

VI. ošetřené přípravkem FARGO 37 vykazovaly koncentraci listerií po zrání o 2 řády vyšší než předcházející skupina - $3,6 \times 10^4$ a po dozrání nejvyšší ze skupin kontaminovaných tímto způsobem - $1,71 \times 10^5$ KTJ/g sýra. Sýry pouze kontaminované a neošetřené žádným přípravkem měly po zrání $2,94 \times 10^3$ a po dozrání $4,62 \times 10^4$ KTJ/g listerií. Výsledky jsou uvedeny v grafu č. 2.

Závěr

Výsledky všech pokusných zrání s kontaminací a přídávky ošetřujících přípravků s antilisteriální aktivitou testované při modelových zráních ukázaly, že jejich účinnost v této fázi výroby je prokazatelná, ale nedostačující k potlačení listerií pod limit uváděný jako zdraví ohrožující. Právě u sýrů zrajících pod mazem, které mají nejlepší podmínky pro růst a rozmnožování listerií, dochází při jejich použití jenom k částečnému omezení jejich rozvoje o jeden nebo dva řády, ale pokud kontaminace listeriem nastala už před vlastním zráním nebo v jakékoliv další fázi zrání, vždy se listerie rozmnožily a byly zjištěny v sýrech v různém stupni zralosti v rozmezí 10^2 až 10^6 . Nařízení komise (ES) č. 2073 z roku 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, platné od 1. 1. 2006, uvádí jako povolený limit 100 KTJ/g. Za infekční dávku *Listeria monocytogenes* lze považovat hodnoty nad tuto hranici především pro rizikové skupiny obyvatelstva. Prakticky ve všech skupinách pokusného zrání, kromě sýrů kontaminovaných až po omytí a ošetřených enterokokovou kulturou před úplným dozráním, obsah buněk listerií vyjádřený jako počet KTJ/g po dozrání přesáhl tuto hranici nezávadnosti pro rizikové skupiny obyvatelstva.

Přitom je nutné uvést, že technologický postup výroby sýrů zrajících pod mazem nelze upravit tak, aby byla vytvořena teplotní nebo jiná fyzikální bariéra, aniž by byl změněn charakter sýra. Stejně tak nelze změnit bakteriální složení mazu např. ve prospěch bakterií produkujících bakteriociny účinné proti listeriím aniž by se změnila typická vlastnosti sýra. Jediným možným zásadním opatřením při výrobě měkkých sýrů zrajících pod mazem proti výskytu listerií tedy zůstává důsledné dodržování sanitčních předpisů a zásad HACCP.

Práce byla umožněna díky finanční podpoře MŠMT v rámci grantu 2B08050 a výzkumného záměru MSM 2672286101.

Literatura:

- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny, s. 3.
 GÁLVEZ, A.; ABRIQUEL, H.; LÓPEZ, R. L.; OMAR, N. B. (2007): Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int. J. Food Microbiol.*, 120, s. 51-70.
 IZQUIERDO, E.; MARCHIONI, E.; AOUDE-WERNER, D.; HASSELMANN, C.; ENNAHA, R. S. (2009): Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.*, 26, s. 16-20.
 HARTMANN, H. A.; WILKE, T.; ERDMANN, R. (2011): Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *Int. J. Food Microbiol.*, 142, s. 192-9.

Přijato do tisku 15. 12. 2011

STANOVENÍ MIKROBIOLOGICKÝCH PARAMETRŮ MLÉKA ZA ÚČELEM VÝKUPU A PROPLÁČENÍ

Peroutková Jitka, Elich Ondřej, Pechačová Marta,
Chmúrová Jana
MILCOM a.s.

