

KULTIVAČNÍ METODA PRO STANOVENÍ GRAM-NEGATIVNÍCH AEROBNÍCH BAKTERIÍ V SYROVÉM MLÉČE

Irena Němečková, Jana Chramostová,
Marcela Klimešová, Ludmila Nejeschlebová,
Jana Smolová, Šárka Havlíková, Petr Roubal
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Cultivation method for the determination of Gram-negative aerobic bacteria in raw milk

Souhrn

Acinetobaktery patří mezi technologicky i zdravotně rizikové a frekventované kontaminanty syrového mléka, které jsou svými vlastnostmi podobné pseudomonádám. Proto byly porovnány vybrané kultivační metody pro jejich stanovení - Sellersův diferenační agar, Leeds *Acinetobacter* agar bez supplementu a s MDR supplementem pro acinetobaktery a GSP agar s penicilinem a pimarinem pro pseudomonády. Analyzováno bylo 26 vzorků syrového mléka a charakterizováno a identifikováno 71 z nich izolovaných kmenů. Žádná z testovaných metod neumožnila spolehlivě od sebe odlišit pseudomonády a acinetobaktery, a tak bylo zavedeno nové mikrobiologické kritérium - Gram-negativní aerobní bakterie. Tyto bakterie mohou být od Gram-negativních fakultativně anaerobních bakterií, Gram-positivních bakterií a kvasinek rostoucích za podmínek testovaných metod odlišeny konfirmací na fermentaci glukózy a tvorbu oxidázy, anebo na základě změny acidobazického indikátoru obsaženého v Leeds *Acinetobacter* agaru. Celkově se stanovení Gram-negativních aerobních bakterií, které tvoří řádově jednotky až desítky procent celkového počtu mikroorganismů syrového mléka, na Leeds *Acinetobacter* agaru bez supplementu jeví jako nejjednodušší a potenciálně užitečný nástroj v kontrole kvality.

Klíčová slova: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, plotnová metoda, kvalita syrového mléka

Summary

Acinetobacter sp. is one of technologically and health hazardous as well as frequent contaminant of raw milk with similar properties as *Pseudomonas* sp. Thus, selected cultivation methods for their determination were compared - Sellers' differentiation agar, Leeds *Acinetobacter* agar with MDR supplement or without the supplement for acinetobacters and GSP agar with penicillin and pimarin for pseudomonades. The total of 26 raw milk samples were analysed and 71 obtained isolates were characterized and

identified. None of tested methods enabled to distinguish pseudomonades and acinetobacters reliably. Thus, Gram-negative aerobic bacteria were introduced as a new microbiological criterion. These bacteria can be distinguished from Gram-negative facultatively anaerobic bacteria, Gram-positive bacteria and yeasts growing under the conditions of tested methods by a confirmation on glucose fermentation and oxidase production or by the change of acidobazic indicator contained in Leeds *Acinetobacter* agar. Overall, the determination of Gram-negative aerobic bacteria, which forms about ones to tens percent of total microbial count of raw milk, using Leeds *Acinetobacter* agar without the supplement seems to be the simplest and potentially useful tool in the quality control.

Keywords: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, plate method, raw milk quality

Úvod

Výskyt bakterií rodu *Pseudomonas* v syrovém mléce, jakožto jedněch z nejvýznamnějších producentů technologicky nežádoucích vysoce termostabilních proteolytických a lipolytických enzymů, patří mezi nejzávažnější problémy současného mlékárenství. Pro stanovení těchto bakterií existuje norma ČSN P ISO/TS 11059 (2009) a další kultivační metody fungující na obdobném principu a poskytující srovnatelné výsledky, např. kultivační metoda na GSP půdě s penicilinem a pimarinem. Zejména z pohledu mlékárenské výrobní praxe je nevýhodou těchto metod nutnost konfirmace vykultivovaných kolonií, a i přesto snadná záměna s jinými mikroorganismy. Porovnání kultivačních metod pro pseudomonády bylo publikováno v práci Němečkové a kol. (2012), ze které vyplynulo, že dalšími frekventovanými mikroorganismy syrového mléka, které mají podobné vlastnosti jako pseudomonády, jsou bakterie rodu *Acinetobacter*. Výskyt acinetobakterů (*A. baumannii*, *A. pittii*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. guillouiae*) v mlékárenských provozech i ve finálních mléčných výrobcích, včetně výrobků se senzoricou vadou, potvrdila rovněž práce Švirákové a kol. (2015).

