

Tab. 2 Porovnání obsahu kys.mléčné a pH v sýrech první den po výrobě z jednotlivých sérií

vzorek	kys.mléčná mg/100g	pH
7-1/1	1340	5,07
7-2/1	1291	5,06
7-3/1	1343	5,05
7-4/1	1328	5,12
8-1/1	1129	5,14
8-2/1	1182	5,12
8-3/1	1174	5,12
8-4/1	1246	5,11
9-1/1	1068	5,14
9-2/1	1123	5,09
9-3/1	1097	5,13
9-4/1	1204	5,11
10-1/1	1141	5,12
10-2/1	1089	5,14
10-3/1	1143	5,15
10-4/1	1113	5,15
11-1/1	1047	5,18
11-2/1	1093	5,05
11-3/1	1139	5,10
11-4/1	1028	5,15

označení vzorku: č. série-č. výroby/stáří

výroby. Obdobného výsledku bylo dosaženo při aplikaci nízké dávky (0,02 g/l) nisinového přípravku Nisaplin do mléka před výrobou sýrů. Použití nisin produkčních kmenů k potlačení klostridií u nízkodohřivaných sýrů je tedy možné za předpokladu výběru vhodné smetanové kultury.

Poděkování

Tato práce vznikla za podpory MZe ČR, NAZV, projektu QJ1210302 v programu KUS a institucionální podpory dle rozhodnutí RO1417.

Literatura:

- DALL BELLO B., ZEPPA G., BIANCHI D. M., DECASTELLI L., TRAVERSA A., GALLINA S., COISSON J. D., LOCATELLI M., TRAVAGLIA F., COCOLIN L. (2013): Effect of nisin-producing *Lactococcus lactis* starter cultures on the inhibition of two pathogens in ripened cheeses. *International Journal of Dairy Technology* 66(4), s. 468-477.
- DAVIDSON M. P., SOFOS J. N., BRANEN A. L. (2005): *Antimicrobials in Foods*, CRC Press, USA, ISBN 0-8247-4037-8.
- DUŠKOVÁ M., ŠPANOVÁ A., DRÁB V., RITTICH B. (2009): Searching for genes of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* encoding the bacteriocin nisin using DNA/DNA hybridisation. *Czech journal of Food Science*, 72, Special Issue, s. 336-368.
- FDA (2006): Agency Response Letter GRAS Notice No. GRN 000065: August 2005. Washington, D.C.: Department of Health and Human Services. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~rdb/opa-g065.html>.
- FUQUAY J. W., FOX P. F., McSWEENEY P. L. H. (2011): *Encyclopedia of Dairy Science*, 2nd Edition, Academia Press, NL, Amsterdam, ISBN 0-1237-4407-5.
- GÁLVEZ A., ABRIQUEL H., LÓPEZ R. L., BEN OMAR N. (2007): Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 120, s. 51-70.
- HAVLÍKOVÁ Š., KVASNIČKOVÁ E., NĚMEČKOVÁ I. (2016): The testing of protective strains against late blowing in cheeses. Poster č. 67 + sborník abstrakt. IDF Parallel Symposia, 11. - 13. 4. 2016, Dublin, Irsko.
- CHRAMOSTOVÁ J., HAVLÍKOVÁ Š., PURKRTOVÁ S., NĚMEČKOVÁ I., ROUBAL P. (2014): Potenciál mikroorganismů při kažení mléka a mlékařských produktů. *Mlékařské listy*, 147, s. 17-20.

KLEIN C., ENTIAN K. D. (1994): Genes involved in self-protection against the lantibiotic subtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Applied and Environmental Microbiology* 60, s. 2793-2801.

KUNOVÁ G., SEDLAŘÍK V., KLIMEŠOVÁ M., RAŠKOVÁ Z., HYRŠLOVÁ I., ŠALAKOVÁ A., DRÁB V. (2014): Využití syrovátky jako růstového média pro nisin produkční kmeny laktokoků. *Mlékařské listy*, 146, s. 1-4.

McAULIFFE O., ROSS R. P., HILL C. (2001): Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiology Reviews*. 25, s 285-308.

SARIS P. E. J., IMMONEN T., REIS M., SAHL H-G. (1996): Immunity to lantibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69, s. 151-159.

