

Závěr

Diskutovány byly různé aspekty analyticky obtížně průkazné problematiky – rizika tvorby termostabilních proteolytických a lipolytických enzymů v syrovátce určené pro další potravinářské zpracování. Zjištěno bylo, že syrovátka sbíraná z výroby sýrů může obsahovat bakterie rodu *Pseudomonas*, jakožto producenty těchto enzymů. Pseudomonády se v syrovátce za reálných podmínek skladování pomnožovat mohou a teoreticky existuje i riziko, že nežádoucí enzymy tvoří. Doporučit lze proto, aby byla syrovátka zpasterována nejpozději během 48 h, lépe však do 24 h. Další opatření by mohla být např. v souvislosti s mikrobiologickou kvalitou syrového mléka či s výskytem biofilmů pseudomonád na provozu. Uvážena by měla být, pokud by přídavek syrovátky či koncentrátu/izolátu syrovátkových bílkovin do finálního potravinářského výrobku působil „nevysvětlitelné“ problémy se zpracováním, sensorickými, konzistenčními či funkčními vlastnostmi.

Poděkování

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

Literatura

- BRAUN P., SUTHERLAND J.P. (2003): Predictive modelling of growth and enzyme production and activity by a cocktail of *Pseudomonas* spp., *Shewanella putrefaciens* and *Acinetobacter* sp. *International Journal of Food Microbiology*, 86, s. 271-282.
- GRIEVE P.A., KITCHEN B.J. (1985): Proteolysis in milk: The significance of proteinases originating from milk leucocytes and a comparison of the action of leucocytes, Bacterial and natural milk proteinases on casein. *Journal of Dairy Research*, 52, s. 101-112.
- HAYES M.C., BOOR K. (2001): Raw milk and fluid milk products. MARTH E.H., STEEL J.L.: *Applied Dairy Microbiology*, 2. vydání (s. 59-76). USA, Marcel Dekker, Inc.
- CHEN L., DANIEL R.M., COOLBEAR T. (2003): Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal*, 13, s. 255-275.
- CHRAMOSTOVÁ J., RUBINA N., ŠEDIVCOVÁ V., DRAGON M., NĚMEČKOVÁ I., ROUBAL P. (2014): Vliv chladiřenských teplot na růst a proteolytickou činnost mikroorganismů syrového mléka. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 146, s. X-XIII.
- KIVES J., GUADARRAM D., ORGAZ B., RIVERA-SEN A., VAZQUEZ J. SAN-JOSE C. (2005): Interactions in biofilms of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* and *Pseudomonas fluorescens* cultured in cold UHT milk. *Journal of Dairy Science*, 88, s. 4165-4171.
- NĚMEČKOVÁ I., PECHAČOVÁ M., ROUBAL P. (2009): Problems with detection of proteolytic micro-organisms and their undesirable activities in milk. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, s. S2/82-S2/89.
- NĚMEČKOVÁ I., PEŠEK E., HANUŠOVÁ J., ROUBAL P. (2012): Kultivační metody stanovení bakterií rodu *Pseudomonas* v mléce. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 131, s. I-V.
- SCATAMBURLO T.M., YAMAZI A.K., CAVICCHIOLI V.Q., PIERI F.A. (2015): Spoilage potential of *Pseudomonas* species isolated from goat milk. *Journal of Dairy Science*, 98, s. 759-764.
- SHAMSUZZAMAN K., MCKELLAR R.C. (1987): Peptidases from two strains of *Pseudomonas fluorescens*: partial purification, properties and action on milk. *Journal of Dairy Research*, 54, s. 283-293.

ZHANG D., PALMER J., TEH K.H., CALINSIAN M.M.A., FLINT S. (2020): Milk fat influences proteolytic enzyme activity of dairy *Pseudomonas* species. *International Journal of Food Microbiology*, 320, č. 108543.

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

Přijato do tisku: 29. 3. 2020

Lektorováno: 2. 4. 2020

SLEDOVÁNÍ TVORBY BIOFILMU A TERMOREZISTENCE U ŘAS *PROTOTHECA* SPP. IZOLOVANÝCH Z BAZÉNOVÝCH VZORKŮ MLÉKA

Marcela Klimešová¹, Ivana Kucharovičová²,
Monika Morávková³, Romana Bačová³, Petr Roubal¹,
Růžena Seydlová¹, Ludmila Nejeschlebová¹

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

² Státní veterinární ústav, Jihlava

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

Monitoring of biofilm production and thermoresistance of *Prototheca* spp. isolated from bulk milk

