

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 nešetřného 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 nešetřného 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., GALLEGO 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-

kého, krmivářského a dalších (Émond a Moineau, 2004), nicméně v mlékárenském průmyslu je výskyt fága nejvíce zdokumentovaný. Jedním z nejdůležitějších ukazatelů významně ovlivňujících kvalitu zákysových kultur a tím značnou část mlékárenských technologií (sýrařství, výroba tvarohu a fermentovaných výrobků) je právě přítomnost bakteriofága.

Termín bakteriofág pochází z řeckého překladu "vir, který může infikovat bakterie". Již z názvu je patrné, že hostitelem nejsou vyšší eukaryotní organismy, nýbrž prokaryotní bakterie. Jednou z klíčových rolí fágů je vyrovnat bakteriální populaci v daném prostředí a umožnit tak růst náročnějším bakteriálním kmenům.

Jedná se o nukleoproteinové částice, které nesou genetickou informaci, ale nemají enzymové vybavení pro zajištění základních životních funkcí. Jsou však schopny infikovat vhodnou hostitelskou buňku, jsou tedy obligátní parazité, přenášejí dovnitř buňky nukleovou kyselinu a využívají hostitelova enzymového systému pro svou replikaci (Šilhánková, 1995). Po vpravení genetické informace mohou nastat 2 možnosti. Buď se fágová DNA začlení do bakteriálního chromozómu jako tzv. profág a je replikována společně s buněčnou DNA, genetický materiál fága je tedy přenášen do dceřiných buněk. Tento cyklus se nazývá lysogenní, nedochází při něm k lysi buněk. Druhou možností je cyklus lytický, po infekci fágem dochází uvnitř buňky k vzniku virových komponent. Po biosyntéze se jednotlivé fágové komponenty kompletují za vzniku velkého množství fágů, které se po lyzi buňky uvolňují a stávají se infekčními. Nejruznější bakteriální stresové faktory jako jsou např. vysoká teplota, vysoká koncentrace soli, přítomnost antimikrobiálních látek, nedostatek živin či UV záření, mohou indukovat profága a lysogenní cyklus se přemění na lytický (Lunde a kol., 2005; Madera a kol., 2009).

Lytický cyklus se u zákysových kultur projeví zpomalením prokysávání nebo úplným zastavením kysání. Toto s sebou nese riziko znehodnocení výroby a velké ekonomické ztráty. Ke snížení dopadu bakteriofágové kontaminace na mléčné kvašení je vhodné preferovat ve startovacích kulturách bakterie odolné vůči fágům, jejichž odolnost byla přezkoušena (Coffey a Ross, 2002).

Je prokázáno, že téměř všechny používané druhy bakterií mohou sloužit jako hostitelé jednoho nebo několika druhů bakteriofága. Mlékárenské závody se i přes důslednou sanitaci opakovaně potýkají v průběhu technologického zpracování s kontaminací bakteriofágem. Mnohdy se jedná o ložiskové zdroje kontaminace. Tato fokusová kontaminace je způsobena přítomností biofilmů, a to zejména v provozech používajících tvrdou vodu.

Využívání syrovátky nebo koncentráty syrovátkových bílkovin do některých výrobků v průběhu výroby, může znamenat kontaminaci fágem právě prostřednictvím těchto komponent (Chopin, 1980).

V sýrařské technologii se z důvodu výtěžnosti a s ohledem na konzistenci běžně používá pasterační teplota 74 nebo 85 °C. Z toho důvodu je riziko bakteriofágové kontaminace o to větší, protože bakteriofág je zcela inhi-

bován až teplotou vyšší než 92 °C. Menší riziko fágové kontaminace je v technologii fermentovaných výrobků, kde je pro zlepšení konzistence používána pasterační teplota 95 °C.

Popis metodiky

Indikace možné přítomnosti bakteriofága v provozních zákysech a jeho eliminace

Mléko na provozní zákysech je nezbytně nutné pasterovat při teplotě 95 °C s výdrží 30 minut. Musí být negativní na rezidua inhibičních látek.

Při napadení kultury fágem dochází k prodloužení doby kultivace zákysech specifikované výrobcem v technickém listu, prodlužuje se čas nutný k dosažení optimální kyselosti při dodržení kultivačních podmínek (očkovací dávka, kultivační teplota, délka kultivace). Kyselost provozního zákyse může kolísat v závislosti na složení mléka, menší rozdíly v kyselosti ($\Delta \text{SH} \geq 10 \text{ SH}$, nebo $\Delta \text{pH} 0,4$) tak nedetekují přítomnost bakteriofága.