Korespondující autor:

Ing. Šárka Havlíková,

Sýrařské oddělení, Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.,
Soběslavská 841, 390 02 Tábor, ČR,
s.havlikova@vum-tabor.cz

Přijato do tisku: 13. 3. 2017

Lektorováno: 31. 3. 2017

VLIV SANITAČNÍCH ROZTOKŮ NA KVASINKY KONTAMINUJÍCÍ MLÉKÁRENSKÉ PROVOZY A NA JEJICH BIOFILMY

Irena Němečková¹, Zdeňka Hlaváčková¹,
Tereza Šebková¹, Jana Smolová¹, Vladislav Strmiska¹,
Šárka Horáčková²

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

² Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Influence of sanitation solutions on yeasts contaminating dairy plants and on their biofilms

Abstrakt

Kvasinky patří mezi významné původce kažení mlékárenských výrobků. A přestože např. v medicíně byla již jejich schopnost tvořit biofilmy, jakožto zdroje kontaminace, prostudována, v mlékárenství tyto poznatky dosud chybějí. Jak ukázala detekce biofilmů na mikrotitračních destičkách pomocí krystalové violeti, intenzita tvorby biofilmu kvasinkami je kmenově specifická. Schopnost tvořit biofilm zůstává zachována i u kvasinek přeživších sanitaci, přičemž snížení denzity kvasinek procesem sanitace může přispět ke zpomalení tvorby biofilmu. Jestliže jsou sanitační roztoky přítomny pouze ve velmi nízké koncentraci, mohou tvorbu biofilmu kvasinek jak stimulovat, tak inhibovat. Na tomto efektu mohla spolupůsobit řada faktorů. Rozdíly mezi sanitačními roztoky byly zjištěny i z dalších úhlů pohledu. Nejsilnější antimikrobiální účinek měly roztoky na bázi alkylypolyglykosidů, nejslabší roztoky na bázi kyselin. Při odstraňování biofilmů kvasinek byly nejúčinnější roztoky na bázi hydroxidů či chlornanů, nejméně účinné roztoky na bázi kyselin. Tato studie může

být odrazovým můstkem pro optimalizaci sanitačních postupů k eliminaci nežádoucích kvasinek.

Klíčová slova: biofilmy kvasinek, detekce biofilmu na mikrotitračních destičkách, antimikrobiální účinek, rezistence vůči sanitačním roztokům

Abstract

Yeasts are important spoilage causes in dairy products. Although e.g. in medicine, their ability to form biofilms, as contamination sources, was studied well, dairy industry is missing such knowledge. As shown by biofilm staining using crystal violet in microtiter plates, the intensity of yeast biofilm formation is strain-specific. The ability to form biofilms persists even in yeasts surviving sanitation while the lowering of yeast density by sanitation can contribute to the deceleration of biofilm formation. When present in a very small concentration, sanitation solutions can both stimulate and inhibit yeast biofilm formation. This effect could be co-caused by various factors. Sanitation solutions differed even from other points of view. Solutions based on alkylpolyglycosides had the strongest antimicrobial effect while the solutions based on acids were the weakest. To eliminate yeast biofilms, the most effective solutions were based on hydroxides or hypochlorite, the least effective ones were based on acids. This study can be a basis for the optimization of sanitation process to eliminate undesirable yeasts.

Key words: yeast biofilms, detection of biofilm on microtiter plates, antimicrobial effect, resistance to sanitation solutions

Úvod

Kvasinky patří mezi významné původce kažení mlékařenských výrobků v ČR. Rizikové jsou zejména různé typy sýrů a fermentovaných mléčných výrobků. V nich mohou kvasinky způsobovat kvasničný zápach, bombážování, napěnění výrobků, vznik drobných ok či mohou kvasinky tvořit bílé nebo barevné kolonie na povrchu výrobků. Nejčastěji byly z těchto výrobků izolovány *Debaryomyces hansenii* a různé druhy rodu *Candida* (*C. lusitanae*, *C. kefyr*, *C. lipolytica*, *C. parapsilosis*, *C. lambicana*, *C. guilliermondii*), a dále *Yarrowia lipolytica* (Němečková a kol., 2012). Zahraniční prameny seznam v mlékařství rizikových kvasinek dále rozšiřují např. o *Meyerozyma guilliermondii*, *Trichosporon asahii* (Garnier a kol., 2017), *Trichosporon cutaneum* (Corbo a kol., 2001), *Torulaspora delbrueckii*, *Rhodotorula* spp. či *Pichia* spp. (Westall a Filtenborg, 1998).

Jedním z možných zdrojů kontaminace mlékařenských výrobků kvasinkami jsou biofilmy, přestože jsou v mlékařenském výzkumu i praxi častěji řešeny biofilmy bakterií, zejména z čeledi *Enterobacteriaceae* a z rodů *Bacillus*, *Staphylococcus* či *Listeria* (Kunová, 2010). I když je o biofilmech kvasinek v mlékařství dosud známo velice málo, kvasinky schopnost tvořit biofilmy mají. To

dokládají poznatky z jiných oborů, zejména medicíny (de Freitas a kol., 2014, Suzuki a kol., 2017, Kvasničková, 2014).

Cílem této studie bylo otestovat schopnost různých kmenů kvasinek izolovaných z mlékařenských vzorků tvořit biofilmy a odolávat působení sanitačních roztoků. Získané výsledky mají nasměrovat další výzkum v této oblasti.

