1000	1000	1000	1000
pH	6,6 ± 0,2	5,4 ± 0,2	5,6 ± 0,2	5,6 ± 0,2

¹ GKCH (YGC) - Glukózový agar s kvasničným extraktem a chloramfenikolem (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar)

² SL - Sladinový agar (Wort Beer Agar)

³ DRBC - Dichloranový agar s bengálskou červení a chloramfenikolem (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar)

⁴ DG 18 - Dichloran glycerolový (18 % hmotnostních) agar (Dichloran 18% Glycerol Agar)

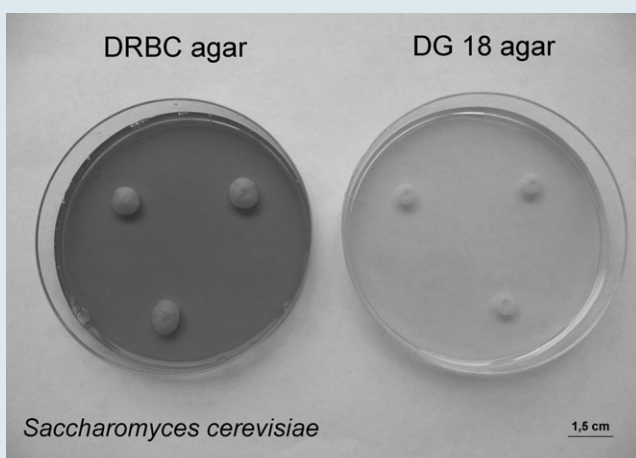
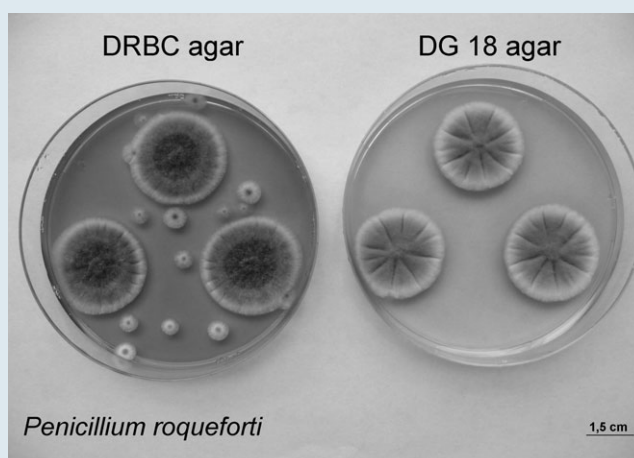
vznikají v médiu inhibiční látky, které mohou způsobit nižší nárůst mykoflóry ze vzorků. Média DRBC a DG 18 lze doplnit o stopové prvky (ZnSO₄·7 H₂O, CuSO₄·5 H₂O), které umožní plně rozvinout plísním svoji morfologii, zvláště produkci pigmentů, a tím umožní lepší identifikaci na těchto médiích.

