

s intenzivní produkcí KT s širokým spektrem účinku. Některé studie jako Wojcik a Kordowska-Wiater (2015) zmiňují, že největší potenciál v rámci kmenů s produkcí KT představují divoké kmeny kvasinek. Samotné testování interakcí in vitro má své limity, ale bez tohoto kroku nelze ověřit fenotypy a biotypy kvasinek, citlivost vůči KT za optimálně řízených podmínek (Buzzini a kol., 2007). I když byl otestován vliv KT na velké druhové spektrum kvasinek, nejvíce studií je zaměřeno na potenciální využití KT ve farmacii vůči patogenním druhům kvasinek, déle ve vinařství a pivovarnictví. Ostatní odvětví potravinářského průmyslu, včetně mlékárenství antifungální efekt kvasinek s produkcí KT vůči kvasinkovým kontaminantům prozatím opomíjí.

### Poděkování

Příspěvek byl zpracován s podporou Ministerstva zemědělství ČR v rámci projektu QK1910036 a institucionální podpory MZE-RO1418.

### Literatura

- ANTONINI S.R.C., SANINO A., ARAÚJO J.C. & TOSTA C.D. (2005): The killer yeasts and the alcoholic fermentation. *Brazilian Journal of Food Technology*, 5, s. 40-46.
- BAEZA M. E., SANHUEZA M. A. CIFUENTES H.V. (2008): Occurrence of killer yeast strains in industrial and clinical yeast isolates. *Biol Res*, 41, s. 73-182.
- BOYNTON P. J. (2019): The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats. *Yeast*, 36, s. 473-485.
- BUZZINI P., TUCCHETTI B., VAUGHAN-MARTINI A.E. (2007): The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the state of the art, potentialities and limitations. *FEMS Yeast Res*, 7, s.749-760.
- BUZZINI P. & MARTINI A. (2001): Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeasts. *Med Mycol*, 39, s. 479-482.
- CZERUCKA D., PICHE T., RAMPAL P. (2007) Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther*, 26, s. 767–778.
- GEDDES-MCALLISTER J. A SAPIRO R (2019): New pathogens, new tricks: emerging, drug resistant fungal pathogens and future prospects for antifungal therapeutics. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 1435, s. 57-85.
- GUNGE A., TAMARU F., OZAWA K., SAKAGUCHI I. (1981): Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *Journal of bacteriology*, 145, 382-390.
- HATOUM R., LABRIE S., FLISS I. (2012): Antimicrobial and probiotic properties of yeast from fundamentals to novel applications. *Frontiers in microbiology*, 3, s. 1-12.
- KURTZMAN, C. P., FELL J. W., BOEKHOUT T. (2011): Gene Sequence analyses and other DNA-based methods for yeast species recognition. V knize *The yeast taxonomy study* (Kurtzman C. P., Fell J. W., Boekhout, T. ed.), s. 87-128, Elsevier, London, UK.
- LOPES, C. A. a SANGORRÍN, M. P. (2010): Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Revista Argentina de Microbiología*, 42, s. 298-306.
- LOWES, K., SHEARMEN, C.A., PAYNE, J. MACKENZIE, D., ARCH, D.B., MERRY, R.J. & GASSON, M.J. (2000): Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocins HM K. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, s. 1066-1076.
- NOVOTNÁ D., FLÉGELOVÁ H. a JANDEROVÁ B. (2004): Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 4, s. 803–813.
- JIRKŮ V. (1992): Nystatin and killer toxin sensitivity of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol*, 8, s. 192–195.
- PALFREE R.G.E. a BUSSEY H. (1979): Yeast Killer Toxin: Purification and Characterisation of the Protein Toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 93: 487-493.
- PALMA M. L., ZAMITH-MIRANDA D., MARTINS F. S., BOZZA F. A., NIM-RICHTER L., MONTERO-LOMELI M., MARQUES E.T.A., DOURADINHA B. (2015): Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, s. 6563-6570.
- SALEK A.T. (2001): Yeast antimicrobial proteins, *Biotechnology*, 4, s. 135-162.
- SANTOS, A., SANCHEZ, A. a MARQUIRA, D. (2004): Yeast as biological agent to control *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research*, 159, s. 331-339.
- SANTOS, A., SAN MAURO, M., BRAVO, E. & MARQUINA, D. (2009): PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology*, 155, s. 624-634.
- SCHMITT M., BREINIG F. (2006): Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol*, 4, 212–221.
- VADKERTIOVA R. a SLAVIKOVA E. (2007): Killer activity of yeasts isolated from natural environments against some medically important *Candida* species. *Polish Journal of Microbiology*, 56, s. 39-43.
- WAEMA S., MANEESRI J. a MASNIYOM P. (2009): Isolation and identification of killer yeast from fermented Vegetables. *Asian Journal of Food and Agro-Industry*, 2, s.126-134.
- WOJCIK-KORDOWSKA M. a WIATER M. (2015): The occurrence of killer activity in yeasts isolated from natural habitats. *Acta Biochimica Polonica*, 62, 821-824.

