

**Poděkování:**

Práce vznikla za finanční podpory projektu QJ1210093 a s institucionální podporou MZE na rozvoj výzkumné organizace na základě rozhodnutí RO1415.

**Literatura:**

- CHRISTIAN LÖSER, THANET URIT, ANTON STUKERT, THOMAS BLEY (2013): Formation of Ethylacetate from Whey by *Kluyveromyces marxianus* on a Pilot Scale. *Journal of Biotechnology*, 163, č.1, s. 17-23.
- MYRA K. TARA, JEAN SOON PARK, BRIDGET D. MATHISON, LINDSEY L. KIMBLE, AND BOON P. CHEW (2013): Whey Protein, but Not Soy Protein, Supplementation Alleviates Exercise Induced Lipid Peroxidation in Female Endurance Athlete. *The Open Nutrition Journal*, 7, s.13-19.
- BIRSEN B. SOLAK, NIHAT A. (2012): Health Benefits of Whey Protein. *Journal of Food Science and Engineering*, 2, s. 129-137.
- GIULIANO DRAGONE, SOLANGE I. MUSSATTO, JOSÉ M. OLIVEIRA, JOSÉ A. TEIXEIRA (2009): Characterisation of Volatile Compounds in an Alcoholic Beverage Produced by Whey Fermentation. *Food Chemistry*, 112, č. 4, s. 929-935
- WENDORF, W. (2008): Uses of Whey in the Farmstead Setting. *Wisconsin Center for Dairy Research*.

Přijato do tisku: 20. 8. 2015

Lektorováno: 15. 9. 2015

## HODNOCENÍ RŮSTU *YERSINIA ENTEROCOLITICA* V PASTEROVANÉM KRAVSKÉM A KOZÍM MLÉČE V ZÁVISLOSTI NA SKLADOVACÍCH PODMÍNKÁCH

**MVDr. Šárka Bursová, Ph.D., MVDr. Lenka Necidová, Ph.D., Bc. Zuzana Lněničková, Bc. Kristýna Rojíčková**  
Ústav hygieny a technologie mléka,  
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3,  
612 42 Brno

### Assessment of Growth of *Yersinia enterocolitica* in Pasteurized Cow's and Goat's Milk Depending on Storage Conditions

**Souhrn**

Cílem uvedené studie bylo sledování růstu *Yersinia enterocolitica* (biovar 4, serovar O:3) v pasterovaném kravském a kozím mléce při teplotě 8 a 24 °C. Počet *Y. enterocolitica* byl stanoven plotnovou metodou na CIN agaru (30 °C, 48 hodin). Pasterované kozí mléko je vhodným médiem pro růst *Y. enterocolitica* při obou skladovacích teplotách, dosažené maximální počty se lišily pouze minimálně. Počáteční koncentrace inokula ani druh mléka neměly na intenzitu pomnožení zásadní vliv. Při výchozí koncentraci  $10^1$  KJTJ·ml<sup>-1</sup> a teplotě skladování 8 °C bylo dosaženo minimální infekční dávky po necelých 4 dnech skladování,

při výchozí koncentraci  $10^3$  KJTJ·ml<sup>-1</sup> během 48 hodin. Při teplotě 24 °C byla minimální infekční dávka dosažena vždy do 24 hodin. Pro zajištění bezpečnosti pasterovaného mléka je proto velmi důležité zabránit sekundární kontaminaci mléka po tepelném ošetření.