Determination of microbiological parameters of milk for the purchase and payment

Abstrakt

V této práci byl sledován vliv skladovacích podmínek tj. teploty, délky skladování a použití dvou možných konzervačních činidel, jejichž použití vychází z ČSN, na jednotlivé skupiny mikroorganismů, které tvoří běžnou mikroflóru syrového mléka. Testovanými mikroorganismy byly kmeny z České sbírky mikroorganismů v Brně *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *St. aureus* CCM 4516, *E. coli* CCM 3954 a mikroorganismy ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora® *Lactobacillus helveticus* CCDM 447 a smetanová kultura CCDM 1. Stanovení byla prováděna instrumentálně i klasickou metodou. Teplota skladování 2 a 6 °C, stejně tak prodloužení doby skladování z 24 na 48 hodin neovlivnilo denzitu mikroorganismů. Simulací nešetřného zacházení s mlékem byla zjištěna vyšší denzita u kmene *St. aureus* o 1 řád, ale až po 48 hodinách skladování. Použitá konzervační činidla, Heschenovo činidlo a Azidiol, nevykazují rozdíly v konzervačních účincích.

Klíčová slova: mléko, skladovací podmínky, teplota, konzervační činidlo

Abstract

In this work was the storage conditions as temperature, time of storage and using two preservatives used in accordance with the standard in relation to individual groups of microorganisms, which constitute normal micro flora of raw milk was monitored. Tested microorganisms were strains from Czech collection of microorganisms Brno *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *St. aureus* CCM 4516, *E. coli* CCM 3954 and next from Culture collection of dairy microorganisms Laktoflora® *Lactobacillus helveticus* CCDM 447 and cream culture CCDM 1. Analyses were performed by instrumental and classical method. The temperature storage 2 and 6 °C and as well as prolonged storage time from 24 to 48 hours doesn't influence the density of bacteria. The simulation of inconsiderate manipulation with milk leads to a risen density of *St. aureus* one order of magnitude, but up to 48 hours. Using of preservatives, Heschen and Azidiol, doesn't show differences in preservation effect.

Key words: milk, storage conditions, temperature, preservative

Úvod

Automatické přístroje pro rychlé počítání celkového počtu mikroorganismů (dále CPM) jsou vhodnou alternativou ke stanovení CPM klasickou plotnovou metodou (Lachowsky a kol., 1997; Ramsahoi a kol., 2011).

V syrovém mléce jsou nejběžnějšími mikrobiálními kontaminanty koliformní bakterie, pseudomonázy, stafylokoky, ale syrové mléko obsahuje i mikroorganismy, které jsou v syrovém mléce žádoucí, tzn. laktobacily a laktokoky, jelikož upravují poměr kyselinitvorných a alkaligenních bakterií z celkového počtu mikroorganismů. Z hodnocení bactoscanového čísla a denzity bakteriální suspenze lze vyvodit lineární vztah. Správná detekce s použitím fluorescenčních optických metod je závislá na druhu mikroorganismu, ale také na fyziologickém stavu buněk, jelikož vitální buňky, u kterých probíhá aktivně metabolismus, fluoreskují při barvení akridinovou oranží jasně oranžově v porovnání se slabě zelenou fluorescencí u metabolicky neaktivních buněk (Rapposch a kol., 2000).

Ke změnám analyzovaných parametrů přispívá mnoho faktorů, mimo jiné i způsob úchovy vzorků od jejich odběru až do analýzy. Pokud vzorky nejsou po odběru ihned zpracovány, je nezbytně nutné zajistit vhodný způsob konzervace. U nekonzervovaného vzorku mléka, skladovaného při teplotě 4 - 10 °C, dochází k výraznému zvýšení počtu mikroorganismů již během 24 hodin po odběru (Sierra a kol., 2009). Dle ČSN 57 0539 je doporučováno použití dvou konzervačních činidel vhodných současně pro stanovení mikroorganismů jak klasickou tak instrumentální metodou. Heschenovo činidlo, obsahující jako konzervační složku sůl kyseliny sorbové, umožňuje skladovat vzorky při teplotě 5 - 10 °C nejdéle 48 hodin. Druhé konzervační činidlo - Azidiol, obsahující antibiotikum chloramfenikol, při stejných skladovacích podmínkách prodlužuje účinnost vzorků až na 10 dnů (ČSN 57 0539). Elizondo a kol. (2005) ověřovali konzervační účinky Azidiolu u ovčího mléka při použití dvou různých dávek tj. standardní předepsané množství a poloviční dávka. Obě dávky byly dostačující pro uchování mléka při 6 °C - 2 °C po dobu tří dnů, nebo při pokojové teplotě po dobu 15 hodin.