Materiál a metody

Mikroorganismy

Kmeny kvasinek použitých pro tuto práci jsou uvedeny v tab. 1. Jedná se o kmeny z pracovní sbírky izolátů Výzkumného ústavu mlékařenského s.r.o. Pokud není uvedeno jinak, výchozí kultura kvasinek vznikla pomnožením v BHI bujónu při 25 °C/48 h. Už za tuto relativně krátkou dobu došlo k pouhým okem viditelnému nárůstu kvasinek.

Tab. 1 Přehled testovaných kmenů kvasinek

Kmen	Druh	Původ
39Z	<i>Debaryomyces hansenii</i>	farmářský sýr
ZM1	<i>Candida parapsilosis</i>	zahuštěné mléko
8V	<i>Debaryomyces hansenii</i>	sanitační lázeň
4S	<i>Kazachstania servazii</i>	čerstvý sýr
9S	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	čerstvý sýr
10S	<i>Yarrowia lipolytica</i>	čerstvý sýr
21Z	<i>Debaryomyces hansenii</i>	farmářský sýr
7V	<i>Debaryomyces hansenii</i>	sanitační lázeň
KM1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	fermentované mléko
E13	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	čerstvé mléko
N4	<i>Pichia guilliermondii</i>	solný nálev
N6	<i>Debaryomyces hansenii</i>	solný nálev
11Z	<i>Debaryomyces hansenii</i>	farmářský sýr
12S	<i>Yarrowia lipolytica</i>	čerstvý sýr
5A	<i>Debaryomyces hansenii</i>	bílý sýr
N5	<i>Debaryomyces hansenii</i>	solný nálev
1Z	<i>Debaryomyces hansenii</i>	dohříváný sýr
11S	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	čerstvý sýr
9V	<i>Debaryomyces hansenii</i>	sanitační lázeň

Sanitační roztoky

Přehled použitých sanitačních roztoků je uveden v tab. 2. Jedná se o komerčně dostupné a průmyslově využívané koncentráty, které byly před použitím naředěny vodou. "Standardní koncentrace" odpovídá přibližně středu koncentračního rozmezí doporučeného výrobcem, "nízká koncentrace" přibližně poloviční koncentraci, než je nejnižší doporučená koncentrace a "vysoká koncentrace" přibližně dvojnásobné koncentraci, než je nejvyšší doporučená koncentrace.

Difuzní agarová metoda

Jedna očkovací klička (objem 1 µl) testované kvasinky na GKCH agaru byla suspendována v 9 ml fyziologického roztoku (0. ředění suspenze), z kterého bylo 1. a 2. desítkové ředění očkováno přelivem do soft GK pudy (obdobu GKCH pudy, ale bez chloramfenikolu a s poloviční dávkou agaru). Po utužení agaru byly vytvořeny komůrky

Tab. 2 Přehled použitých sanitačních roztoků a jejich koncentrací

Označení	Typ	Koncentrace		
		standard	nízká	vysoká
1CH	peroxydy	2 %	0,05 %	5 %
19M+18M	peroxydy, alkálie, aminoxydy	3,5 % + 1 %	1 % + 0,1 %	5 % + 3 %
6CH	kys. fosforečná	1 %	0,2 %	3 %
120	kyselina fosforečná a dusičná	1 %	0,2 %	2 %
4CH, L, O	kyselina dusičná	1 %	0,3 %	3 %
160	kyselina amidosírová	1 %	0,3 %	2 %
130	NaOH, KOH	2 %	0,5 %	6 %
20M+17M	chlornan, hydroxydy, alkylpolyglykosidy	1 % + 3,5 %	0,5 % + 1 %	2 % + 5 %
150	polyfosfáty	1 %	0,5 %	3 %
21M+17M	diamin, alkylpolyglykosidy	1 % + 3,5 %	0,5 % + 1 %	2 % + 6 %

o průměru 7 mm, do kterých bylo dávkováno po 100 µl testovaného sanitačního roztoku. Následovala inkubace ploten při 25 °C/3 dny a měření průměru inhibičních zón.

Detekce biofilmu - základní postup

Biofilm vytvořený na mikrotitračních destičkách byl detekován vizuálně po barvení krystalovou violetí. S drobnými modifikacemi je tato metoda používána různými autory (Djordjevic a kol., 2002, Lim a kol., 2017). Není-li uvedeno jinak, výchozí kultura kvasinek nakultivovaných za výše uvedených podmínek byla naředěna v poměru 3:100 sterilním BHI bujónem. Z toho byly objemem 100 µl naočkovány 4 jamky na mikrotitrační destičce, která byla předem propláchnutá 70% etanolem a usušená na vzduchu. Destičky byly kultivovány při 25 °C po dobu daného experimentu. Poté byly destičky pětkrát promyty destilovanou vodou a nadávkováno bylo 150 µl 0,1% vodného roztoku krystalové violeti. Barvení probíhalo 45 minut, poté byly destičky znovu pětkrát promyty destilovanou vodou. Následovala vizuální detekce obarveného biofilmu - v každé jamce pomocí čtyřbodové stupnice (- žádný biofilm, + slabá tvorba biofilmu, ++ střední tvorba biofilmu, +++ silná tvorba biofilmu), přičemž výsledek byl vyjádřen jako součet získaných "+" ve všech čtyřech jamkách.