Acinetobaktery jsou Gram-negativní psychrotrofní bakterie, oxidáza-negativní a kataláza-positivní. Jsou to krátké tyčinky až kokotyčinky, které nejsou náročné na výživu, snadno se kultivují a jako zdroj energie mohou využít některé sacharidy. Vyskytují se ve dvojicích či různé dlouhých řetězcích. Mimo jiné jsou schopné růst v širokém rozmezí teplot a tvořit hladké mukoidní kolonie na pevných nosičích. Klinické izoláty preferují spíše teplotu 37 °C, naproti tomu ale izoláty z půdy či potravin nejlépe rostou při teplotách 20 - 30 °C (Kampfner, 1999; Sedláček, 2007). Některé acinetobaktery vykazují významnou proteolytickou (Baruzzi a kol., 2012) a/nebo lipolytickou aktivitu (Chen a kol., 1998).

Acinetobacter spp. se často podílí na rozvoji tzv. nosokomiálních (nemocničních) infekcí, přičemž jen necelá čtvrtina izolátů nevykazuje rezistenci vůči antibiotikům (Lahiri a kol., 2004). Z tohoto pohledu nejvýznam-

nějším představitelem daného rodu je *A. baumannii*. Je schopen přežít delší dobu v nemocničním prostředí, a případně tam tvořit i biofilm. Může způsobovat infekce centrálního nervového systému, kůže, měkkých tkání a kostí. Některé kmeny tohoto druhu jsou rezistentní vůči všem známým antibiotikům (Peleg a kol., 2008). Pokud by tedy došlo ke kontaminaci mlékárenského provozu acinetobaktery a následně i k post-pasterační kontaminaci mléčných výrobků, mohlo by to znamenat nejen riziko kažení mléčných výrobků, ale i riziko zdravotní.

Značná rizikovitost i frekventovaný výskyt acinetobakterů v syrovém mléce byly podnětem pro tuto práci, jejíž cílem je porovnat vybrané kultivační metody stanovení bakterií rodů *Acinetobacter* a *Pseudomonas* a s využitím těchto poznatků definovat nové mikrobiologické kritérium kvality syrového mléka.

Materiál a metody

Analyzováno bylo 26 cisternových vzorků syrového kravského mléka těmito metodami:

- celkový počet mikroorganismů (CPM) - GTK agar (MILCOM a.s., Tábor, ČR), inokulace 1 ml přelivem, kultivace při 30 °C/72 h podle ČSN EN ISO 4833-1 (2014),
- pseudomonády - GSP agar s penicillinem a pimaricinem (MILCOM a.s., Tábor, ČR), inokulace 1 ml přelivem, kultivace při 25 °C/48 h,
- acinetobaktery
 - Sellers Differential HiVeg agar (HiMedia Laboratories, Mumbai, Indie), na povrch půdy rozetřít 0,2 ml 50% roztoku dextrosy, inokulace 0,2 ml roztěrem, kultivace při 30 °C/24 h,
 - Leeds *Acinetobacter* agar base (HiMedia Laboratories, Mumbai, Indie) bez přídavku supplementu, inokulace 0,2 ml roztěrem, kultivace při 30 °C/24-48 h,
 - Leeds *Acinetobacter* agar base s přídavkem supplementu MDR (Multi-Drug-Resistance) na finální koncentraci 10 mg/l sodné soli ampicillinu a 10 mg/l ceftazidimu (HiMedia Laboratories, Mumbai, Indie), inokulace 0,2 ml roztěrem, kultivace při 30 °C/24-48 h.