**Klíčová slova:** *Yersinia enterocolitica*, kravské mléko, kozí mléko, růst, teplota, skladování

**Summary**

The aim of the study was to evaluate the growth of *Yersinia enterocolitica* (biovar 4, serovar O:3) in pasteurized cow's and goat's milk at 8 and 24°C. Count of *Y. enterocolitica* was determined by plating method on CIN agar (30°C, 48 hours). The growth of *Y. enterocolitica* in pasteurized milk was very well at both storage temperatures and maximum counts differed only minimally. The initial concentration of inoculum or type of milk did not have major impact on the multiplication intensity. At the starting concentration of  $10^1$  CFU·ml<sup>-1</sup> and storage temperature 8 °C the minimum infectious dose was reached after about 4 days of storage, at  $10^3$  CFU·ml<sup>-1</sup> after about 48 hours. At 24°C the minimum infectious dose was achieved within 24 hours. To ensure the safety of pasteurized milk therefore is very important to avoid secondary contamination of milk after heat treatment.

**Keywords:** *Yersinia enterocolitica*, cow's milk, goat's milk, growth, temperature, storage

**Úvod**

*Yersinia enterocolitica* je významným původcem zoonóz, vyvolává střevní onemocnění lidí a zvířat. Podle údajů EFSA (European Food Safety Authority) bylo v roce 2013 v rámci Evropské unie hlášeno celkem 6 471 potvrzených případů yersiniózy, která je tak třetí nejčastější hlášenou zoonózou (EFSA a ECDC, 2015). Za hlavní zdroj infekce *Y. enterocolitica* jsou považovány kontaminované potraviny, a to i přes to, že patogenní kmeny *Y. enterocolitica* jsou z potravin izolovány zřídka (Fredriksson-Ahomaa a kol., 2006; Bari a kol., 2011).

Na základě fenotypových vlastností se *Y. enterocolitica* dělí do šesti biotypů, z nichž biotyp 1B je považován za vysoce patogenní, biotypy 2 až 5 jsou mírně patogenní a biotyp 1A je nepatogenní. Patogenní kmeny *Y. enterocolitica* nesou virulentní plasmid pYV a několik chromosomálně vázaných genů významných pro virulenci a patogenitu. Hlavním rezervoárem patogenních kmenů *Y. enterocolitica* jsou prasata (Fredriksson-Ahomaa a kol., 2006; EFSA, 2007; Fàbrega a Vila, 2012). Rozlišuje se více než 50 serotypů *Y. enterocolitica*. V USA a Japonsku se nejčastěji vyskytuje serotyp O:8, v Evropě, Austrálii a Kanadě O:3, ve Skandinávii a Nizozemí O:9. Humánní yersiniózu způsobují nejčastěji bioserotypy 1B/O:8; 2/O:5,27; 2/O:9; 3/O:3; 4/O:3. V Evropě je nejčastěji izolován bioserotyp 4/O:3 (Fredriksson-Ahomaa a kol., 2006; EFSA, 2007; Bari a kol., 2011).

Vysoké riziko vzniku gastrointestinálního onemocnění patogenními kmeny *Y. enterocolitica* představují potraviny živočišného původu (Rahimi a kol., 2014). *Y. enterocolitica* roste v širokém teplotním rozmezí -2 až 42 °C s optimem při 28 - 29 °C. V mléce se může množit i při teplotách blízkých se 0 °C (Bari a kol., 2011). Pasterované mléko je ideální živné médium umožňující proliferaci psychrotrofních *Y. enterocolitica* bez konkurenčního vlivu doprovodné mikroflóry (EFSA, 2007). *Y. enterocolitica* je termolabilní mikroorganismus, pasterací je spolehlivě devitalizována (Yehualaeshet a kol., 2013). Zdrojem *Y. enterocolitica* v pasterovaném mléce bývá nejčastěji sekundární kontaminace, nedodržení pasteračního režimu, přidavek syrového mléka nebo použití kontaminovaných přísad u ochucených výrobků (EFSA, 2007; Longenberger a kol., 2014). Ačkoli bývá *Y. enterocolitica* často izolována z masa a masných výrobků, byl zaznamenán její výskyt i v syrovém a pasterovaném mléce a dalších mléčných výrobcích. Zdrojem *Y. enterocolitica*, včetně enteropatogenních typů, mohou být i potraviny rostlinného původu či neupravená voda (Bari a kol., 2011; EFSA, 2007; Gupta a kol., 2015; Rahimi a kol., 2014).