Pokud má provozní zákysech nízkou kyselost ($< 25 \text{ SH}$ mezofilní kultura) a musí být na výrobu sýrů použit, je nezbytně nutné volit vyšší inokulační dávku o 50 až 100 % oproti běžné očkovací dávce a nový provozní zákysech pak připravit z jiné kultury. Je vhodnější, pokud se rotace kultur nepoužívá jen při problémech, ale stane se zavedenou praxí.

V provozech využívajících tvrdou vodu, kde je zvýšené riziko tvorby biofilmů, je nezbytně nutné po běžné sanitaci dané HACCP (louh, kyselina) použít cyklus kyseliny citrónové (2 % roztok o teplotě min. 55 °C, doba působení alespoň 30 minut) a tak minimalizovat riziko ložiskové kontaminace bakteriofágem. Při podezření na přítomnost fágové kontaminace je důležitým krokem po ukončení daného sanitačního režimu zařazení dezinfekčních přípravků na bázi aktivního chlóru.

Při napadení zákysech bakteriofágem, dochází k prodloužení technologického procesu v průběhu lisování sýrů. Při špatném prokysání zůstává vysoký obsah zbytkové laktózy, která slouží jako potenciální zdroj živin pro nežádoucí mikroorganismy jako jsou koliformní bakterie, *E. coli* a kvasinky. S vyšší denzitou těchto skupin mikroorganismů se vyskytují konzistenční vady sýra. Proto je nutné dodržet kyselost sýra dle technologického postupu před vložením do solné lázně.

Indikace možné kontaminace v technologii výroby fermentovaných výrobků

Při podezření na přítomnost bakteriofága dochází k prodloužení doby fermentace finálních výrobků při dodržení stejné kultivační teploty a dávky inokula. V průběhu kyselého srážení způsobeného činností kultury probíhá také sladké srážení činností termostabilních enzymů. Finální produkt má hrubou - písčitou až hrudkovitou konzistenci, netypickou a nečistou chuť. Při vysokém titru bakteriofága (vysoká denzita bakteriofága) může dojít až k úplnému zastavení fermentačního procesu a znehodnocení výroby. Pokud dojde k mechanickému

porušení koagulátu při pH okolo izoelektrického bodu kaseinu tzn. při pH 4,60 - 4,65, bude finální produkt řidký, bude se uvolňovat plazma a v chladu již nedojde k obnově konzistence. V tomto případě je nutné okamžitě realizovat výměnu kultury předepsanou systémem rotace kultur a po běžné sanitaci zařadit navíc cílenou desinfekci chlorovými preparáty. Jestliže nedojde ke zlepšení prokysávání, je nezbytně nutné nechat surovinu vyšetřit na přítomnost bakteriofága.

Metody zjištění přítomnosti bakteriofága

Existuje celá řada metod pro zjištění přítomnosti bakteriofága v surovině. Jejich využitelnost v praxi je dána především dostupností vybavení. Metody využívající jako kritérium kysací aktivitu a indikátorové testy jsou jednoduché a využitelné v jakékoli mlékárenské laboratoři. Některé metody, vyžadující speciální vybavení, např. metody spektrofotometrické, impedanční, konduktometrické, PCR apod., jsou vhodné pro specializovaná pracoviště. Zde je uveden výčet některých metod:

- metoda inhibice mléčného kysání je při šetření na mlékárenských závodech nejpoužívanější, metodou zjistíme nejen přítomnost fága, ale máme možnost výběru jiné fágorezistentní kultury bez další časové prodlevy, tím se sníží ekonomické ztráty. Lze rozlišit inhibici způsobenou fágem a přítomností reziduí inhibičních látek (dále RIL). Metoda je použitelná také pro stanovení titru bakteriofága.
- indikátorová metoda (orientační metoda) detekuje oslabení bakteriálních mléčných kultur, ale neumožňuje rozlišení příčin inhibice tj. inhibici způsobenou bakteriofágem nebo přítomností RIL. Metoda také neumožňuje výběr fágorezistentní kultury.
- zjištění přítomnosti bakteriofága elektronovým mikroskopem umožňuje fága detekovat a navíc rozlišit jeho možné morfologické variace, ale opět nelze otestovat fágorezistenci kultur. Metoda se využívá pouze pro výzkumné účely vzhledem k finanční nákladnosti zařízení (Svensson a Christiansson, 1991)
- PCR, snadná metoda využívaná pro taxonomické zařazení mlékárenských fágů (Dupont a kol., 2005; del Rio a kol., 2007)
- impedanční a konduktometrické metody zjišťují změnu vodivosti resp. impedance, tyto parametry jsou ovlivňovány množstvím metabolitů produkovaných buňkou

V metodice je detailně popsán postup stanovení metodou inhibice mléčného kysání a indikátorovou metodou.