Podle specifikace výrobce tvoří na Leeds *Acinetobacter* agaru mikroorganismy využívající převážně přítomné sacharidy (fruktózu, sacharózu, mannitol) žluté kolonie, zatímco mikroorganismy využívající převážně dusíkaté látky tvoří růžové kolonie. Jak uvádějí Jawad a kol. (1994), pro acinetobaktery je typické uvolňování silně alkalických amonných iontů, které způsobují růžovou barvu kolonií na této půdě. Na Sellersově diferenciacním agaru tvoří mikroorganismy pozitivní na arginin-hydrolasu modré kolonie, mikroorganismy oxidující dextrosu barví okolní agar do žluta. Mikroorganismy s oběma těmito aktivitami tvoří zelené kolonie a okolní agar barví do žluta. Jako pozitivní kolonie proto byly hodnoceny růžové kolonie na Leeds *Acinetobacter* agaru a zelené kolonie na Sellersově diferenciacním agaru.

Z takto získaných ploten byly izolovány pozitivní i negativní kolonie a přeočkováním inokulační kličkou byl prověřen jejich růst a vzhled na testovaných půdách. Zařazeny byly rovněž dva konfirmační kroky vyplývající z ČSN P ISO/TS 11059 (2009) pro stanovení pseudomonád:

- test na oxidázu - stripy Bactident® Oxidase (Merck KGaA, Darmstadt, Německo),
- fermentace glukózy - bromkresolpurpur glukózový agar (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), inokulace vpichem, kultivace při 30 °C/24 h.

Následně byly izoláty zaslány na identifikaci metodou MALDI-TOF MS do akreditované laboratoře SVÚ Jihlava.

Výsledky a diskuze

Výsledky analýzy syrového mléka na testovaných půdách jsou shrnuty v tabulce 1. Z ní je patrné, že pseudomonády stanovené na GSP půdě s penicillinem a pimaricinem a acinetobaktery stanovené na Leeds *Acinetobacter* agaru bez supplementu tvoří řádově jednotky až desítky procent z CPM. Výsledky získané oběma těmito metodami byly srovnatelné u 35 % vzorků, mírně vyšší na GSP půdě se supplementy u 38 % vzorků a mírně vyšší na Leeds *Acinetobacter* agaru bez supplementů u 27 % vzorků.

Přídavek MDR supplementu k Leeds *Acinetobacter* agaru významně snížil počet zachycených mikroorganismů - u 73 % vzorků byly acinetobaktery na této půdě detekovány v denzitě o 3 a více řádů nižší než CPM. Důvodem může být buď citlivost některých kmenů cílových mikroorganismů vůči použitým antibiotikům, anebo falešně pozitivní výsledky na Leeds *Acinetobacter* agaru bez supplementu. Detailnější vzhled do tohoto problému poskytují výsledky uvedené dále.

Na Sellersově diferenciacním médiu byla denzita pozitivních kolonií nižší než CPM o méně než jeden až o více než tři řády, a tedy rozptyl výsledků byl vyšší než u výsledků získaných na GSP půdě s penicillinem a pimaricinem a na Leeds *Acinetobacter* agaru. Výsledky poskytnuté Sellersově diferenciacním médiem navíc nebyly srovnatelné s výsledky žádné jiné z použitých metod.

Za pozornost rovněž stojí riziko ovlivnění jednotlivých kolonií změnou indikátoru v okolí kolonií sousedních, a tím i riziko zkraslení výsledků ostatní mikroflórou rostoucí za podmínek metody. Z tohoto pohledu je nevhodnější GSP půda, na které rostly kolonie pouze v odstínech růžové.

Na Leeds *Acinetobacter* agaru lze rozlišit dva základní typy kolonií - pozitivní růžové resp. neměnicí barvu acidobazického indikátoru a negativní žluté, u kterých barevná změna vzniká díky fermentaci sacharidů obsažených v půdě za vzniku kyselin. V tabulce 1 je vidět, že je v syrovém mléce počet zachycených pozitivních kolonií a všech kolonií rostoucích za podmínek metody alespoň v rámci jednoho řádu většinou (92 % vzorků) srovnatelný. Při použití této metody na jiné typy vzorků by však mělo být ověřeno, že ostatní kolonie rostoucí za podmínek metody stanovení cílových mikroorganismů neznemožní.