Tvorba biofilmu kvasinkami přeživšími sanitaci

Stanovena byla denzita kvasinek ve výchozí kultuře kultivační metodou na GKCH agaru po kultivaci při 25 °C/3-5 dnů. Poté byla výchozí kultura naočkována 1 % (v/v) do sanitačních roztoků o standardní koncentraci, kde byla inkubována při 25 °C/20 min. Stanovena byla denzita přeživších kvasinek a otestována byla jejich schopnost tvořit biofilm. Biofilm byl detekován dle výše uvedeného postupu po kultivaci při 25 °C/5 dnů v BHI bujónu.

Tvorba biofilmu v přítomnosti zbytků sanitačních roztoků

Práce probíhaly podle výše uvedeného postupu pro detekci biofilmu, přičemž do jamek mikrotitrační destičky bylo dávkováno 100 µl kultury naředěné v BHI bujónu

a 10 µl testovaného sanitačního roztoku o vysoké koncentraci. Dosaženo tak bylo koncentrace přibližně poloviční, než je nízká koncentrace dle tab. 2. Kultivace probíhala při 25 °C/3 dny.

Eliminace biofilmů působením sanitačních roztoků

Dle výše uvedeného postupu byl připraven biofilm po kultivaci v BHI bujónu v mikrotitračních destičkách při 25 °C/3 dny. Poté byl bujón z jamek vylit, následovalo 5 x promytí destilovanou vodou a dávkování po 150 µl testovaných sanitačních roztoků o standardní koncentraci, které byly vytemperovány na teplotu sanitace. Destičky byly vloženy do termostatu, kde sanitační roztoky působily po určenou dobu. Podmínky sanitace byly pro roztoky 1CH, 19M+18M, 20M+17M a 21M+17M 20 °C/20 min., pro ostatní roztoky 60 °C/10 min. Následně byly sanitační roztoky vylity a destičky byly 5 x promyty destilovanou vodou. Následovalo barvení a detekce biofilmu dle výše uvedeného postupu.

Výsledky a diskuze

Schopnost kvasinek tvořit biofilmy

V tab. 3 jsou porovnány jednotlivé kvasinky z hlediska intenzity tvorby biofilmu bez přítomnosti stresových faktorů. Vyplývá z ní, že intenzita tvorby biofilmu nezávisí na druhu, ale na konkrétním kmeni kvasinek. Nejlépe je to patrné na nejhojněji zastoupeném druhu *D. hansenii*. Pro další práci byl vybrán zúžený soubor kvasinek zahrnující spíše více biofilmující kmeny a zároveň různé druhy kvasinek a jejich rozmanitý původ.

Z tab. 3 je rovněž patrné, že některé kmeny kvasinek rostly a biofilmovaly velmi rychle - už během 24 h. Takto krátká doba kultivace byla zařazena proto, aby simulovala

Tab. 3 Schopnost různých kmenů kvasinek tvořit biofilm při kultivaci v BHI bujónu při 25 °C (stupnice 0-12)

Kvasinka	Identifikace	Tvorba biofilmu po kultivaci 24 h	Tvorba biofilmu po kultivaci 5 dní
N4	<i>P. guilliermondii</i>	0	0
N6	<i>D. hansenii</i>	6	8
11z	<i>D. hansenii</i>	0	4
39z	<i>D. hansenii</i>	1	8
4S	<i>K. servazii</i>	9	12
10S	<i>Y. lipolytica</i>	0	12
12S	<i>Y. lipolytica</i>	0	9
V8	<i>D. hansenii</i>	0	4
5A	<i>D. hansenii</i>	8	12
KM1	<i>T. delbrueckii</i>	0	4
N5	<i>D. hansenii</i>	0	7
1z	<i>D. hansenii</i>	0	0
21z	<i>D. hansenii</i>	0	12
ZM1	<i>C. parapsilosis</i>	12	12
9S	<i>R. mucilaginosa</i>	12	12
11S	<i>R. mucilaginosa</i>	12	12
7V	<i>D. hansenii</i>	0	8
9V	<i>D. hansenii</i>	0	2
E13	<i>R. mucilaginosa</i>	0	12