Riziková místa v mlékárenské technologii

Je velice důležité striktně dodržovat oddělené syrovátkové hospodářství a nezaměňovat cisterny na mléko a na syrovátku. U cisteren jsou riziková místa víka a ventily. Dále jsou to zásobní tanky, ohřívač mléka, míchadlo na výrobníku, lisovací vany-perfor, výpusti lisovacích van, palety na sýry, solné lázně, homogenizátor, termizační zařízení a fermentační tanky.

Závěr

Metodika by měla sloužit mlékárenským provozům zaměřeným na výrobu fermentovaných výrobků, tvarohů a sýrů. Použitím chlorových preparátů, po běžné sanitaci louhem a kyselinou, a v případě provozů s tvrdou vodou ještě zařazením cyklu kyseliny citronové, je možné minimalizovat riziko bakteriofága na technologicky únosnou mez. Titr bakteriofága 10^2 , je běžně zjišťovaná hodnota, ve většině případů při dodržení technologických parametrů nedojde k problémům ve výrobě. Hodnota titru 10^4 se považuje za zvýšenou a rizikovou, již dochází k prodloužení technologického režimu, což je signál pro provedení nápravných opatření (cílená sanitace, rotace kultur), aby se situace nezhoršila zvyšující se denzitou bakteriofága. Při titru bakteriofága 10^6 a vyšší se provozní zákys nesráží, výměna kultury je nezbytná, vhodné je použití kultury k přímému očkování a opakovaná cílená sanitace chlorovými preparáty.

Součástí metodiky je výčet vytipovaných rizikových míst v technologii fermentovaných výrobků, sýrů a tvarohů. Ekonomické ztráty jsou dané mírou napadení fágem (prodloužení technologického procesu výrobu nebo zastavení prokysání), ale lze říci, že se u středně velkých mlékáren pohybují řádově v 100 tis. Kč, proto je důležité včasné rozpoznání příčiny problému.

Metodika je k dispozici u autorů.

Poděkování

Tato práce byla uskutečněna s finanční podporou MŠMT při řešení výzkumného záměru MSM 2672286101.

Literatura

- COFFEY, A., ROSS, R. P. (2002): Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 82, s. 303-321.
- DUPONT, K., VOGENSEN, F. K., JOSEPHSEN, J. (2005): Detection of lactococcal 936-species bacteriophages in whey by magnetic capture hybridization PCR targeting a variable region of receptor-binding protein genes. *Journal of Applied Microbiology*, 98 (4): s.1001-1009.
- ÉMOND E, MOINEAU S. (2007): Bacteriophages in food fermentations. In *Bacteriophage: genetics and molecular biology*. UK: Caister Academic Press; McGrath S, Van Sinderen D. Norfolk. s. 93-124.
- CHOPIN M. C. (1980): Resistance of 17 mesophilic lactic Streptococcus bacteriophages to pasteurization and spray-drying. *J Dairy Res.*, 47, s.131-139.
- LUNDE M., AASTVEIT A. H., BLATNY J. M., NES I. F. (2005): Effects of diverse environmental conditions on λ LC3 prophage stability in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.*, 71, s. 721-727.
- MADERA C., GARCIA P., RODRIGUEZ A., SUAREZ J. E., MARTINEZ B (2009): Prophage induction in *Lactococcus lactis* by the bacteriocin Lactococcin 972. *Int J Food Microbiol*, 129, s. 99-102.
- DEL RIO, B., BINETTI, A. G., MARTÍN, M. C., FERNÁNDEZ, M., MAGADÁN, A. H., & ALVAREZ, M. A. (2007): Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiology*, 24: s. 75-81.
- SVENSSON U., CHRISTIANSSON A. (1991): Methods for phage monitoring. *Bulletin of the IDF*, 263, s. 29-39.
- ŠILHÁNKOVÁ L. (1995): Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Praha, Victoria Publishing, s. 99-100. ISBN 80-85605-71-6

Přijato do tisku 28. 12. 2011

Lektorováno 17. 1. 2012