Tab. 1 Porovnání výsledků analýzy syrového mléka různými metodami (n=26)

Označení vzorku	CPM (log KTJ/ml)	Pseudomonády na GSP s penicilinem a pimaricinem (log KTJ/ml)	Acinetobaktery (log KTJ/ml)					
			Sellersův diferenciační agar		Leeds Acinetobacter agar		Leeds Acinetobacter agar s MDR	
			Positivní MO	Suma MO	Positivní MO	Suma MO	Positivní MO	Suma MO
Průměr	5,8	4,8	3,9	4,9	4,6	4,9	2,1	2,2
Medián	5,8	5,0	4,2	4,9	4,6	4,8	2,4	2,6
SMODCH	0,7	1,2	1,0	0,7	0,7	0,6	1,1	1,1
Minimální hodnota	4,6	2,6	1,1	3,2	3,4	3,9	neg.	neg.
Maximální hodnota	7,5	7,1	5,4	6,7	5,8	5,9	3,5	3,5

Sellersův diferenciační agar poskytuje celkem čtyři základní typy kolonií (bezbarvé, žluté, modré, zelené). Proto je interpretace výsledků analýzy tak komplexní matrice, jako je syrové mléko, problematická a vhodná spíše jen pro výzkumné účely.

Z vykultivovaných ploten vybraných tak, aby rovnoměrně reprezentovaly všechny analyzované vzorky cisterového mléka, byly izolovány jak typické kolonie, tak kolonie, které by mohly být s cílovými mikroorganismy zaměněny. Získáno takto bylo celkem 71 izolátů. Jejich identifikace, růst na testovaných půdách a výsledky při konfirmaci na fermentaci glukózy a tvorbu oxidázy jsou uvedeny v tabulkách 2 až 5. Tabulky jsou rozděleny na Gram-negativní aerobní bakterie, Gram-negativní fakultativně anaerobní bakterie, gram-positivní bakterie a kvasinky, neboť všechny tyto skupiny mikroorganismů byly na testovaných půdách zachyceny.

Z tabulek je zřejmé, že GSP půda s penicilinem a pimaricinem a Sellersův diferenciační agar poskytují

spolehlivé výsledky pouze, pokud je provedena konfirmace. Spolehlivost stanovení se týká skupiny Gram-negativních aerobních bakterií jako celku - přestože jsou tyto půdy primárně určeny pro stanovení pseudomonád resp. acinetobakterů, toto rozlišení neumožňují.

Při konfirmaci se ukázalo důležité testovat především schopnost fermentovat glukózu. Oxidázová aktivita pseudomonád podle Sedláčka (2007) může být jak pozitivní, tak negativní, nicméně všechny kmeny pseudomonád testované v této práci byly oxidáza-positivní. Naproti tomu zde testované acinetobaktery nebyly z hlediska oxidázové aktivity vyhraněné, zatímco Sedláček (2007) uvádí acinetobaktery jako oxidáza-negativní. Příčina tohoto rozporu může být jak ve způsobu interpretace dubiozních výsledků, tak v omezené spolehlivosti identifikačních metod.

Z porovnání výsledků v tabulce 1 a v tabulkách 2 až 5 vyplývá, že přidavek MDR supplementu snižuje záchytnost Leeds *Acinetobacter* agaru na kvantitativní, avšak nikoliv

Tab. 2 Růst Gram-negativních aerobních bakterií na testovaných půdách

Identifikace dle MALDI TOF-MS	Počet kmenů se stejnými výsledky	GSP + penicilin, pimaricin	Sellersův diferenciační agar	Leeds Acinetobacter agar + MDR	Leeds Acinetobacter agar	Fermentace glukózy	Oxidáza
<i>Pseudomonas</i> sp.	7	Č	Z	R	R	-	+
<i>Pseudomonas putida</i>	3	Č	Z	R	R	-	+
<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	1	Č	Z	R	R	-	+
<i>Pseudomonas libanensis</i>	1	Č	Z	R	R	-	+
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	Č	Z	R	R	-	+
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	N	Z	R	R	-	+/-
<i>Acinetobacter</i> sp.	1	Č	Z	R	R	-	+/-
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceti</i>	1	Č	Z	R	R	-	-
<i>Acinetobacter baumannii/calcoaceti</i>	1	Č	Z	R	R	-	+
<i>Acinetobacter junii</i>	2	Č	Z	R	R	-	+/-
<i>Acinetobacter junii</i>	1	N	Z	N	R	-	-
<i>Acinetobacter junii</i>	2	Č	Z	R	R	-	-
<i>Acinetobacter pitii</i>	1	Č	Z	Ž	Ž	+	+/-
<i>Sphingobacterium spiritivorum</i>	1	Č	Ž	Ž	Ž	+	+
<i>Rhizobium</i> sp.	1	Č	B	R	R	-	+
<i>Rhizobium</i> sp.	3	Č	B	Ž	Ž	-	+
<i>Rhizobium</i> sp.	1	Č	Z	Ž	Ž	-	+
<i>Chryseobacterium</i> sp.	2	ŽP	ŽP	ŽP	ŽP	-	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	Č	Z	R	R	-	+/-