Tab. 4 Inhibice kvasinek sanitačními roztoky o standardní koncentraci - průměr inhibičních zón (mm) měřený včetně komůrky o průměru 7 mm

Roztok	ZM1	E13	V8	4S	39Z	10S	KM1	7V	N6	21Z
1CH	-	-	-	-	-	-	25	12	12	12
19M + 18M	-	40	18	20	28	15	27	17	17	21
6CH	-	-	-	-	18	-	15	-	-	-
120	-	30	-	-	-	-	16	-	-	-
4 CH, L, O	-	-	-	-	-	9	19	-	-	-
160	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-
130	-	-	-	20	-	-	13	-	-	-
20M + 17M	-	-	32	35	-	14	15	9	23	12
150	-	-	-	-	-	8	8	-	-	8
21M + 17M	35	40	40	34	32	20	17	27	27	25

Tab. 5 Inhibice kvasinek sanitačními roztoky o snížené koncentraci - průměr inhibičních zón (mm) měřený včetně komůrky o průměru 7 mm

Roztok	ZM1	E13	V8	4S	39Z	10S	KM1	7V	N6	21Z
1CH	-	-	-	-	-	-	9	-	-	-
19M + 18M	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-
6CH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-
4 CH, L, O	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-
160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
130	-	-	-	-	-	-	8	-	-	-
20M + 17M	-	-	-	-	-	8	11	-	-	8
150	-	-	-	-	-	8	-	-	-	-
21M + 17M	30	40	35	30	30	19	14	27	27	22

Tab. 6 Inhibice kvasinek sanitačními roztoky o zvýšené koncentraci - průměr inhibičních zón (mm) měřený včetně komůrky o průměru 7 mm

Roztok	ZM1	E13	V8	4S	39Z	10S	KM1	7V	N6	21Z
1CH	-	40	20	-	22	10	32	18	18	20
19M + 18M	-	40	34	32	38	23	31	25	25	31
6CH	-	15	-	-	30	-	19	-	-	8
120	-	30	30	-	-	-	22	-	-	-
4 CH, L, O	-	-	-	-	-	11	37	14	14	10
160	-	-	-	-	-	-	12	-	-	-
130	-	30	30	35	-	12	19	21	11	13
20M + 17M	11	18	40	42	32	15	18	13	23	13
150	-	-	10	30	-	9	9	8	8	9
21M + 17M	40	40	40	40	35	26	19	34	34	29

relativně rychle se měnící podmínky v některých fázích technologie mlékárenských výrob.

Citlivost kvasinek k sanitačním roztokům

Citlivost kvasinek vůči antimikrobiálnímu působení sanitačních roztoků byla testována pomocí difuzní agarové metody. V tab. 4 jsou uvedeny výsledky pro roztoky o standardní koncentraci. Nejúčinnější byly roztoky obsahující alkylnopolglykosidy (21M + 17M, 20M + 17M), popř. peroxidy (19M + 18M, 1CH). Citlivost planktonických buněk kvasinek vůči dezinfekčním roztokům na bázi peroxidů či tenzidů uvádějí také Salo a Wirtanen (2005). Nejcitlivější kvasinkou byla *T. delbrueckii* KM1, naopak nejvíce rezistentní *C. parapsilosis* ZM1.

Při použití koncentrací sanitačních roztoků nižších než doporučuje výrobce (tab. 5) zůstala zachována účinnost pouze u roztoku 21M+17M, a tak se kombinace alkylnopolglykosidů s diaminy pro inhibici kvasinek jeví jako účinnější než kombinace alkylnopolglykosidů s chlornanem a hydroxidy. Jedinou kvasinkou, která byla významně inhibována více typy sanitačních roztoků, byla *T. delbrueckii* KM1.

Při použití koncentrací sanitačních roztoků vyšších než doporučuje výrobce (tab. 6) se dle očekávání zvětšil počet účinných kombinací kvasinka/roztok a zvětšily se inhibiční zóny. Kvasinka *C. parapsilosis* ZM1 zůstala rezistentní vůči většině sanitačních roztoků. Nejméně účinný byl roztok obsahující kyselinu amidosírovou (160), popř. kyselinu fosforečnou samotnou (6CH) nebo v kombinaci s kyselinou dusičnou (120). Roztok s kyselinou dusičnou (4 CH, L, O) byl též méně účinný v porovnání s roztoky fungujícími na jiném principu než je působení kyselin. Jedná se o kyselé čisticí roztoky, u kterých se nepředpokládá významný dezinfekční účinek.

Tvorba biofilmů kvasinkami přeživšími sanitací

Testováno bylo, jak je ovlivněna schopnost tvorby biofilmů kvasinkami, které přežily sanitací. K tomu byly využity sanitační roztoky o standardní koncentraci, které na kvasinky působily 20 minut při 25 °C. Vliv záhřevu na kvasinky působením roztoků, které se běžně používají při vyšší teplotě, zde testován nebyl.