Abstrakt

V bazénových vzorcích mléka (n = 266) byl sledován výskyt *Prototheca* spp. Z 26 získaných izolátů *Prototheca* spp. byla většina izolátů identifikována pomocí multiplexní PCR jako *P. zopfii* genotyp 2 a jeden kmen jako *P. blaschkeae*. Z těchto izolátů bylo následně vybráno pět izolátů *P. zopfii* genotyp 2 a jeden izolát *P. blaschkeae* pro následné studium tvorby biofilmu a termorezistence. Pro testování byly zvoleny teploty 47, 50, 55, 57 a 60 °C po dobu 1 až 90 minut. Všechny kmény produkovaly biofilm. Nejvýrazněji tvořily biofilm dva kmény *P. zopfii*, kde u jednoho kmene byla stanovena hodnota 8 a u druhého kmene hodnota 12, následoval kmen *P. blaschkeae* s hodnocením 4 a ostatní kmény *P. zopfii* s tvorbou biofilmu 1-1,5. Rezistence k testovaným teplotám byla u všech kménů téměř shodná. Všechny kmény přežily teplotu 50 °C po dobu 90 minut, kdy byl pozorován pokles viability buněk o 99,5 %. Negativní růst byl zjištěn při teplotě 55 °C po 15 minutách a teplotě 60 °C již po 1 minutě. D-hodnoty se pro všechny kmény *P. zopfii* pohybovaly v rozmezí pro D₄₇ 72-83 min, D₅₀ 52-54 min a D₅₅ 3 min. D-hodnota pro *P. blaschkeae* byla D₄₇ 59 min, D₅₀ 54 min a D₅₅ 3 min. Z-hodnoty se pohybovaly v rozmezí 5,3 až 5,5 °C pro *P. zopfii* a pro *P. blaschkeae* byla 5,9 °C.

Klíčová slova: kravské mléko, řasy, biofilm, termorezistence

Abstract

The occurrence of *Prototheca* spp. in bulk milk samples was monitored (n = 266). Using multiplex PCR, the most isolates out of 26 isolated were identified as *P. zopfii* genotype 2 and one isolate was identified as *P. blaschkeae*. Five isolates of *P. zopfii* genotype 2 and one isolate of *P. blaschkeae* were subsequently selected from these isolates for subsequent study of biofilm formation and thermoresistance. Temperatures of 47, 50, 55, 57 and 60 °C for 1-90 minutes were selected for testing. All strains produced biofilm. Most notably formed biofilm two strains of *P. zopfii* where the values in the range 8 to a maximum value of 12, followed by a strain of *P. blaschkeae* rated 4 and other strains of *P. zopfii* with biofilm formation 1-1.5. Resistance to the tested temperatures was almost identical in all strains. All strains survived at 50 °C for 90 minutes, when 99.5% decrease in cell viability was observed. Negative growth was observed at 55 °C after 15 minutes and 60 °C already after 1 minute. D-values varied from D₄₇ 72-83 min, D₅₀ 52-54 min and D₅₅ 3 min for all *P. zopfii* strains. D-value for *P. blaschkeae* was D₄₇ 59 min, D₅₀ 54 min and D₅₅ 3 min. Z-values varied from 5.3 to 5.5 °C for *P. zopfii* strains and 5.9 °C for *P. blaschkeae*.

Keywords: cow milk, algae, biofilm, thermoresistance

Úvod

Obecně jsou biofilmy charakterizovány jako společenství jednoho a více mikrobiálních druhů. Po přilnutí na povrch produkují mikroorganismy tzv. extracelulární polymerní látky (EPS), které mohou, vedle DNA a jiných proteinů, tvořit až 90 % celé hmoty biofilmu. EPS pak poskytuje buňkám stabilitu, zprostředkovává povrchovou adhezi a slouží jako podpora pro připojení buněk, enzymů a antibiotik. S tvorbou biofilmů je spojováno až 80 % patogenních mikroorganismů (Flemming a kol., 2007; Algburi a kol., 2017).

V prostředí prvovýroby mléka jsou vážným zdravotním problémem mastitidní patogeny s produkcí biofilmů, kde jsou mezi nejčastější původce tohoto onemocnění označovány *Staphylococcus aureus* a dále environmentální mikroorganismy (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp.), koaguláza-negativní stafylokoky (CNS), streptokoky (*Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*) a enterokoky (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*), stejně jako nebakteriální mikroorganismy, jako *Candida* spp. a *Prototheca* spp. (Zadoks a Fitzpatrick, 2009; Vyletěllová a kol., 2010; Contreras a Rodriguez, 2011; Jagielski a kol., 2019).

Jako *Prototheca* spp. jsou označovány druhy patřící do rodu zelených řas z čeledi *Chlorellaceae*. Bývají izolovány z různých vzorků, hlavně z vlhkého prostředí (hnůj, půda, voda) a někteří zástupci způsobují vzácné infekce u lidí (prototekóza), ale i u zvířat (prototeková

mastitida). *P. zopfii* genotyp 2 je označován za hlavního původce nebakteriální bovinní mastitidy (Roesler a kol., 2006; Osumi a kol., 2008; Onozaki a kol., 2013). Vedle tohoto druhu byla, i když v menší míře, z mastitidního mléka izolována i *P. blaschkeae* a *P. wickerhamii* (Roesler a kol., 2006; Marques a kol., 2006; Marques a kol., 2008; Thompson a kol., 2009). Prototekové mastitidy a jejich výskyt v prostředí prvovýroby mléka mohou způsobovat velké poškození mléčné žlázy s následkem brakace zvířat a značných ekonomických ztrát (Salerno a kol., 2010). Biofilmy vytvořené *P. zopfii* jsou navíc spojené s perzistencí mikroorganismů v mléčné žláze, odolností proti dezinfekci a s antimikrobiálními rezistencemi (Bridier a kol., 2011; Morandi a kol., 2016).

Práce byla zaměřena na potvrzení tvorby biofilmů kmenů *Prototheca* spp. izolovaných z bazénových vzorků kravského mléka a stanovení termorezistence při různých teplotách.