B - bílé kolonie, beze změny acidobazického indikátoru v živné půdě; Č - červené kolonie v barvě živné půdy; N - neroste; R - kolonie v různých odstínech růžové, beze změny acidobazického indikátoru v živné půdě; Z - zelené kolonie se žlutou zónou; Ž - žluté kolonie se žlutou zónou; ŽP - žluté pigmentované kolonie, bez změny acidobazického indikátoru v půdě

+ pozitivní reakce

+/- velmi slabě pozitivní reakce

- negativní reakce

Tab. 3 Růst Gram-negativních fakultativně anaerobních bakterií na testovaných půdách

Identifikace dle MALDI TOF-MS	Počet kmenů se stejnými výsledky	GSP + penicillin, pimaricin	Sellersův diferenciační agar	Leeds Acinetobacter agar + MDR	Leeds Acinetobacter agar	Fermentace glukózy	Oxidáza
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	Č	Z	N	Ž	++	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	Č	Z	Ž	Ž	+++	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	Č	Z	Ž	Ž	+++	+/-
<i>Escherichia coli</i>	1	Č	Z	Ž	Ž	+++	-
<i>Enterobacter</i> sp.	1	Č	Z	Ž	Ž	+++	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	Č	Z	Ž	Ž	+++	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ssp. <i>cloacae</i>	1	Č	Z	Ž	Ž	+++	+
<i>Enterobacter asburiae</i>	1	Č	Z	Ž	Ž	++	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	3	Č	Z	Ž	Ž	+++	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	2	Č	Ž	Ž	Ž	+	-
<i>Serratia plymuthica</i>	1	Č	Z	Ž	Ž	+++	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	N	Z	Ž	Ž	+	-
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	Ž	Z	Ž	Ž	++	-

Č - červené kolonie v barvě živné půdy; N - neroste; Z - zelené kolonie se žlutou zónou; Ž - žluté kolonie se žlutou zónou
 + pozitivní reakce (+ slabě pozitivní, ++ střední, +++ silně pozitivní reakce)
 +/- velmi slabě pozitivní reakce
 - negativní reakce

Tab. 4 Růst Gram-pozitivních bakterií na testovaných půdách

Identifikace dle MALDI TOF-MS	Počet kmenů se stejnými výsledky	GSP + penicillin, pimaricin	Sellersův diferenciační agar	Leeds Acinetobacter agar + MDR	Leeds Acinetobacter agar	Fermentace glukózy	Oxidáza
<i>Staphylococcus warneri</i>	1	N	Z	N	N	-	-
<i>Staphylococcus cohnii</i>	1	Č	Z	Ž	Ž	+	-
<i>Staphylococcus xylosus</i>	1	Č	Z	N	Ž	+	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	N	Z	N	N	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	1	Č	Z	Ž	Ž	+	+
<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i>	1	Č	Z	Ž	Ž	+	+
<i>Lactococcus garvieae</i>	1	Č	Ž	Ž	Ž	+++	-
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1	N	Ž	N	N	+	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	N	Ž	N	Ž	++	-
<i>Enterococcus faecium</i>	1	Č	Ž	Ž	Ž	++	-
<i>Bacillus cereus</i>	1	Č	Z	Ž	Ž	+	+
<i>Bacillus cereus</i>	1	Č	Z	Ž	Ž	+++	+
<i>Aerococcus viridans</i>	1	N	Ž	N	R	-	-
<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	1	Č	Z	N	R	-	+
<i>Kocuria rhizophila</i>	1	Č	Ž	Ž	Ž	+	+