Cílem uvedené studie bylo sledování růstu *Yersinia enterocolitica* v pasterovaném kravském a kozím mléce při různých skladovacích teplotách.

## Materiál a metodika

### Příprava vzorků mléka

Testovacím prostředím bylo pasterované kravské a kozí mléko získané z tržní sítě. K zaočkování byl použit kmen *Y. enterocolitica* CCM 5671 (biovar 4, serovar O:3) získaný z České sbírky mikroorganismů (Brno, Česká republika). Z 24-hodinové kultury *Y. enterocolitica* na krevním agaru byla připravena suspenze odpovídající 1. stupni McFarlan-

dovy zákalové stupnice, suspenzí byl zaočkován vždy 1 litr mléka tak, aby výchozí počet bakterií byl  $10^1$  KTJ·ml<sup>-1</sup>, resp.  $10^3$  KTJ·ml<sup>-1</sup>. Po promíchání bylo mléko pipetováno v množství 10 ml do sterilních zkumavek. Takto bylo vytvořeno pro každý druh mléka a každou výchozí koncentraci inokula vždy 10 sérií po 8 zkumavkách. Pět sérií bylo inkubováno při teplotě 8 °C po dobu 14 dní, 5 sérií při teplotě 24 °C opět po dobu 14 dní. Odběr vzorků pro stanovení počtu *Y. enterocolitica* byl prováděn v pravidelných intervalech. Současně byla provedena slepá zkouška s nezaočkováním mlékem.

### Stanovení počtu *Y. enterocolitica*

Zpracování vzorků bylo provedeno podle ČSN EN 6887-1 (1999). Vybraná desetinásobná ředění byla rozetřena v množství 0,2 ml na povrch agaru s cefsulodinem, Irgasanem<sup>TM</sup> a novobiocinem (CIN; HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Mumbai, Indie), naočkované Petriho misky byly inkubovány 48 hodin při 30 °C. Poté byl stanoven počet *Y. enterocolitica* v 1 ml vzorku mléka. Současně byla měřena hodnota pH mléka.

### Statistické vyhodnocení

Každý dílčí pokus byl proveden v pěti paralelních stanoveních. Hodnoty získané z paralelních stanovení byly posouzeny Grubbsových testem pro vyloučení extrémních odchylek (program UNISTAT, verze 5.1, UNISTAT Ltd., UK), poté byl vypočítán aritmetický průměr a stanovena směrodatná odchylka (SD).

## Výsledky a diskuse

Výsledky stanovení počtu *Yersinia enterocolitica* jsou shrnuty v tabulce 1, vytvořené růstové křivky jsou zobra-

**Tab. 1** Počet *Yersinia enterocolitica* (log KTJ·ml<sup>-1</sup>) v konzumním kravském a kozím mléce, průměrná hodnota z pěti paralelních stanovení ± SD