Materiál

- UHT mléko 3,5 % tuku
- kmeny z České sbírky mikroorganismů v Brně ve formě želatinových disků
 - *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955
 - *Staphylococcus aureus* CCM 4516
 - *Escherichia coli* CCM 3954
- kmeny ze Sbírký mlékařských mikroorganismů Laktoflora®, matečné mléčné kultury v tekuté formě
 - *Lactobacillus helveticus* CCDM 447
 - smetanová kultura CCDM 1

Záměrně byly vybrány kmeny, které vytvářejí řetízky. Při mechanickém, namáhání mléka se zvyšuje možnost rozpadu řetízku na jednotlivé buňky a tím se zvyšuje pravděpodobnost stanovení vyšší denzity mikroorganismů.

- konzervační činidla

- Heschenovo činidlo
- Azidiol

Příprava vzorků

Pro přípravu vzorků bylo třeba stanovit denzitu u použitých kmenů, prostřednictvím klasické plotnové metody jako celkový počet mikroorganismů dle ČSN EN ISO 4833. U mikroorganismů ve formě želatinového disku bylo připraveno 0. ředění vložením 1 disku do 100 ml fyziologického roztoku.

Dle denzity kmenů byly přidávány kultury do UHT plnotučného mléka metodou standardního přídavku tak, aby výsledná denzita od každého kmene byla cca 10³ KTJ a 10⁵ KTJ/ml. Tyto dvě denzity byly zvoleny, aby modelovaly vysoce kvalitní mléka a mléka s mezní hodnotou CPM dle ČSN 57 0529. U kmene *Pseudomonas* byly připraveny pouze vzorky s denzitou 10³ KTJ, vzhledem k nízké výchozí denzitě želatinového disku, získaná reálná denzita však odpovídala vyšší hodnotě. Konzervanty byly připraveny a dávkovány dle ČSN 57 0539.

Výsledky

Rozebory byly prováděny paralelně klasickou plotnovou metodou jako stanovení celkového počtu mikroorganismů dle ČSN EN ISO 4833 a instrumentální metodou na dvou přístrojích (BactoCount IBC 50 - Bentley). Výsledek z přístroje BactoCount byl získán jako průměrná hodnota ze dvou měření. Hodnoty získané oběma metodami byly převedeny na dekadický logaritmus. Měření bylo opakováno ve dvou sériích.

Bylo sledováno několik závislostí:

1/ vliv skladovací teploty a doby skladování u vzorků konzervovaných Heschenovým činidlem: rozebory byly provedeny po 24 a 48 hodinách skladování při teplotách 2 a 6 °C. Během skladování při těchto teplotách za 24 i 48 hodin nedošlo ke změně denzity mikroorganismů

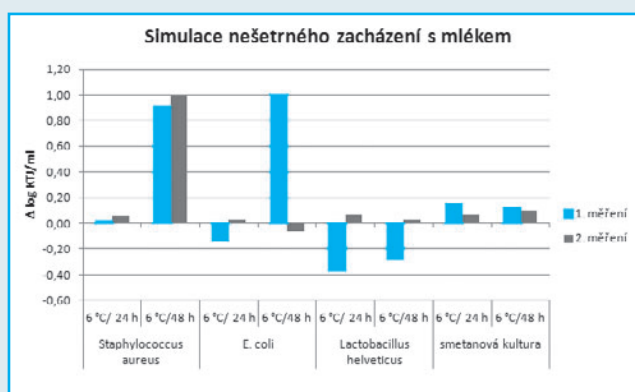
Tab. 1 Simulace nešetrného zacházení s mlékem u vzorků s nižší denzitou, stanovení klasickou plotnovou metodou, konzervant Heschenovo činidlo

| kmen | podmínky skladování | Δ log KTJ/ml | |
|---------------------------------|---------------------|--------------|-----------|
| | | 1. měření | 2. měření |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 6 °C/ 24 h | 0,02 | 0,06 |
| | 6 °C/48 h | 0,91 | 1,00 |
| <i>E. coli</i> | 6 °C/ 24 h | -0,14 | 0,03 |
| | 6 °C/48 h | 1,00 | -0,07 |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | 6 °C/ 24 h | -0,37 | 0,07 |
| | 6 °C/48 h | -0,28 | 0,03 |
| smetanová kultura | 6 °C/ 24 h | 0,15 | 0,07 |
| | 6 °C/48 h | 0,12 | 0,10 |