Č - červené kolonie v barvě živné půdy; N - neroste; R - kolonie v různých odstínech růžové, beze změny acidobazického indikátoru v živné půdě; Z - zelené kolonie se žlutou zónou; Ž - žluté kolonie se žlutou zónou
 + pozitivní reakce (+ slabě pozitivní, ++ střední, +++ silně pozitivní reakce)
 - negativní reakce

Tab. 5 Růst kvasinek na testovaných půdách

Identifikace dle MALDI TOF-MS	Počet kmenů se stejnými výsledky	GSP + penicillin, pimaricin	Sellersův diferenciační agar	Leeds Acinetobacter agar + MDR	Leeds Acinetobacter agar	Fermentace glukózy	Oxidáza
<i>Debaryomyces hansenii</i>	1	Č	Z	Ž	B	-	-
<i>Sporobolomyces roseus</i>	1	Č	Ž	N	N	-	-
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1	Č	Z	RP	RP	-	+
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	1	Č	Z	Ž	Ž	+	+
<i>Candida tropicalis</i>	1	Č	B	Ž	Ž	++	+/-
<i>Candida crusei</i>	1	N	B	Ž	Ž	++	+/-
<i>Candida parapsilosis</i>	1	Č	B	Ž	Ž	+	+/-
<i>Candida kefyr</i>	1	N	B	Ž	Ž	+	+/-

Č - červené kolonie v barvě živné půdy; N - neroste; RP - růžově pigmentované kolonie, beze změny acidobazického indikátoru v živné půdě; Z - zelené kolonie se žlutou zónou; Ž - žluté kolonie se žlutou zónou
 + pozitivní reakce (+ slabě pozitivní, ++ střední, +++ silně pozitivní reakce)
 +/- velmi slabě pozitivní reakce
 - negativní reakce

na kvalitativní úrovni. Může to být způsobeno různou odolností jednotlivých buněk daného kmene v různém fyziologickém a metabolickém stavu.

Na Leeds *Acinetobacter* agaru bez návaznosti na výsledky confirmace byly získány správné výsledky pro 89 % izolátů, a to dokonce i přesto, že byl důraz při izolaci kladen na co největší morfologickou variabilitu kolonií, a nikoliv na četnost jejich výskytu. I tak mezi izoláty Gram-negativních aerobních bakterií pseudomonády a acinetobaktery tvořily 38 resp. 34 % (celkem 72 %) testovaného souboru, což svědčí o srovnatelné a vysoké frekvenci výskytu těchto druhů v syrovém mléce. Naopak problematické na této půdě byly izoláty náležející k druhům *Rhizobium*, *Aerococcus* a *Lysinibacillus*, které jsou jak z hlediska frekvence výskytu, tak z hlediska rizikových vlastností relativně méně významné.

Za pozornost ještě stojí mikroorganismy tvořící pigment - *Chryseobacterium* a *Rhodotorula*. Při vyhodnocení těchto druhů je důležité všimnout si toho, zda je zbarvení kolonie způsobeno produkovaným pigmentem, anebo změnou barvy acidobazického indikátorů v zóně okolo kolonií. Jestliže je to uváženo, oba tyto izoláty byly na Leeds *Acinetobacter* agaru vyhodnoceny správně.

Závěr

Díky analýze vzorků syrového mléka a následné charakterizaci a identifikaci zachycených mikroorganismů byl potvrzen významný a srovnatelně frekventovaný výskyt bakterií rodů *Pseudomonas* a *Acinetobacter* v syrovém mléce. Tyto mikroorganismy nemohou být od sebe rozlišeny žádnou z metod otestovaných v této práci ani v práci předchozí (Němečková a kol., 2012). Proto bylo navrženo nové mikrobiologické kritérium - Gram-negativní aerobní mikroorganismy. Stanoveny mohou být např. na GSP půdě s penicilinem a pimaricinem nebo na Sellersově diferenačním médiu, pokud se provede confirmace kolonií na fermentaci glukózy a na tvorbu oxidázy, anebo bez confirmace na Leeds *Acinetobacter* agaru. Díky své jednoduchosti lze poslední jmenovanou půdu doporučit při kontrole kvality syrového mléka. Případné použití této půdy na jiné typy vzorků by však mělo být předem odzkoušeno. Výhodou stanovení Gram-negativních aerobních bakterií ve srovnání s CPM nebo psychrotrofními mikroorganismy je, že tento parametr v rámci dostupných kultivačních metod co nejvýstižněji odráží zastoupení sledovaných technologicky rizikových mikroorganismů.