Den	Kravské mléko				Kozí mléko			
	10 <sup>1</sup> KTJ·ml <sup>-1</sup>		10 <sup>3</sup> KTJ·ml <sup>-1</sup>		10 <sup>1</sup> KTJ·ml <sup>-1</sup>		10 <sup>3</sup> KTJ·ml <sup>-1</sup>	
	8 °C	24 °C	8 °C	24 °C	8 °C	24 °C	8 °C	24 °C
0	1,35 ± 0,28	1,25 ± 0,27	3,08 ± 0,08	3,72 ± 0,06	1,62 ± 0,11	1,51 ± 0,14	3,43 ± 0,16	3,40 ± 0,07
1	1,87 ± 0,37	5,73 ± 0,56	3,64 ± 0,12	7,98 ± 0,03	2,46 ± 0,05	7,52 ± 0,08	4,17 ± 0,04	8,09 ± 0,35
2	3,20 ± 0,33	8,80 ± 0,12	4,51 ± 0,19	9,01 ± 0,08	3,13 ± 0,09	8,79 ± 0,34	5,33 ± 0,16	8,76 ± 0,30
3	4,41 ± 0,33	9,33 ± 0,18	5,65 ± 0,23	9,40 ± 0,17	4,47 ± 0,12	9,09 ± 0,11	6,35 ± 0,23	8,97 ± 0,29
4	5,24 ± 0,40	9,60 ± 0,23	6,71 ± 0,13	9,27 ± 0,09	4,94 ± 0,33	9,37 ± 0,31	7,66 ± 0,41	9,17 ± 0,09
7	8,41 ± 0,49	9,41 ± 0,06	8,79 ± 0,05	9,41 ± 0,09	7,92 ± 0,34	9,20 ± 0,06	8,82 ± 0,13	9,28 ± 0,11
10	9,04 ± 0,14	9,34 ± 0,17	8,83 ± 0,02	9,47 ± 0,09	8,54 ± 0,26	9,42 ± 0,06	8,71 ± 0,45	8,93 ± 0,16
14	8,96 ± 0,39	9,19 ± 0,29	9,13 ± 0,05	9,58 ± 0,33	8,95 ± 0,10	9,44 ± 0,07	8,89 ± 0,09	9,33 ± 0,07

**Tab. 2** Počáteční a konečná hodnota pH konzumního kravského a kozího mléka zaočkovaného *Yersinia enterocolitica*, průměrná hodnota z pěti paralelních stanovení

Den	Kravské mléko				Kozí mléko			
	10 <sup>1</sup> KTJ·ml <sup>-1</sup>		10 <sup>3</sup> KTJ·ml <sup>-1</sup>		10 <sup>1</sup> KTJ·ml <sup>-1</sup>		10 <sup>3</sup> KTJ·ml <sup>-1</sup>	
	8 °C	24 °C	8 °C	24 °C	8 °C	24 °C	8 °C	24 °C
0	6,65	6,63	6,72	6,64	6,69	6,70	6,72	6,72
14	6,51	5,67	6,75	5,75	6,92	6,19	6,71	5,80

zeny v grafech 1 - 4. Pro srovnání jsou v grafech uvedeny i růstové křivky modelované pro jednotlivé teploty a výchozí počty *Y. enterocolitica* pomocí databáze prediktivní mikrobiologie ComBase (<http://www.combase.cc/>) se zadanými parametry: pH 6,7 a aktivita vody 0,997. Průběh modelových růstových křivek i křivek získaných při vyšetření vzorků kravského a kozího mléka je velmi podobný. Výraznější rozdíl je pouze v maximální dosažené hodnotě, kdy databáze ComBase predikuje nejvyšší počet *Y. enterocolitica* pouze 8,3 log počtu bakterií v 1 ml. Průběh růstových křivek *Y. enterocolitica* byl ovlivněn teplotou skladování. Při 8 °C byl nárůst počtu bakterií pozvolný, hodnoty 8 log KTJ·ml<sup>-1</sup> bylo dosaženo při výchozí koncentraci inokula 10<sup>1</sup> KTJ·ml<sup>-1</sup> po 7 dnech skladování, při výchozí koncentraci 10<sup>3</sup> KTJ ml<sup>-1</sup> za 5 - 6 dní. Při teplotě 24 °C došlo k prudkému nárůstu počtu *Y. enterocolitica*, hodnoty 8 log KTJ·ml<sup>-1</sup> bylo dosaženo za 1 - 2 dny (inokulum 10<sup>1</sup> KTJ ml<sup>-1</sup>), resp. 24 hodin (inokulum 10<sup>3</sup> KTJ·ml<sup>-1</sup>). Po 14 dnech skladování se počet *Y. enterocolitica* pohyboval v rozmezí 8,89 - 9,58 log KTJ·ml<sup>-1</sup>, výchozí koncentrace inokula ani teplota uchovávání mléka neměly na konečný počet *Y. enterocolitica* výrazný vliv.