Materiál a metody

Původ vzorků a druhová identifikace

V roce 2019 byl zahájen plošný monitoring nebakteriálních původců mastitid v bazénových vzorcích syrového kravského mléka. Bazénové vzorky syrového mléka (celkem 266) byly v chladovém režimu dovezeny ze čtyř mlékáren do laboratoře SVÚ Jihlava. V den odběru byla provedena kultivace na Sabouradově agaru (SOP var. 19, SVÚ Jihlava) při teplotě 25 ± 1 °C a 37 ± 1 °C po dobu 3-5 dnů, přičemž vyšší teplota umožnila předběžný odečet již po 3 dnech. Mikroskopicky suspektní kmeny *Prototheca* spp. pocházející z 26 vzorků bazénových mlék, byly následně identifikovány molekulární metodou na bázi multiplexní PCR. Nejprve probíhala izolace DNA pomocí fenol-chloroformové metody. Navážky 50 mg jednotlivých kultur byly suspendovány v roztoku, obsahujícím 50 mM EDTA a 2% SDS-EB pufr. Extrakce probíhala ve dvou krocích: nejprve roztokem fenol-chloroform v poměru 1:1 a poté chloroform-isoamyl alkohol v poměru 24:1. DNA byla následovně vysrážena a přečištěna pomocí 100% a 70% ethanolu. Následovala multiplexní PCR s gelovou elektroforézou. Sekvence primerů (Tabulka 1) byly převzaty dle Capra a kol. (2014) a jsou schopné určit, zda izolát patří do rodu *Prototheca* spp. a také rozlišit konkrétní druhy *P. zopfii* genotyp 2, *P. blaschkeae* a *P. wickerhamii*. Do PCR reakce o celkovém objemu 40 µl bylo použito 1,6 µl zásobní koncentrace primerů 10 pmol/µl, přičemž další komponenty reakční směsi byly součástí kitu EliZyme™ HS Robust. Denaturace probíhala v termocycleru firmy BioRad při 95 °C po dobu 2 min; amplifikace při 95 °C 15 s, 60 °C 15 s a 72 °C 40 s (30 cyklů); a elongace při 72 °C po dobu 5 min. Vizualizace amplikonů probíhala v 1,2% agarózovém gelu s ethidium bromidem. Pro studium tvorby biofilmu a sledování rezistence bylo následně vybráno celkem 5 kmenů *P. zopfii* genotyp 2 a jeden kmen *P. blaschkeae*.

Tvorba biofilmu

Postup zkoušky byl proveden dle Djordevic a kol. (2002). Vykultivované kmeny *Prototheca* spp. byly naočkovány jednou očkovací kličkou do 9 ml BHI bujonu. Následovalo pomnožení 24 hodin při teplotě 25 °C. Takto připravená kultura byla naředěna v poměru 0,3 ml do 10 ml sterilního BHI bujonu a v objemu 100 µl dávkována na mikrotitrační destičky předem vypláchnuté 70% ethanolom a usušené na vzduchu.

Od každého testovaného kmene byly napipetovány 4 jamky na mikrotitrační destičce a další 4 jamky byly použity jako kontrola pouze se sterilním BHI bujonem. Připravené mikrotitrační destičky byly inkubovány při teplotě 25 °C po dobu 72 hodin. Poté byl z jamek vylit BHI bujon, následovalo 5 x promytí destilovanou vodou a bylo napipetováno 150 µl 0,1% roztoku krystalové violeti, která se nechala působit po dobu 45 min. Následovalo vylití barvicího roztoku a 5 x promytí destilovanou vodou. Vizuálně byla hodnocena intenzita zbarvení pomocí stupnice 0 nezbarveno, (+) velmi slabé zbarvení, + slabé zbarvení, ++ středně intenzivní zbarvení, +++ velmi intenzivní zbarvení a výsledek byl vyjádřen jako součet získaných bodů ve všech čtyřech jamkách (výsledná stupnice 0-12). Jako pozitivní kontrola byl současně testován kmen *Acinetobacter schindleri*, silně biofilmující izolát S24-AB-1B (původ - stěr po sanitaci, uložen ve sbírce pracovních kmenů VÚM, Praha).

Termorezistence

Termorezistence byla testována při teplotě 47, 50, 55, 57 a 60 °C po dobu 1 až 90 minut. Erlenmeyerova baňka s 50 ml plnotučného sterilního mléka byla ponořena do vodní lázně (kádnice s magnetickým míchadlem) na vyhřívanou plotýnku s teplotní regulací pomocí sondy. Po ustálení kontrolované teploty bylo mléko zaočkováno kmeny *P. zopfii* a *P. blaschkeae*. Vstupní koncentrace jsou uvedeny v tabulce 3, 4 a 5. Po uplynutí testované doby záhřevu byl z Erlenmeyerovy baňky odebrán 1 ml mléka, které představovalo nulté ředění pro stanovení celkového počtu mikroorganismů. Vzorek mléka byl dále naředěn ve sterilní destilované vodě a vyočkován o objemu 0,1 ml na povrch vysušeného media (GKCH, Milcom Tábor) a rozetřen. Petriho misky byly kultivovány při teplotě 25 °C po dobu 3 až 5 dnů a poté byly hodnoceny misky s počtem kolonií 100 až 300 KTJ/ml. Testování bylo prováděno duplicitně.