Poděkování

Děkujeme MVDr. Ivaně Kucharovičové z SVÚ Jihlava za spolupráci na identifikaci izolovaných mikroorganismů.

Tato práce vznikla s finanční podporou Národní agentury pro zemědělský výzkum Ministerstva zemědělství České republiky při řešení projektu QJ1210300 v programu KUS a projektu QK1710156 v programu ZEMĚ.

Literatura

- BARUZZI F., LAGONIGRO R., QUINTIERI L., MOREA M., CAPUTO L. (2012): Occurrence of non-lactic acid bacteria populations involved in protein hydrolysis of cold-stored high moisture Mozzarella cheese. *Food Microbiology*, 30, s. 37-44.
- ČSN EN ISO 4833-1 (2014) Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 1: technika převem a počítáním kolonií vykultivovaných při 30 °C.
- ČSN P ISO/TS 11059 (2009) Mléko a mléčné výrobky - Metoda stanovení počtu bakterií rodu *Pseudomonas*.
- CHEN S.J., CHENG CH.Y., CHEN T.L. (1998): Production of an alkaline lipase by *Acinetobacter radioresistens*. *J. Ferment. & Bioeng.*, 86, s. 308-312.
- JAWAD A., HAWKEY P.M., HERITAGE J., SNELLING A.M. (1994): Description of Leeds *Acinetobacter* medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter* spp., and comparison with Herellea agar and Holton's agar. *J. Clin. Microbiol.*, 32/10, s. 2353-2358.
- KAMPFER P. (1999): *Acinetobacter*. Ve: ROBINSON R.K. (edit.) *Encyclopedia of Food Microbiology* (s. 7-15). USA, Elsevier.
- LAHIRI K.K., MANI N.S., PURAI S.S. (2004): *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogen: Clinical significance and antimicrobial sensitivity. *Med. J. Armed Forces India*, 60, s. 7-10.
- NĚMEČKOVÁ I., PEŠEK E., HANUŠOVÁ J., ROUBAL P. (2012): Kultivační metody stanovení bakterií rodu *Pseudomonas* v mléce. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 131, s. I-V.
- PELEG A.Y., SEIFERT H., PATERSON D.L. (2008): *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 21, s. 538-582.
- SEDLÁČEK I. (2007): Čeleď *Moraxellaceae*. *Taxonomie prokaryot* (s. 119-120). ČR, Masarykova univerzita.
- ŠVIRÁKOVÁ E., MÜHLHANSOVÁ A., NĚMEČKOVÁ I., JUNKOVÁ P., PURKRTOVÁ S., JELÍNKOVÁ M., FELSBURG J. (2015): Identifikace technologicky rizikových bakterií rodu *Acinetobacter*. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 150, s. XIV-XX.

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

Přijato do tisku: 23. 7. 2018
Lektorováno: 8. 8. 2018

VÝVOJ NÁSTROJE (KET-REP) PRO IDENTIFIKACI A INTERPRETACI VÝSKYTU SUBKLINICKÝCH KETÓZ V KONTROLE UŽITKOVOSTI

Jan Říha¹, Oto Hanuš², Jan Trávníček³, Eva Samková³,
Zdeňka Hegedúšová⁴, Růžena Seydlová²,
Radoslava Jedelská², Jaroslav Kopecký²

¹ Bentley Czech s.r.o., Praha

² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

³ Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích,
Zemědělská fakulta

⁴ Taura ET s.r.o., Litomyšl

**Development of a tool (Ket-Rep) for the
subclinical ketosis occurrence identification
and interpretation in milk recording**