Výsledky mikrobiologických rozborů jsou shrnuty v tab. 7. Podobně jako při

Tab. 7 Přežívání kvasinek za podmínek sanitace při 25 °C/20 min pomocí sanitačních roztoků standardní koncentrace (KTJ/ml)

Roztok	ZM1	E13	V8	4S	39Z
počáteční stav (výpočet z hustoty ve výchozí kultuře)	$5,0 \times 10^5$	$6,8 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$
1CH	$8,2 \times 10^3$	neg./1 ml	neg./1 ml	neg./1 ml	neg./1 ml
19M + 18M	$2,5 \times 10^4$	neg./1 ml	neg./1 ml	$3,0 \times 10^3$	neg./1 ml
6CH	$1,6 \times 10^4$	neg./1 ml	neg./1 ml	$3,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$
120	$2,1 \times 10^4$	neg./1 ml	neg./1 ml	neg./1 ml	neg./1 ml
4 CH, L, O	$1,0 \times 10^5$	neg./1 ml	$1,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$
160	$2,8 \times 10^4$	neg./1 ml	neg./1 ml	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
130	neg./1 ml	$3,0 \times 10^3$	neg./1 ml	neg./1 ml	neg./1 ml
20M + 17M	neg./1 ml	neg./1 ml	neg./1 ml	neg./1 ml	neg./1 ml
150	neg./1 ml	$7,0 \times 10^2$	neg./1 ml	neg./1 ml	neg./1 ml
21M + 17M	neg./1 ml	neg./1 ml	neg./1 ml	neg./1 ml	neg./1 ml

Tab. 8 Tvorba biofilmů během kultivace při 25 °C/5 dnů v BHI bujónu kvasinkami, které přežily sanitaci při 25 °C/20 min pomocí sanitačních roztoků standardní koncentrace (stupnice 0-12)

Roztok	ZM1	E13	V8	4S	39Z
1CH	1	0	0	0	0
19M + 18M	1	0	0	1	0
6CH	4	0	0	5	0
120	2	0	0	0	0
4 CH, L, O	9	0	2	1	1
160	8	0	0	1	8
130	0	1	0	0	0
20M + 17M	0	0	0	0	0
150	0	0	0	0	0
21M + 17M	0	0	0	0	0

použití difuzní agarové metody (tab. 4) i klasický mikrobiologický rozbor indikuje, že nejvíce rezistentním kmenem byla *C. parapsilosis* ZM1 a nejméně účinnými roztoky 4, CH, L, O a 160. Dílčí rozdíly mezi oběma sadami výsledků mohly být způsobeny interakcí aktivních látek sanitačních prostředků se složkami živné půdy během difuzní agarové metody.

V tab. 8 jsou shrnuty výsledky testování tvorby biofilmů po kultivaci při 25 °C/5 dnů kvasinkami přeživšími sanitací. Za těchto podmínek biofilm vznikal v nižší intenzitě než v případě kvasinek, které sanitačním roztokům vystaveny nebyly (tab. 3). K tomuto efektu však mohla přispět také nižší denzita kvasinek přeživších sanitaci na počátku pěti-denního období tvorby biofilmu.

Důležité je zjištění, že si kvasinky přeživší sanitaci uchovávají schopnost tvořit biofilm. Nicméně o vzniku biofilmu kvasinek v reálných podmínkách rozhoduje také frekvence prováděné sanitace a denzita přítomných kvasinek. Relativně rychlejší růst některých bakterií (např. čeleď *Enterobacteriaceae* a další v Úvodu zmíněné) může být vysvětlením, proč jsou na mlékárenských provozech častěji zachytávány biofilmy bakterií než biofilmy kvasinek. Ještě však zde je možnost společných biofilmů bakterií a kvasinek.

Tvorba biofilmů v přítomnosti zbytků sanitačních roztoků

V tomto experimentu byla sledována tvorba biofilmů v médiu bohatém na živiny (BHI bujón) v přítomnosti sanitačních roztoků ve velmi nízké koncentraci, které modelovalo zbytky nedostatečně vypláchnutého sanitačního roztoku. Výsledky jsou shrnuty v tab. 9.

Dle hodnocení kontrolních vzorků lze říci, že roztoky stimulující tvorbu biofilmů samy o sobě s mikrotitrační destičkou za vzniku falešně pozitivních výsledků nein-

teragovaly. Pouze u roztoku 21M+17M (na bázi N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diaminu a kys. octové) lze předpokládat kombinovanou interakci s bujónem a mikrotitrační destičkou.

Nejvíce tvorbu biofilmů stimulovaly roztoky 150 (kombinace hydroxidů, křemičitanů, tripolyfosfátů a chlornanu) a 160 (kys. amidosírová a neionogenní tenzidy).