K porovnání termorezistence jednotlivých kmenů byla vyčíslena D-hodnota, která vyjadřuje potřebnou dobu ke snížení počtu mikroorganismů o jeden decimální řád při zkoumané teplotě, a z-hodnota (°C), která charakterizuje změnu teploty potřebnou ke snížení D-hodnoty o jeden řád (Harrigan, 1998). Tyto hodnoty byly stanoveny pro každý kmen individuálně podle postupu, uvedeného výše.

Výsledky a diskuse

Výskyt *Prototheca* spp.

Mastitida způsobená *Prototheca* spp. je často subklinická, což komplikuje včasné rozeznání infekce v chovu.

Tabulka 1 Přehled primerů pro identifikaci izolátů dle Capri a kol., 2014

| Primer name | Primer sequence (5' - 3') | Specificity |
|-------------|------------------------------|---|
| N476-F | TCGGAGTTAGCTGGTCTCC | All <i>Prototheca</i> spp. |
| N476-R | ATTTGGGGCCTTAACGGT | All <i>Prototheca</i> spp. |
| N2-F | TGTAATAGATATTAGAAACGCAACAAA | <i>P. zopfii</i> genotyp 2 |
| N2-R | GCAGCAGTAGGGAATTTGG | <i>P. zopfii</i> genotyp 2, <i>P. blaschkeae</i> |
| B13-F | AAGTTTACATTAAGATCATTTCGATTCT | <i>P. blaschkeae</i> |
| Wk3-F | CGGGAATCTTCGGATCATT | <i>P. wickerhamii</i> |
| Wk5-R | GGTCAAATGCTTAAAGGCGTA | <i>P. wickerhamii</i> |

Postupem času řasa nenávratně mění a poškozuje tkáň mléčné žlázy, klesá tak produkce i kvalita mléka a významně roste počet somatických buněk v mléce, který dosahuje až několik milionů v jenom mililitru mléka. Diagnostika je založená na izolaci a identifikaci *Prototheca* spp. v mléce. V naší práci byla potvrzena kultivačně přítomnost *Prototheca* spp. ve 26 vzorcích z 266 vyšetřených bazénových mlék vzorků. Izoláty byly následně podrobněji identifikovány pomocí multiplexní PCR, kdy byly potvrzeny 2 druhy této řasy. Ve většině případů se jednalo o *P. zopfii* genotyp 2 a v jednom případě byl izolát určen jako *P. blaschkeae*. Podobně Onozaki a kol. (2013) identifikovali rovněž všechny izoláty z mléka dojníc (n = 92) jako *P. zopfii* genotyp 2. Jagielski a kol. (2019) vyšetřovali 441 čtvrtových vzorků krav, podezřelých na mastitidní onemocnění. *Prototheca* spp. byla potvrzena v 65 případech (14,7 %). Všechny izoláty patřily k *P. zopfii* genotyp 2, pouze jeden izolát byl identifikován jako *P. blaschkeae*. *Prototheca* spp. se tak řadila na třetí místo nejčastějších původců bovinní mastitidy po *Streptococcus* spp. a *Staphylococcus* spp. Hodges a kol. (1985) diagnostikovali *P. zopfii* u 17 ze 120 mléčných krav. Podobně Marques a kol. (2008), Roesler a Hensel (2003) potvrdili pomocí PCR metody výskyt mastitidních infekcí způsobených *P. zopfii* a *P. blaschkeae*. Pro následné studium tvorby biofilmu a termorezistence bylo vybráno 5 kmenů *P. zopfii* genotyp 2 a 1 kmen *P. blaschkeae*.

Tvorba biofilmu

Tvorba biofilmu je jedním z nejdůležitějších faktorů perzistence v prostředí jak v prvovýrobě, tak ve zpracovatelských závodech (Simões a kol. 2010). Nejvýrazněji tvořily biofilm 2 kmeny *P. zopfii*, naměřená hodnota u těchto kmenů byla 8 a 12 (Tabulka 2). Následovala *P. blaschkeae* s hodnocením 4. Ostatní kmeny *P. zopfii* byly také pozitivní, nicméně s méně intenzivní tvorbou biofilmu (1-1,5). Shodné výsledky pozitivní tvorby biofilmu u prototék potvrdili také Ely a kol. (2019). Všech 32 kmenů *P. zopfii*, izolovaných ze subklinicky a klinicky mastitidních krav, však klasifikovali jako producenty výrazného biofilmu. Morandi a kol. (2016) potvrdili tvorbu biofilmu u všech izolovaných kmenů *P. zopfii*

Tabulka 2 *Prototheca* spp. - výsledky tvorby biofilmu a testování termorezistence

| Číslo kmene | Označení kmene | Hodnocení biofilmu | | | | Biofilm celkem |
|-------------|-------------------------------------|--------------------|-----|-----|-----|----------------|
| | | | | | | |
| 1 | 1- 8I-M <i>P. zopffii</i> genotyp 2 | (+) | (+) | 0 | 0 | 1 |
| 2 | 2-7 M2 <i>P. zopffii</i> genotyp 2 | (+) | (+) | (+) | 0 | 1,5 |
| 3 | 3- 10 M3 <i>P. blaschkeae</i> | + | + | + | + | 4 |
| 4 | 3-11 M <i>P. zopffii</i> genotyp 2 | (+) | (+) | (+) | 0 | 1,5 |
| 5 | 3-20 M5 <i>P. zopffii</i> genotyp 2 | ++ | ++ | ++ | ++ | 8 |
| 6 | 3-21 M5 <i>P. zopffii</i> genotyp 2 | +++ | +++ | +++ | +++ | 12 |

genotyp 2, avšak, podobně jako v naší studii, detekovali velkou variabilitu uvnitř tohoto druhu.