Tab. 2 Simulace nešetřného zacházení s mlékem u vzorků s vyšší denzitou, stanovení instrumentálně a klasickou plotnovou metodou, konzervant Heschenovo činidlo

| kmen | podmínky skladování | $\Delta \log \text{KTJ/ml}$ | | | | | |
|---------------------------------|---------------------|-----------------------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-----------------|
| | | 1. měření | | | 2. měření | | |
| | | 1. přístroj | 2. přístroj | klasická metoda | 1. přístroj | 2. přístroj | klasická metoda |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 6 °C/ 24 h | 0,38 | 0,02 | -0,07 | 0,03 | 0,01 | 0,03 |
| | 6 °C/48 h | 0,42 | -0,03 | -0,02 | 0,02 | 0,09 | -0,09 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 6 °C/ 24 h | 0,02 | 0,00 | -0,23 | 0,05 | 0,01 | 0,07 |
| | 6 °C/48 h | 0,02 | 0,01 | -0,03 | 0,04 | -0,04 | 0,18 |
| <i>E. coli</i> | 6 °C/ 24 h | -0,06 | 0,01 | -0,12 | -0,01 | -0,04 | -0,17 |
| | 6 °C/48 h | 0,07 | 0,01 | -0,15 | -0,02 | 0,00 | -0,32 |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | 6 °C/ 24 h | -0,20 | -0,01 | -0,32 | 0,04 | -0,02 | 0,09 |
| | 6 °C/48 h | -0,04 | -0,01 | -0,29 | -0,01 | 0,02 | 0,04 |
| smetanová kultura | 6 °C/ 24 h | -0,22 | -0,13 | -0,04 | 0,03 | 0,03 | -0,02 |
| | 6 °C/48 h | -0,18 | -0,10 | -0,22 | -0,06 | 0,00 | 0,01 |

nad rámec mikrobiologické chyby. Rozdíl $\log \text{KTJ/ml}$ byl menší než 0,45 u klasické metody s výjimkou vzorku *Lbc. helveticus* s denzitou 10^4KTJ/ml ($0,72 \log \text{KTJ/ml}$). U výsledků získaných instrumentální metodou se hodnoty pohybovaly od 0,02 do 0,29 $\log \text{KTJ/ml}$ max.

Graf č. 1 Simulace nešetřného zacházení s mlékem stanovení klasickou plotnovou metodou, konzervant Heschenovo činidlo**Tab. 3** Vliv použitého konzervačního činidla u vzorků s nižší denzitou, skladování 6 °C/24 h, stanovení klasickou plotnovou metodou

| kmen | $\Delta \log \text{KTJ/ml}$ | |
|---------------------------------|-----------------------------|-----------|
| | 1. měření | 2. měření |
| <i>St. aureus</i> | -0,98 | 1,11 |
| <i>E. coli</i> | -1,35 | -0,26 |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | -0,37 | 0,04 |
| smetanová kultura | 0,95 | -0,16 |

Tab. 4 Vliv použitého konzervačního činidla u vzorků s vyšší denzitou, skladování 6 °C/24 h, stanovení instrumentálně a klasickou plotnovou metodou

| kmen | $\Delta \log \text{KTJ/ml}$ | | | | | |
|---------------------------------|-----------------------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-----------------|
| | 1. měření | | | 2. měření | | |
| | 1. přístroj | 2. přístroj | klasická metoda | 1. přístroj | 2. přístroj | klasická metoda |
| <i>Ps. aeruginosa</i> | 0,60 | 0,15 | -0,13 | 0,18 | 0,17 | -1,07 |
| <i>St. aureus</i> | 0,29 | 0,29 | 0,00 | 0,42 | 0,40 | 0,04 |
| <i>E. coli</i> | 0,11 | 0,10 | -0,62 | 0,24 | 0,32 | 0,01 |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | -0,36 | -0,03 | -0,32 | 0,26 | 0,20 | 0,20 |
| smetanová kultura | 0,20 | 0,03 | 0,00 | 1,02 | 0,87 | -0,80 |