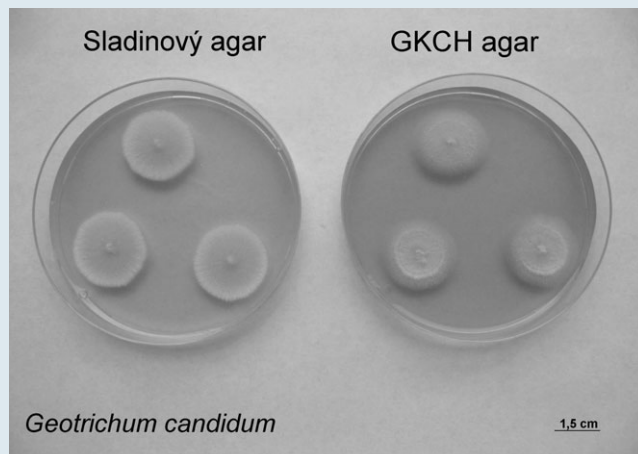
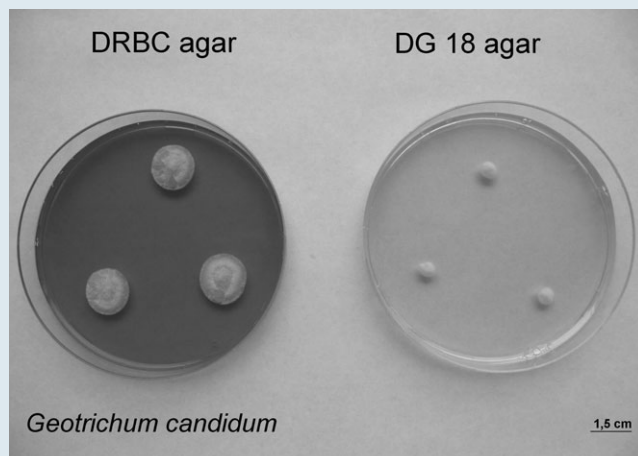
Po 5 dnech kultivace jsou kolonie kvasinek na agarech DRBC a DG18 okrouhlé, matné nebo lesklé, o průměru 3 - 5 mm, s pravidelným okrajem a více či méně vypouklým povrchem, na DRBC agaru jsou zbarvené do růžova (Obr. 1a). Plísně rostou v podobě plochých či chmýřovitých propagulí/zárodků nebo v obrovských (i několik cm v průměru velkých) chmýřovitých koloniích často s různě

zbarvenými (např. bílé, modrozeleně, červenooranžově) plodícími nebo sporotvornými strukturami (Obr. 1b).

Další kultivační média určená pro růst kvasinek a plísní současně s DRBC a DG18 agary jsou uvedena v Tab. 1. Sladinový agar jako komplexní médium je vhodný pro růst většiny saprofytických vláknitých hub i některých kvasinek a lze jej připravit poměrně snadno z pivovarnické sladiny. Obdoba (Malt Extrakt Agar, MEA) se připravuje ze sušené sladiny. U selektivního GKCH agaru poskytuje kvasničný extrakt růstové faktory (zdroj vitaminů, zejména skupiny B), glukóza je zdrojem uhlíku a energie. Přítomnost širokospektrálního antibiotika (chloramfenikolu) v půdě působí bakteriostaticky, zatímco kvasinky a plísně rostou v jeho přítomnosti bez omezení. Na rozdíl od jiných podobných kultivačních médií, která obsahují další antibiotika (např. OGY-Oxytetracyklin Glukóza Kvasinkový Agar), má tu výhodu, že GKCH je plně autoklátovatelný. Mikroorganismy, které tvoří kolonie na těchto médiích během aerobní kultivace při 25 °C, jsou kvasinky a plísně. Kvasinky vytváří matné nebo lesklé okrouhlé kolonie obvykle s pravidelným okrajem a více či méně vypouklým povrchem. Plísně tvoří ploché nebo chmýřovité propagule/zárodky nebo kolonie často se zbarvenými plodícími nebo sporujícími strukturami.

Cílem studie bylo posouzení kompletní mykoflóry zrajících a plísnových sýrů zakoupených v tržní síti. Vybrané kvasinky (*Candida lipolytica*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*) a plísně (*Penicillium roqueforti*, *Geotrichum candidum*, *Cladosporium herbarum* a *Fusarium sporotrichioides*) izolované z těchto potravin byly samostatně naočkovány na živná média: DRBC, DG18 (Biokar Diagnostics, Francie), Sladinový agar a GKCH agar (HiMedia, Indie). Na každé plotně byla pozorována schopnost růstu, morfologie kolonií a jejich pigmentace. Na půdách DRBC a DG18 byl pozorován pomalejší nárůst a morfologie byla méně výrazná (Obr. 2a, 2b), což není považováno za nevýhodu u půd určených pro stanovení počtu kvasinek a plísní v potravinách. Nejrychlejší růst s výraznou morfologií charakteristickou pro jednotlivé rody plísní a kvasinek byl pozorován na Sladinovém agaru (Obr. 2a).