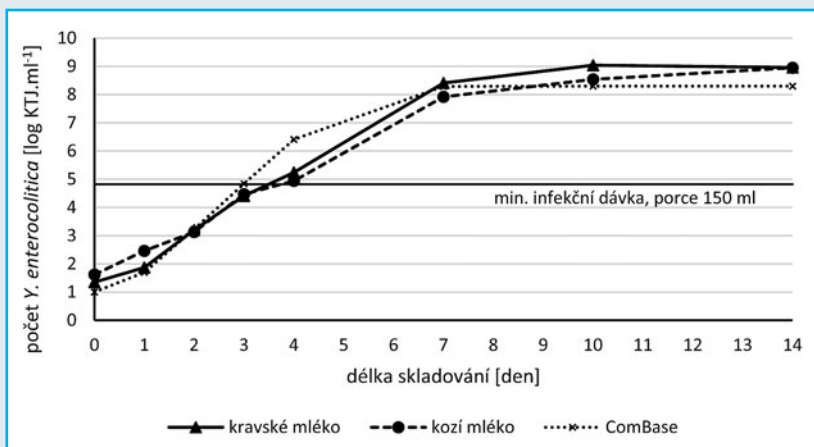
*Y. enterocolitica* roste v širokém teplotním rozmezí -2 až 42 °C, při nízkých teplotách dlouhodobě přežívá (Bari

a kol., 2011; Divya a Varadaraj, 2013). Yehualaeshet a kol. (2013) sledovali účinek teploty na růst *Y. enterocolitica* v pasterovaném a autoklávaném mléce. Při teplotě 4 a 24 °C byl v pasterovaném mléce pozorován nárůst počtu *Y. enterocolitica* o několik logaritmičeských řádů. Divya a Varadaraj (2013) potvrdili množení *Y. enterocolitica* v obnoveném sušeném mléce skladovaném při 4 °C, kdy po 20 dnech došlo ke zvýšení počtu o 1 logaritmický řád.

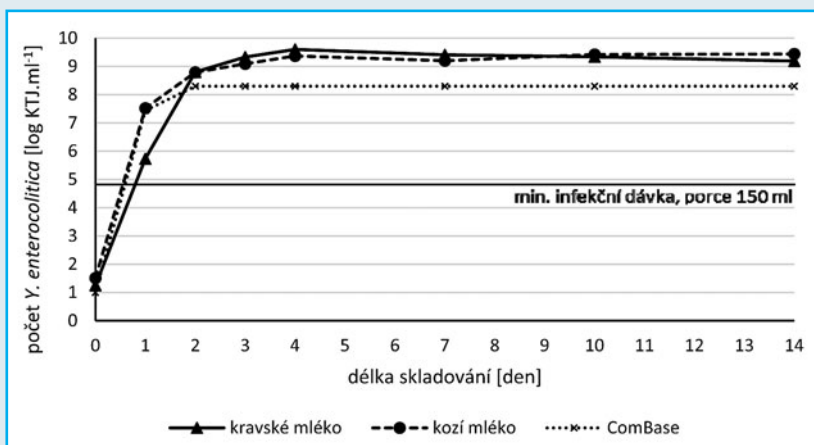
Tabulka 2 uvádí počáteční a konečné hodnoty pH mléka zaočkovaného *Y. enterocolitica*. Minimální hodnota pH pro růst *Y. enterocolitica* je 4,2 - 4,4 (Bari a kol., 2011), optimální pH 7 - 8 (Fernandes, 2009). Hodnoty pH kravského i kozího mléka se v průběhu celého pokusu pohybovaly mírně pod optimálním pH, naše výsledky potvrzují, že pasterované mléko je vhodným médiem umožňujícím růst a množení *Y. enterocolitica*.