Mezi roztoky inhibujícími tvorbu biofilmů byly jak čisticí roztoky 130 (hydroxidy) a 6CH (kys. fosforečná), tak dezinfekční roztoky 19M+18M (peroxid vodíku, kys. nitriltriocetová, alkylamin oxidy a další látky) či 20M+17M (chlornan, alkylpolyglykosidy, hydroxidy). Inhibici tvorby biofilmů tedy nelze přisuzovat pouze antimikrobiálnímu účinku sanitačních roztoků, ale komplexním interakcím v testovaném systému.

Eliminace biofilmů působením sanitačních roztoků

Výsledky testování účinnosti sanitačních roztoků při odstraňování biofilmů jsou shrnuty v tab. 10. Nejúčinnější byly roztoky 20M+17M, 21M+17M, 130 a 150, které odstranily biofilm 9 kmenů z 10 testovaných. Jedná se o alkalické roztoky na bázi hydroxidů nebo hydroxidů v kombinaci s chlornany. Salo a Wirtanen (2005) ve své práci rovněž potvrdili účinnost pěny na bázi aktivního chloru vůči biofilmu kvasinek, avšak přípravek obsahující aktivní chlor v kombinaci s persíranem dostatečně účinný nebyl. V našem testovaném souboru byly nejméně účinné roztoky 160, 120 a 4 CH, L, O, které odstranily biofilm pouze 2-5 kmenů. Jsou to roztoky na bázi kyselin (kys. dusičná, amidosírová, citronová).

Tab. 9 Tvorba biofilmů kvasinek v BHI bujónu obsahujícím zbytky sanitačních roztoků (stupnice 0-12)

	39Z	V7	N6	V8	10S	ZM1	E13	21Z	4S
1CH	0	4	8	4	12	8	0	0	0
19M+18M	0	0	0	0	8	0	0	0	0
20M+17M	0	0	0	0	0	8	0	0	0
21M+17M	12	12	12	12	12	12	12	12	12
6CH	0	0	0	0	0	0	0	0	0
120	12	10	4	8	12	12	0	8	0
4 CH, L, O	12	8	0	8	12	0	4	8	0
160	12	12	2	8	12	12	0	8	0
130	0	0	0	0	8	0	0	0	0
150	12	10	8	8	12	12	0	8	0

Tab. 10 Účinnost sanitačních roztoků při odstraňování biofilmů kvasinek (zbytkový biofilm, stupnice 0-12)

	39Z	V7	N6	V8	10S	ZM1	E13	21Z	4S	KM1
1CH	0	4	0	4	8	4	0	0	0	0
19M+18M	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
20M+17M	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
21M+17M	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
6CH	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
120	4	4	0	4	8	4	0	0	0	0
4 CH, L, O	4	4	0	0	4	4	0	0	0	2
160	4	4	1	0	8	4	4	0	1	1
130	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
150	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0

Nejsnáze byly odstraněny biofilmy kmenů *D. hansenii* N6 a 21Z, *R. mucilaginosa* E13 a *K. servazii*. Naopak nejodolnější biofilmy tvořila *Y. lipolytica* 10S.

Závěr

Pomocí metody barvení biofilmu krystalovou violetí na mikrotitračních destičkách bylo prokázáno, že izoláty kvasinek z mlékařských vzorků mohou mít v závislosti na konkrétním kmenu schopnost tvořit biofilmy. Jak planktonické buňky kvasinek, tak buňky biofilmu, jsou různým způsobem a různou měrou ovlivňovány používanými sanitačními roztoky. V závislosti na typu aktivní látky mohou mít některé roztoky silný antimikrobiální účinek, jiné mohou účinně odstraňovat již vytvořený biofilm a jiné mohou inhibovat jeho tvorbu, přičemž žádný z testovaných roztoků nepatřil k nejlepším ve všech těchto oblastech. Výzkum tvorby biofilmů a účinnosti sanitačních roztoků se ukázal jako zajímavé a komplexní téma a bude i nadále pokračovat.

Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou Ministerstva zemědělství ČR, Národní agentury pro zemědělský výzkum, a to s institucionální podporou dle rozhodnutí RO1417 a s účelovou podporou na řešení projektu QK1710156 v programu ZEMĚ.