Termorezistence a D-hodnota

Výsledky termorezistence jsou podrobně uvedeny v Tabulce 3 až 5. Růst testovaných kmenů byl při všech teplotách téměř shodný. Při teplotě 47 °C po dobu 90 minut bylo schopné přežít 1-3 % buněk a při teplotě 50 °C přežívalo teplotu za stejnou dobu 0,5 % buněk. Při vyšších teplotách byl zaznamenán negativní růst při teplotě 55 °C po 15 minutách, při 57 °C po 5 – 10 minutách a při teplotě 60 °C již po 1 minutě. Marques a kol. (2010) zkoušeli vyšší teploty u 34 kmenů *P. zopffii* a 28 kmenů *P. blaschkeae*.

Zjistili, že 100% účinnost inhibice všech kmenů byla při teplotě 100 °C za 1 sekundu. Účinnost při teplotě 62 °C

Tabulka 3 Výsledky termorezistence při teplotě 47 °C po dobu 1 až 90 minut (log KTJ/ml)

| Kmen | Poč. hod | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
|------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | 5,32 | 4,95 | 4,81 | 4,73 | 4,60 | 4,51 | 4,40 | 4,36 | 4,32 | 4,30 | 4,28 | 4,23 | 3,95 | 3,48 |
| 2 | 5,30 | 4,98 | 4,81 | 4,77 | 4,68 | 4,65 | 4,58 | 4,49 | 4,45 | 4,40 | 4,28 | 4,18 | 4,15 | 3,78 |
| 3 | 5,28 | 4,75 | 4,68 | 4,61 | 4,51 | 4,48 | 4,38 | 4,24 | 4,15 | 4,08 | 3,85 | 3,74 | 3,60 | 3,26 |
| 4 | 5,34 | 4,95 | 4,83 | 4,73 | 4,61 | 4,52 | 4,43 | 4,40 | 4,36 | 4,32 | 4,30 | 4,26 | 4,00 | 3,48 |
| 5 | 5,38 | 4,96 | 4,84 | 4,74 | 4,64 | 4,54 | 4,43 | 4,41 | 4,38 | 4,34 | 4,32 | 4,28 | 3,98 | 3,49 |
| 6 | 5,36 | 4,96 | 4,88 | 4,76 | 4,63 | 4,53 | 4,41 | 4,38 | 4,36 | 4,32 | 4,28 | 4,26 | 3,95 | 3,48 |

Tabulka 4 Výsledky termorezistence při teplotě 50 °C po dobu 1 až 90 minut (log KTJ/ml)

| Kmen | Poč. hod | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 |
|------|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 1 | 5,32 | 4,88 | 4,71 | 4,59 | 4,42 | 4,38 | 4,28 | 4,23 | 4,04 | 3,95 | 3,86 | 3,80 | 3,48 | 3,00 |
| 2 | 5,30 | 4,83 | 4,63 | 4,57 | 4,45 | 4,34 | 4,24 | 4,23 | 4,11 | 3,93 | 3,81 | 3,74 | 3,53 | 2,95 |
| 3 | 5,28 | 4,75 | 4,62 | 4,54 | 4,46 | 4,35 | 4,26 | 4,20 | 4,04 | 3,90 | 3,83 | 3,70 | 3,51 | 2,95 |
| 4 | 5,34 | 4,93 | 4,75 | 4,61 | 4,48 | 4,43 | 4,32 | 4,28 | 4,23 | 4,00 | 3,95 | 3,85 | 3,59 | 3,00 |
| 5 | 5,38 | 4,94 | 4,76 | 4,72 | 4,51 | 4,46 | 4,32 | 4,30 | 4,26 | 4,04 | 4,00 | 3,93 | 3,51 | 3,04 |
| 6 | 5,36 | 4,96 | 4,91 | 4,77 | 4,49 | 4,45 | 4,30 | 4,27 | 4,24 | 4,02 | 4,00 | 3,86 | 3,58 | 3,00 |

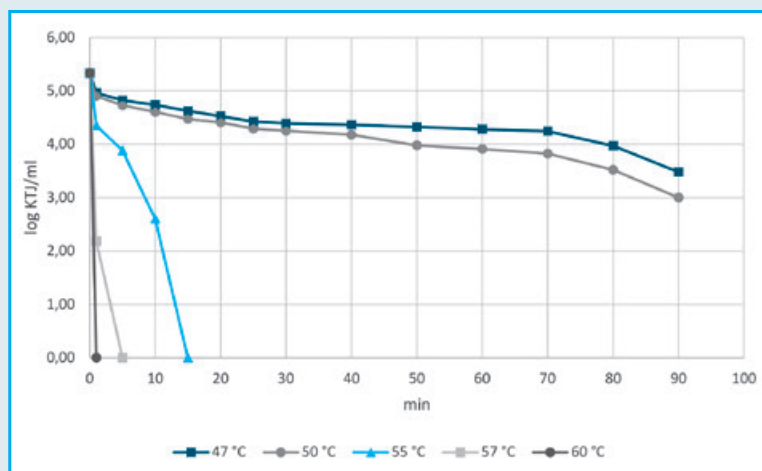
Tabulka 5 Výsledky termorezistence při teplotě 55, 57 a 60 °C (log KTJ/ml)