2/ vliv nešetřného a opakovaného přečerpávání mléka: simulace byla provedena třepáním mléka na vortexu po dobu 5 minut, vzorky byly skladovány při 6 °C, rozборы byly provedeny po 24 a 48 hodinách, hodnoty mlék vystavených mechanickému namáhání byly srovnávány s kontrolními vzorky bez třepání. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1 a 2 jako $\Delta \log \text{KTJ}$. Nárůst denzity byl zjištěn u kmene *St. aureus* o cca 1 řád, ale až po 48 hodinách skladování.

3/ vliv použitého konzervačního činidla (Heschenovo činidlo, Azidiol), rozbor byl proveden po 24 hodinové úchově vzorků při 6 °C. Výsledky jsou uvedeny v tab. č. 3 a 4.

V tabulce č. 1 a 3 jsou u vzorků s reálnou nižší denzitou tj. 10^3 a 10^4KTJ/ml uvedeny výsledky získané pouze plotnovou metodou, jelikož vstupní surovina (mléko) měla při použití instrumentální metody hodnoty impulsů nad denzitou 10^3 , denzita 10^4KTJ/ml byla limitní.

Závěr

Byly sledovány vzorky konzervované Heschenovým činidlem uchovávané za rozdílných podmínek při teplotě 2 a 6 °C po dobu 24 a 48 hodin. U vzorků s nižší denzitou byl stanoven počet mikroorganismů klasickou plotnovou metodou. U vzorků s denzitou 10^4 a vyšší byly vzorky měřeny také automatickými přístroji BactoCount. Při srovnání výsledků vzorků skladovaných při různých podmínkách byl rozdíl $\Delta \log \text{KTJ/ml}$ menší než 0,45 u klasické metody s výjimkou vzorku *Lbc. helveticus* s denzitou 10^4KTJ/ml . U výsledků získaných instrumentální metodou

byl $\Delta \log$ KTJ/ml max. 0,29. Lze tedy konstatovat, že rozdílné podmínky skladování v rozmezí 2-6 °C a délka skladování 24 a 48 hodin neovlivnily denzitu mikroorganismů. Rozdíly se pohybovaly v chybě mikrobiologické metody.

Dále byl sledován vliv nešetrného zacházení s mlékem u denzity mikroorganismů. Část vzorků byla po přípravě třepána po dobu 5 minut na laboratorní třepáče a po té skladována po dobu 24 a 48 hodin při teplotě 6 °C. U vzorků obsahujících kmen *St. aureus* v denzitě 10^4 (tab. č. 1) byla zjištěn nárůst o cca 1 řád, ale až po 48 hodinovém skladování. U ostatních vzorků nebyl zjištěn rozdíl větší než 0,37 log. Nárůst denzity u vzorku *E. coli* s denzitou 10^4 při klasickém stanovení nebyl při opakování potvrzen. Vliv nešetrného zacházení s mlékem u kmene *St. aureus* lze zdůvodnit morfologií tohoto rodu. Koagulázopozitivní stafylokoky se v syrovém mléce vyskytují, ale většinou nikoli jako dominantní mikroflóra, proto by se tento jev v syrovém mléce, při zastoupení různých druhů, nepromítl do celkového počtu mikroorganismů.

Byl testován vliv použitého konzervačního činidla - Heschena činidla a Azidiolu na denzitu mikroorganismů při 6 °C/24 hodin. Byly zjištěny větší rozdíly mezi konzervanty, u některých vzorků i o více než jeden řád, ale jelikož výkyvy denzity byly v kladných i záporných hodnotách, nelze to přičítat vlivu konzervačního činidla.