Ve slepých vzorcích (mléko nezaočkované *Y. enterocolitica*) byl ve všech případech stanoven počet *Y. enterocolitica* odhadem < 5 KTJ·ml<sup>-1</sup>, tj. pod mezí detekce použité plotnové metody. Hodnota pH se pohybovala v rozmezí 6,6 - 6,7.

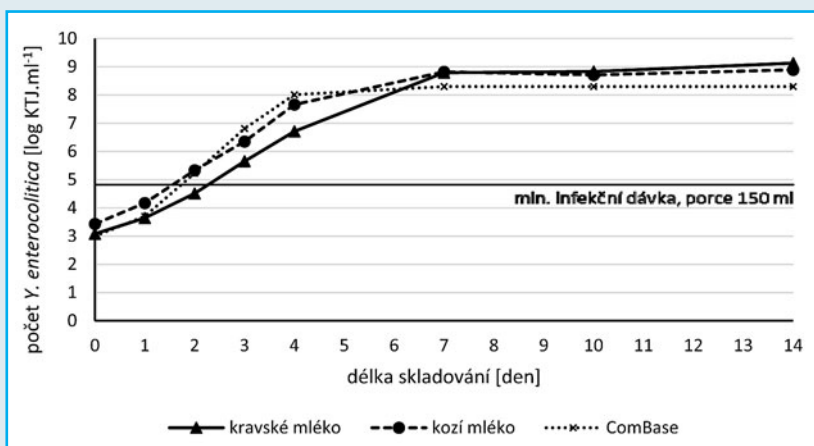
Předpokládaná infekční dávka *Y. enterocolitica* představuje 10<sup>7</sup> - 10<sup>9</sup> buněk (Cabanová a Čuvalová, 2014).



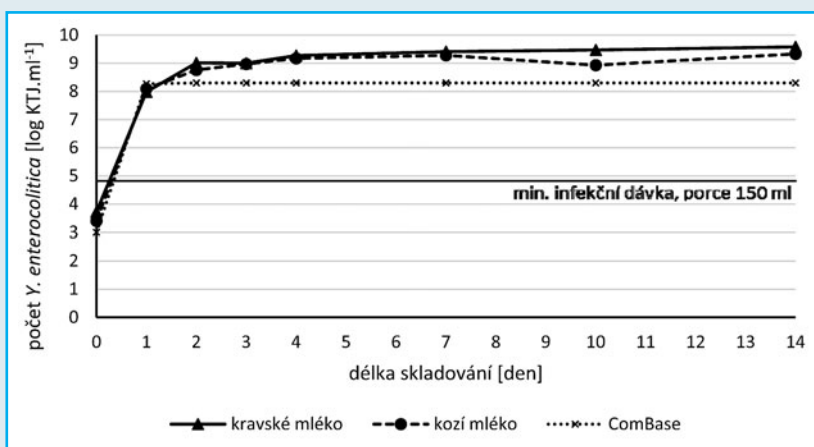
**Graf 1** Růst *Y. enterocolitica* v mléce skladovaném při 8 °C, inokulum 10<sup>1</sup> KTJ·ml<sup>-1</sup>



**Graf 2** Růst *Y. enterocolitica* v mléce skladovaném při 24 °C, inokulum 10<sup>1</sup> KTJ·ml<sup>-1</sup>



**Graf 3** Růst *Y. enterocolitica* v mléce skladovaném při 8 °C, inokulum  $10^3$  KTJ.ml<sup>-1</sup>



**Graf 4** Růst *Y. enterocolitica* v mléce skladovaném při 24 °C, inokulum  $10^3$  KTJ.ml<sup>-1</sup>

teplotě velmi rychlé a i při nízké počáteční kontaminaci jsou počty na úrovni infekční dávky dosaženy během prvních 24 hodin. Současně může při neopatrné manipulaci s touto potravinou dojít k přenesení bakterie na pracovní povrchy a předměty v domácnostech, kde poté může přežívat.