Obr. 1a Růst kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) na DRBC a DG18**Obr. 1b** Růst plísní (*Penicillium roqueforti*) na DRBC a DG18

Obr. 2a Růst *Geotrichum candidum* na Sladinovém agaru a GKCH**Obr. 2b** Růst *Geotrichum candidum* na DRBC a DG18

Závěrem lze konstatovat, že použití půd DRBC a DG 18 pro stanovení počtu kvasinek a plísni nejen v mléčných výrobcích vyžaduje ČSN ISO 21527-1, 2 platná od ledna 2009. Při výběru vhodné půdy pro stanovení počtu kvasinek a plísni je nutné zohlednit aktivitu vody vyšetřované potraviny. V případě, že má být sledována kompletní mykoflóra a jednotlivé mikroorganismy mají být identifikovány a charakterizovány, je vhodné doplnit toto stanovení i použitím jiných kultivačních půd např. Sladinového agaru. Nicméně na médiích, jejichž použití vyžaduje současná ISO norma, byl sledován uspokojivý růst s charakteristickou morfologií u jednotlivých sledovaných rodů kvasinek a plísni.

Literatura

- ČSN 56 9609. Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace, 2008, 15 s.
- ČSN ISO 7954. Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu kvasinek a plísni. Technika počítání kolonií vykultivovaných při 25 °C, 1994, 8 s.
- ČSN ISO 21527-1. Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísni - Část 1: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody vyšší než 0,95, 2009, 12 s.
- ČSN ISO 21527-2. Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísni - Část 2: Technika počítání kolonií u výrobků s aktivitou vody nižší než nebo rovnou 0,95, 2009, 16 s.

- DEÁK T. (1991): Foodborne yeasts. *Adv. Appl. Microbiol.*, 36, s. 179-278.
- FERREIRA A.D., VILJOEN B.C. (2003): Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, s. 131-140.
- JAKOBSEN M., NARVHUS J. (1996): Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy J.*, 6, s. 755-768.
- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. 29 s.
- PITT, J.I., HOCKING, A.D.(2009): *Fungi and food spoilage*, 3rd ed., Springer Verlag, Germany, 540 s.

Kontaktní adresa:

MVDr. Eva Standarová, Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, ČR,
e-mail: standarovae@vfu.cz

Přijato do tisku 8. 7. 2011

Lektorováno 14. 7. 2011

MLÉKO A PROSTŘEDÍ MLÉKÁRENSKÉ VÝROBY: ZDROJE A CESTY ŠÍŘENÍ *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Tereza Gelbíčová^a, Renáta Karpíšková^{b,c},
Kateřina Demnerová^d

^a Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta,
Ústav experimentální biologie, Tvrdého 14, 602 00 Brno,
email: terezag@sci.muni.cz

^b Státní zdravotní ústav Praha, Centrum zdraví, výživy
a potravin, Palackého 3a, 612 42 Brno

^c Veterinární a farmaceutická univerzita Brno,
Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Palackého 1-3,
612 42 Brno, email: karpiskova@chpr.szu.cz

^d Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Fakulta potravinářské a biochemické technologie,
Technická 5, 166 28 Praha 6 - Dejvice,
email: katerina.demnerova@vscht.cz

Milk and the environment of dairy plants: sources and transmission routes of *Listeria monocytogenes*

Souhrn

Sledování výskytu *Listeria monocytogenes* v rámci celého potravinového řetězce je jedním z předpokladů zajištění bezpečnosti potravin. Článek předkládá informace o možnostech šíření kontaminace *L. monocytogenes* na mléčných farmách a v mlékárenských podnicích vyrábějících zrající sýry. Pro sledování cest kontaminace v prvovýrobě a potravinářských provozech je rozhodující typizace *L. monocytogenes* v surovinách, finálních výrobcích, na zařízení a pracovních plochách výrobní linky.

Klíčová slova: perzistence, hygiena, typizační metody