Poděkování

Práce vznikla s finanční podporou Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci řešení úkolu 2B08072.

Literatura:

- ELIZONDO J., ALDUNATE A., EZCURRA P., GALLEGU I., SAIGOS E., ULAYAR E., IZCO J. M. (2007): Efficiency of the proportion of azidol on preservation in ewe s milk samples for analysis. *Food control.*, March, 18 (3), s.185-190.
- LACHOWSKI W. M., MCNAB W. B., GRIFFITHS M., ODUMERU J. (1997): A comparison of the Bactoscan 8000S to three cultural methods for enumeration of bacteria in raw milk. *Food research International*, April-May, 3 (3-4), s. 273-280.
- RAMSAHOI L., GAO A., FABRI M., ODUMERU J. A. (2011): Assessment of the application of an automated electronic milk analyzer for the enumeration of total bacteria in raw goat milk. *Journal Dairy Sci.*, 94 (7), s. 3279-3287.
- RAPPOSCH S., ZANGERL P., GINZINGER W. (2000): Influence of fluorescence of bacteria stained with acridine orange on the enumeration of microorganisms in raw milk. *Journal Dairy Sci.*, 83, (12), s. 2753-2758.
- SIERRA D., SÁNCHEZ A., CONTRERAS A., LUENGO C., CORRALES J. C., DE LA FE C., GUIRAO I., MORALES C. T., GONZALO C. (2009): Short communication: effect of storage and preservation on total bacterial counts determined by automated flow cytometry in bulk tank goat milk. *Journal Dairy Sci.*, 92, (10), s. 4841-4845.
- ČSN EN ISO 4833 (56 0083) (2003): Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda pro stanovení celkového počtu mikroorganismů - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.
- ČSN 57 0539 (1999) Automatické stanovení bakterií v syrovém mléce přímým počítáním bakteriálních buněk.
- ČSN 57 0529 (1993) Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování.

Přijato do tisku 4. 12 2011
Lektorováno 20. 1. 2012

INDIKACE BAKTERIOFÁGŮ V RIZIKOVÝCH PROVOZECH A MOŽNOSTI MINIMALIZACE ZTRÁT

Jitka Peroutková, Marta Pechačová, Alexandra Šalaková
Výzkumný ústav mlékárenský s r.o.

Indication of bacteriophage in high-risk operations and possibilities of minimize losses

Abstrakt

Bakteriofágová kontaminace zejména v technologii výroby sýrů, ale i při výrobě fermentovaných výrobků, je závažný problém, který může způsobit, dle rozsahu napadení fágem, v lepším případě prodloužení technologického procesu výroby, v horším případě veliké ekonomické ztráty. Vzhledem k aktuálnosti, byla této problematice věnována pozornost a v rámci řešení výzkumného záměru MSM 2672286101 byla vypracována certifikovaná metodika s cílem podat ucelené shrnutí metod zjišťování bakteriofága a upozornit na kritická místa v technologiích výroby sýrů, tvarohů i fermentovaných výrobků. V metodice jsou doporučeny kroky, které je třeba v průběhu technologie udělat tak, aby ekonomické ztráty a zdravotní riziko při průkazu bakteriofága bylo minimální.

Klíčová slova: bakteriofág, sanitace, fagorezistentní kultura, rotace kultur

Abstract

Bacteriophage contamination could cause serious problems in fermented products processing and especially, during cheese ripening. The consequence could be prolongation of technological procedure or also economic losses depending on the extent of phage attack. This problem is a topical issue nowadays and due to this reason, problem of bacteriophage contamination was a target also in dealing with research project MSM No. 2672286101. Within above mentioned project, a certified methodology was developed. The aim of this methodology was to point out some of the most critical places in cheese, quark and fermented products processing and to give comprehensive information about the methods of phage determination. In the methodology, important steps to avoid phage contamination during processing in order to minimize economic losses are included.

Key words: bacteriophage, sanitation, phage-resistant culture, rotation of cultures

Úvod

Přítomnost fágů byla zjištěna v nejrůznějších odvětvích průmyslu od potravinářského, chemického, farmaceutic-