## Závěr

*Yersinia enterocolitica* se v pasterovaném mléce velmi dobře množila při obou skladovacích teplotách, dosažené maximální počty se lišily pouze minimálně. Počáteční koncentrace inokula ani druh mléka neměly na intenzitu pomnožení zásadní vliv. Z vytvořených růstových křivek je patrné, že při teplotě 24 °C došlo k podstatnému zkrácení generační doby. Díky svému psychrotrofnímu charakteru, se *Y. enterocolitica* může v pasterovaném mléce dobře množit i při chladničkových teplotách. Pro zajištění bezpečnosti mléka je proto velmi důležité zabránit

sekundární kontaminaci mléka po tepelném ošetření.

## Poděkování

Studie byla financována z prostředků Interní grantové agentury VFU Brno, projekt č. IGA 212/2015/FVHE.

## Seznam literatury

- FREDRIKSSON-AHOMAA M., STOLLE A., KORKEALA H. (2006): Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 47, s. 315-329.
- BARI M.L., HOSSAIN M.A., ISSHIKI, K., UKUKU D. (2011): Behavior of *Yersinia enterocolitica* in foods. *Journal of Pathogens*, 2011, s. 1-13.
- CABANOVÁ L., ČUVALOVÁ Z. (2014): Monitoring *Yersinia enterocolitica* v rizikových potravinách - máme sa čoho obávat? *Maso*, 25, s. 46-48.
- ČSN EN ISO 6887-1 (1999): *Mikrobiologie potravin a krmiv - Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění - Část 1: Všeobecné pokyny pro přípravu výchozí suspenze a desetinasobných ředění.*
- DIVYA K., VARADARAJ M.C. (2013): Behavioral pattern of native food isolates of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia intermedia* under simulated time-temperature combinations of the food chain. *Food and Nutrition Sciences*, 4, s. 365-375.
- EFSA (2007): Scientific Opinion of the Panel on BIOHAZ on a request from EFSA on monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. *The EFSA Journal*, 595, s. 1-30.
- EFSA, ECDC (2015): The European Union summary report on trends and sources on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015, 13(1):3991, s. 1 - 165.
- FÀBREGA A., VILA J. (2012): *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 30, s. 24-32.
- FERNANDES R. (2009): *Microbiology handbook. Vol. 3: Meat products.* Leatherhead, Leatherhead Publishing, 297 s. ISBN 978-1-905224-66-1.
- GUPTA V., GULATI P., BHAGAT N., DHAR M.S., VIRDI J.S. (2015): Detection of *Yersinia enterocolitica* in food: an overview. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34, s. 641-650.
- LONGENBERGER A.H., GRONOSTAJ M.P., YEE G.Y., JOHNSON L.M., LANDO J.F., VOORHEES R.E., WALLER K., WELTMAN A.C., MOLL M., LYSS S.B., CANDWELL B.L., GLADNEY L.M., OSTROFF S.M. (2014): *Yersinia enterocolitica* infections associated with improperly pasteurized milk products: southwest Pennsylvania, March-August, 2011. *Epidemiology and Infection*, 142, s. 1640-1650.
- RAHIMI E., SEPEHRI S., DEHKORDI F.S., SHAYGAN S., MONTAZ H. (2014): Prevalence of *Yersinia* species in traditional and commercial dairy products in Isfahan province, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7, s. e9249.
- YEHUALAESHT T., GRAHAM M., MONTGOMERY M., HABTEMARIAM T., SAMUEL T., ABDELA W. (2013): Effects of temperature on the viability, growth and gene profile of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* inoculated in milk. *Food Control*, 34, s. 589-595.

Přijato do tisku: 8. 9. 2015

Lektorováno: 23. 9. 2015