Literatura

- CORBO M.R., LANCIOTTI R., ALBENZIO M., SINIGAGLIA M. (2001): Occurrence and characterization of yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region. *Int. J. Food Microbiol.* 69, s. 147 - 152.
- DE FREITAS A.R., BAEZA L.C., IECHER FARIA M.G., DALBEN DOTA K.F., MARTÍNEZ P.G., SVIDZINSKI T.I.E. (2014): Yeasts isolated from nosocomial urinary infections: Antifungal susceptibility and biofilm production. *Revista Iberoamericana de Microbiología*, 31/2, s. 104 - 108.
- DJORDJEVIC D., WIEDMANN M., MCLANDSBOROUGH L.A. (2002): Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, s. 2950 - 2958.
- GARNIE L., VALENCE F., PAWTOWSKI A., AUHUSTSINAVA-GALERNE L., FROTTÉ N., BARONCELLI R., DENIEL F., COTON E., MOUNIER J. (2017): Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 241, s. 191 - 197.
- KUNOVÁ G., ROUBAL P., JAGLIČ Z., PAZLAROVÁ J., PECHAČOVÁ M., PEROUTKOVÁ J.: Monitorování účinnosti sanitace a prevalence některých mikroorganismů v mlékařských provozech. Kroměřížské mlékařské dny 2010, Kroměříž, Kromilk, a.s., s. 61 - 65.
- KVASNIČKOVÁ E. (2014): Problematika infekcí kloubních implantátů. *Bioprospect*, 24/4, s. 87.
- LIM E.S., LEE J.E., KIM J.S., KOO O.K. (2017): Isolation of indigenous bacteria from a cafeteria kitchen and their biofilm formation and disinfectant susceptibility. *LWT - Food Sci. & Technol.*, 77, s. 376 - 382.
- NĚMEČKOVÁ I., HANUŠOVÁ J., HAVLÍKOVÁ Š., KVASNIČKOVÁ E., KEJMAROVÁ M., KUNOVÁ G., ROUBAL P., PURKRTOVÁ S., JEBAVÁ I., KALHOTKA L., ŠUSTOVÁ K. (2012): Mikrobiální původci vad mlékařských výrobků. Kroměřížské mlékařské dny 2012, Kroměříž, Kromilk, a.s., s. 79 - 84.
- SALO S., WIRTANEN G. (2005): Disinfectant efficacy on foodborne spoilage yeast strains. *Food and Bioprocess Technology*, 83 (C4), s. 288 - 296.
- SUZUKI L.C., KATO I.T., PRATES R.A., SABINO C.P., YOSHIMURA T.M., SILVA T.O., RIBERIO M.S. (2017): Glucose modulates antimicrobial photodynamic inactivation of *Candida albicans* in biofilms. *Photodiag. & Photodynam. Therapy*, 17, s. 173 - 179.

WESTALL S., FILTENBORG O. (1998): Spoilage yeasts of decorated soft cheese packed in modified atmosphere. *Food Microbiol.* 15/2, s. 243 - 249.

Korespondující autor:

Ing. Irena Němečková, Ph.D.,
Výzkumný ústav mlékařský s.r.o.,
Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6, Česká republika,
nemeckova@milcom-as.cz.

Přijato do tisku: 13. 3. 2017

Lektorováno: 27. 3. 2017

METODY IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE POTRAVINÁŘSKÝCH PRŮMYSLÝCH IZOLÁTŮ *PSEUDOMONAS* SPP.

Eva Šviráková¹, Sabina Purkrťová¹, Irena Němečková²,
Renáta Karpíšková³, Markéta Jelínková⁴, Jürgen
Felsberg⁴

¹ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

² Výzkumný ústav mlékařský, s. r. o.

³ Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

⁴ Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.

Methods for identification and characterization of food industrial isolates *Pseudomonas* spp.

Abstrakt

Tato práce se zabývala problematikou identifikace a charakterizace 10 neznámých potravinářských průmyslových izolátů *Pseudomonas* spp., včetně třech sbírkových kmenů *Pseudomonas* spp. Testované kmeny pseudomonád byly spolehlivě identifikovány na úroveň druhu za pomoci chemotaxonomické metody MALDI-TOF MS s krokem extrakce a molekulárně-biologické metody sekvenování genu pro 16S rRNA. Z kolekce 10 izolátů došlo při srovnání za pomoci obou použitých metod k identifikační shodě u 8 z nich. U testovaných pseudomonád byly po identifikaci zjišťovány následující charakteristiky: makroskopie a mikroskopie; růstová aktivita v Trypton-sójovém bujónu / agaru; tolerance k různým kultivačním teplotám (4 °C a 30 °C), k různým hodnotám pH kultivačního média (4,0; 5,0 a 7,0), k různým koncentracím NaCl v kultivačním médiu (0 a 8 %); resistance k vybraným antibiotikům (gentamicinu, 10 µg; ciprofloxacinu, 5 µg; colistinu, 10 µg; cefotaximu, 30 µg; meropenemu, 10 µg). Získané výsledky mohou být využity v potravinářském průmyslu, zejména mlékařském, při cíleném zajišťování zdravotní bezpečnosti a jakosti surovin a finálních výrobků s využitím moderních identifikačních metod, včetně fenotypových charakterizačních metod z oblasti klasické mikrobiologie.