| Kmen | Poč. hod. | 55 °C | | | | 57 °C | | | 60 °C |
|------|-----------|-------|------|------|----|-------|------|----|-------|
| | | 1 | 5 | 10 | 15 | 1 | 5 | 10 | 1 |
| 1 | 5,32 | 4,36 | 3,90 | 2,70 | 0 | 2,30 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 5,30 | 4,32 | 3,85 | 2,60 | 0 | 2,78 | 1,70 | 0 | 0 |
| 3 | 5,28 | 4,26 | 3,75 | 2,60 | 0 | 2,00 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 5,34 | 4,34 | 3,93 | 2,48 | 0 | 2,00 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 5,38 | 4,37 | 3,90 | 2,78 | 0 | 1,95 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 5,36 | 4,40 | 3,86 | 2,60 | 0 | 2,30 | 0 | 0 | 0 |

Tabulka 6 D-hodnota (min) při teplotě 47 a 50 °C

| Kmen | Rovnice regresní přímky | D-hodnota | Rovnice regresní přímky | D-hodnota | Rovnice regresní přímky | D-hodnota |
|------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | 47 °C | | 50 °C | | 55 °C | |
| | 1 | $y = -0,0135x + 4,9235$ | 74 | $y = -0,0188x + 4,8764$ | 53 | $y = -0,3155x + 5,2135$ |
| 2 | $y = -0,0120x + 4,9602$ | 83 | $y = -0,0185x + 4,8481$ | 54 | $y = -0,3153x + 5,1689$ | 3 |
| 3 | $y = -0,0169x + 4,8557$ | 59 | $y = -0,0184x + 4,8240$ | 54 | $y = -0,3115x + 5,1081$ | 3 |
| 4 | $y = -0,0133x + 4,9388$ | 75 | $y = -0,0184x + 4,9214$ | 54 | $y = -0,3212x + 5,2097$ | 3 |
| 5 | $y = -0,0135x + 4,9591$ | 74 | $y = -0,0187x + 4,9590$ | 53 | $y = -0,3163x + 5,2477$ | 3 |
| 6 | $y = -0,0138x + 4,9593$ | 72 | $y = -0,0192x + 4,9820$ | 52 | $y = -0,3202x + 5,2293$ | 3 |

$y = -0,3155x + 5,2135$



Graf 1 Vývoj termorezistence *Prototheca* spp. při teplotě 47, 50, 55, 57 a 60 °C

Tabulka 7 Z-hodnota (°C) pro teploty 47, 50 a 55 °C

| Kmen | Teplota | log D-hodnoty (min) | Rovnice regresní přímky | z-hodnota (°C) |
|------|---------|---------------------|-------------------------|----------------|
| 1 | 47 | 1,8692 | $y = -0,1817x + 10,563$ | 5,5 |
| | 50 | 1,7243 | | |
| | 55 | 0,4771 | | |
| 2 | 47 | 1,9191 | $y = -0,1875x + 10,875$ | 5,3 |
| | 50 | 1,7324 | | |
| | 55 | 0,4771 | | |
| 3 | 47 | 1,7709 | $y = -0,1708x + 9,9823$ | 5,9 |
| | 50 | 1,7324 | | |
| | 55 | 0,4771 | | |
| 4 | 47 | 1,8751 | $y = -0,1825x + 10,61$ | 5,5 |
| | 50 | 1,7324 | | |
| | 55 | 0,4771 | | |
| 5 | 47 | 1,8692 | $y = -0,1817x + 10,563$ | 5,5 |
| | 50 | 1,7243 | | |
| | 55 | 0,4771 | | |
| 6 | 47 | 1,8573 | $y = -0,1802x + 10,481$ | 5,5 |
| | 50 | 1,7160 | | |
| | 55 | 0,4771 | | |

po 15 minutách byla 76 % (*P. zopfii*) a 79 % (*P. blaschkeae*), na rozdíl od našich výsledků, kdy jsme zjistili 100% účinnost po 15 minutách již při nižší teplotě 55 °C.

Vypočtené D-hodnoty se pro všechny kmeny *P. zopfii* pohybovaly v rozmezí pro D_{47} 72–83 min, D_{50} 52–54 min a D_{55} 3 min. D-hodnota pro *P. blaschkeae* byla D_{47} 59 min, D_{50} 54 min a D_{55} 3 min. (Tabulka 6). Z-hodnoty vypočtené na základě D-hodnot byly naměřeny pro kmen č. 1 – 5,5 °C, č. 2 – 5,3 °C, č. 3 – 5,9 °C, č. 4 – 5,5 °C, č. 5 – 5,5 °C a č. 6 – 5,5 °C (Tabulka 7). Vzhledem k výsledkům D-hodnoty a k tomu, že počet kolonií byl v průběhu sledovaných teplot u všech kmenů téměř shodný, je v Grafu 1 znázorněn vývoj termorezistence pro všechny kmeny, tedy rod *Prototheca* spp. Počet kolonií je vyjádřen jako medián log KTJ/ml.

Závěr

V práci byla potvrzena přítomnost *Prototheca* spp. celkem ve 26 vzorcích z 266 vyšetřených bazénových mlék vzorků (9,8 %), z nichž 25 izolátů bylo identifikováno jako *P. zopfii* genotyp 2 a v jednom případě byl izolát určen jako *P. blaschkeae*. U všech vybraných kmenů byla potvrzena schopnost tvorby biofilmu, což může mít negativní dopad na jeho přežívání v prostředí prvovýroby mléka a s tím spojenou rezistenci na antimikrobiální látky a vyšší odolnost na dezinfekční prostředky. Toto zjištění podporuje důležitost sledování i nebakteriálních původců mastitidních infekcí vedle běžně sledovaných bakteriálních patogenů. Avšak vzhledem k tomu, že žádný kmen nepřežival

teplotu 60 °C po jedné minutě působení, lze předpokládat, že pasterační teplota 72 °C po dobu 15 – 20 sekund, která se běžně využívá při výrobě mléčných výrobků, eliminuje výskyt *Prototheca* spp. v syrovém mléce a zdravotní bezpečnost mléčné suroviny tak nedochází újmy.

Poděkování:

Příspěvek vznikl za podpory projektů MZe ZEMĚ QK1910092 a MZe RO1420.

Literatura

- ALGBURI A., COMITO N., KASHTANOV D., CICKS L.M.T., CHIKINDAS M.L. (2017): Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, 83, (3), s. e02508-16. doi: 10.1128/AEM.02508-16.
- BRIDIER A., BRIANDET R., THOMAS V., DUBOIS-BRISSENET F. (2011): Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27, (9), s. 1017–1032, doi: 10.1080/08927014.2011.626899.
- CAPRA E., CREMONESI P., CORTIMIGLIA C., BIGNOLI G., RICCHI M., MORONI P., PESCE A., LUINI M., CASTIGLIONI B. (2014): Simultaneous identification by multiplex PCR of major *Prototheca* spp. isolated from bovine and buffalo intramammary infection and bulk tank. *Letters in applied microbiology*, 59, (6), s. 642–647. doi: 10.1111/lam.12326. Epub 2014 Oct 20.
- CONTRERAS G., RODRIGUEZ J.M. (2011) Mastitis: comparative etiology and epidemiology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 16, (4), s. 339–356. DOI: 10.1007/s10911-011-9234-0.
- DJORDEVIC D., WIEDMANN M., MC LANDSBOROUGH L.A. (2002): Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied Environmental Microbiology*, 68, (6), s. 2950–2958. doi: 10.1128/AEM.68.6.2950-2958.2002.
- ELY V.L., GRESSLER L.T., SUTILI F.J., RIBEIRO M.G., DA COSTA M.M., DE VARGAS A.C., BOTTON S.A. (2019): Biofilm formation by *Prototheca zopfii* isolated from clinical and subclinical bovine mastitis in distinct growth conditions under different dyes. *Ciência Rural*, 49, (2), s. e20180574. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20180574>.
- FLEMMING H.C., NEU T.R., WOZNIAC D.J. (2007): The EPS Matrix: The "House of Biofilm Cells". *Journal of Bacteriology*, 189, (22), s. 7945–7947. doi:10.1128/JB.00858-07.
- HARRIGAN W.F. (1998): Laboratory methods in food microbiology, ps. 123–127. Academic Press, London, U.K. ISBN 978-0-12-326043-7.
- HODGES R.T., HOLLAND J.T.S., NEILSONT F.J.A., WALLACE N.M. (1985): *Prototheca zopfii* mastitis in a herd of dairy cows, *New Zealand Veterinary Journal*, 33, (7), s. 108–111, DOI: 10.1080/00480169.1985.35187.
- JAGIELSKI T., KRUKOWSKI H., BOCHNIARZ M., PIECH T., ROESKE K., BAKUŁA Z., WLAZŁO L., WOCH P. (2019): Prevalence of *Prototheca* spp. on dairy farms in Poland – a cross-country study. *Microbial Biotechnology*, 12, (3), s. 556–566. doi:10.1111/1751-7915.13394.

- MARQUES S., SILVA E., CARVALHEIRA J., THOMPSON G. (2006): Short Communication: In vitro antimicrobial susceptibility of *Prototheca wickerhamii* and *Prototheca zopfii* isolated from bovine mastitis. *Journal of Dairy Science*, 89, (11), s. 4202–4204. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72465-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72465-1).
- MARQUES S., SILVA E., CARVALHEIRA J., THOMPSON G. (2010): Short Communication: Temperature sensibility of *Prototheca blaschkeae* strains isolated from bovine mastitic milk. *Journal of Dairy Science*, 93, (11), s. 5110–5113. doi: 10.3168/jds.2010-3249.
- MARQUES S., SILVA E., KRAFT C., CARVALHEIRA J., VIDEIRA A., HUSS V. A., THOMPSON G. (2008): Bovine mastitis associated with *Prototheca blaschkeae*. *Journal of clinical microbiology*, 46, (6), s. 1941–1945. doi:10.1128/JCM.00323-08.
- MORANDI S., CREMONESI P., CAPRA E., SILVETTI T., DECIMO M., BIANCHINI V., ALVES A.C., VARGAS A.C., COSTA G.M., RIBEIRO M.G., BRASCA M. (2016): Molecular typing and differences in biofilm formation and antibiotic susceptibilities among *Prototheca* strains isolated in Italy and Brazil. *Journal of Dairy Science*, 99, (8), s. 6436–6445. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-10900>.
- ONOZAKI M., MAKIMURA K., SATOH K., HASEGAWA A. (2013): Detection and identification of genotypes of *Prototheca zopfii* in clinical samples by quantitative PCR analysis. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 66, (5), s. 383–390. <https://doi.org/10.7883/yoken.66.383>.
- OSUMI T., KISHIMOTO Y., KANO R., MARUYAMA H., ONOZAKI M., MAKIMURA K., ITO T., MATSUBARA K., HASEGAWA A. (2008): *Prototheca zopfii* genotypes isolated from cow barns and bovine mastitis in Japan. *Veterinary Microbiology*, 131, (3–4), s. 419–423. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.04.012>.
- ROESLER U., HENSEL A. (2003): Longitudinal analysis of *Prototheca zopfii* - specific immune responses: correlation with disease progression and carriage in dairy cows. *Journal of clinical microbiology*, 56, (6), s. 1419–1425. DOI:10.1099/ijs.0.63892-0.
- ROESLER U., MÖLLER A., HENSEL A., BAUMANN D., TRUYEN U. (2006): Diversity within the current algal species *Prototheca zopfii*: A proposal for two *Prototheca zopfii* genotypes and description of a novel species, *Prototheca blaschkeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, (6), s.1419-1425. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63892-0>.
- SALERNO T., RIBEIRO M.G., LANGONI H., SIQUEIRA A.K., DA COSTA E.O., MELVILLE P.A., BUENO V.F.F., YAMAMURA A.A.M., ROESLER U., DA SILVA A.V. (2010): In vitro algacidal effect of sodium hypochlorite and iodine based antiseptics on *Prototheca zopfii* strains isolated from bovine milk. *Research in Veterinary Science*, 88, s. 211–213.
- SIMÕES M., SIMÕES L. C., VIEIRA M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43, (4), s. 573–583. doi:10.1016/j.lwt.2009.12.008.
- THOMPSON G., SILVA E., MARQUES S., MÜLLER A., CARVALHEIRA J. (2009): Algaemia in a dairy cow by *Prototheca blaschkeae*. *Medical Mycology*, 47, s. 527–531. <https://doi.org/10.1080/13693780802566341>.
- VAN ASSELT E.D., ZWIETERING M.H. (2006): A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 107, s. 73–82.
- VYLETĚLOVÁ M., NEJESCHLEBOVÁ L., HANUŠ O. (2010): Sledování hlavních mastitidních patogenů. *Náš chov*, (2), s. 68–71. ISSN 0027-8068.
- ZADOKS R., FITZPATRICK J. (2009): Changing trends in mastitis. *Irish Veterinary Journal*, 62 (Suppl 4), s. S59–S70. doi: 10.1186/2046-0481-62-S4-S59.

Korespondující autor:

doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D.

Výzkumný ústav mlékařenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, e-mail: marcela.vyletelova@seznam.cz

Přijato do tisku: 25. 3. 2020
Lektorováno: 5. 4. 2020

REFORMULACE ČERSTVÝCH NETERMIZOVANÝCH SÝRŮ SNIŽOVÁNÍM OBSAHU SOLI

Irena Němečková, Šárka Havlíková, Jan Forejt,
Zdeněk Švandrlík

Výzkumný ústav mlékařenský s.r.o.

Reformulation of fresh non-thermized cheeses by the lowering of salt content

Abstrakt

Nadměrný příjem chloridu sodného je jedním z hlavních zdravotních rizik tzv. západní stravy, existuje proto snaha obsah NaCl v potravinách redukovat. V této práci jsme se zaměřili na reformulaci obsahu soli v čerstvých netermizovaných sýrech s cílem posoudit, jaká pro to existují technologická a mikrobiologická omezení. Pokusné řady sýrů byly získány solením v solné lázni o koncentraci 10; 15 a 20 % po dobu 5 a 15 min, přičemž vznikla koncentrační řada sýrů obsahující 0,5 až 1,0 % NaCl. V průběhu 14 dní skladování při 4–8 °C byla hodnocena sušina, pH, SH, profily organických kyselin, mikrobiologické a senzorycké vlastnosti. V sušině ani kyselostech se vzorky navzájem významně nelišily. Rozdíly však byly zjištěny v zastoupení halotolerantních mikroorganismů a kvasinek a také v intenzitě vnímání hořké chuti u série s neoptimalizovanou dávkou syřidla a též v konzistenci. Získané výsledky naznačují, že je snižování obsahu soli v čerstvých netermizovaných sýrech možné, avšak je nutné uvážit konkrétní hygienické a technologické podmínky výroby.

Klíčová slova: solení sýrů; solná lázeň; senzorycké vady; trvanlivost; mikrobiologické parametry sýrů

Abstract

Excessive intake of sodium chloride is one of the main health risks of western diet. Thus, an effort to reduce the content of NaCl in foods exists. In this work, we focused on the reduction of salt content in fresh non-thermized cheeses with the aim to appreciate its technological and microbiological limits. Experimental cheese series were obtained by brining in a brine with 10; 15 and 20 % of NaCl for 5 and 15 min while the concentration raw of cheeses contained from 0.5 to 1.0 % NaCl. During 14-day-storage at 4–8 °C, dry matter, pH, SH, organic acid profile, microbiological and sensory properties were evaluated. The samples did not significantly differ in dry matter and acidity. However, the differences were found out in the number of halotolerant microorganisms and yeasts as well as in the perception intensity of bitterness in the series with nonoptimized rennet ration and also in