**Korespondující autor:** Ing. Miloslava Kavková, Ph.D.  
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,  
160 00 Praha 6, e-mail: m.kavkova@vum-tabor.cz

Přijato do tisku: 23. 6. 2020  
Lektorováno: 5. 8. 2020

## SCREENING NA MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACI V SOLI A OCHUCUJÍCÍCH SLOŽKÁCH PRO MLÉČNÉ VÝROBKY

Irena Němečková, Šárka Havlíková, Jana Smolová,  
Ivana Hyršlová  
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Screening on microbial contaminants in salt  
and flavouring components for dairy products

### Abstrakt

Porozumění zdrojům a cestám šíření mikrobiální kontaminace ve výrobě mléčných výrobků je komplexní problém. Tato práce se zaměřuje na vybrané suroviny a složky, které jsou k mléčným meziproduktům přidávány. Zatímco tepelně ošetřené gelové ochucující

složky vyšly jako mikrobiologicky nerizikové, ionizujícím zářením ošetřené sušené bylinky a koření mohou být zdrojem plísní a enzymaticky aktivních termorezistentních mikroorganismů, např. rodu *Bacillus*. Bacily byly detekovány i v soli. Mořská sůl oproti soli kamenné navíc obsahovala i stafylokoky, kvasinky a další potenciálně rizikové mikroorganismy z organických nečistot. V kontextu podmínek výroby však lze tyto zdroje kontaminace považovat pouze za minoritní. Naproti tomu čerstvé bylinky mohou významně zhoršovat mikrobiologickou kvalitu a bezpečnost ochucených výrobků. Všechny testované vzorky čerstvých bylinek byly kontaminovány pestrou směsí mikroorganismů v celkové denzitě 5-10 log KTJ/g. Tuto mikrobiální kontaminaci se nepodařilo dostatečně snížit ani oplachem ve třech pracích vodách. Získané výsledky mohou napomoci při analýze mikrobiologických rizik ochucených mléčných výrobků a sýrů.

**Klíčová slova:** technologicky nežádoucí mikroorganismy; chlorid sodný; ovocné ochucující složky; ochucení bylinkami a kořením

## Abstract

The understanding of sources and pathways of microbial contamination in dairy production is a complex task. This work is focused on selected raw materials and components added to dairy semi-products. While heat-treated gelly flavouring components were microbiologically non-risky, ionizing-radiated dried herbs and spices can be a source of moulds or enzymatically active heat-resistant microorganisms, e.g. genera *Bacillus*. Bacilli were detected in salt, as well. Contrary to rock-salt, sea-salt also contained staphylococci, yeasts and other potentially hazardous microorganisms originating in organic impurities. However in the context of production conditions, these contamination sources can be considered as only minor. Contrary, fresh herbs can significantly deteriorate the microbiological quality and safety of flavoured products. All tested samples of fresh herbs were contaminated with varied microbial mixtures in the total density of 5-10 log CFU/g. Such a microbial contamination was unable to be lowered by even three washing waters. The obtained results could help in the analysis of microbial risks in flavoured dairy products and cheeses.

**Keywords:** technologically undesirable microorganisms; sodium chloride; fruit flavouring components; flavouring by herbs and spices

## Úvod

Mléko a mléčné výrobky mají bohaté nutriční složení podporující růst řady technologicky nežádoucích mikroorganismů a mikroorganismů způsobujících kažení. Proto je možným zdrojem kontaminace těmito mikroorganismy ve výrobě mléčných výrobků věnována zvýšená pozornost. Zdroje kontaminace lze rozdělit například na

kontaminaci ze surovin a z jiných zdrojů či na kontaminaci před a po tepelném ošetření.

Mikroorganismy syrového mléka jsou v závislosti na míře jejich rezistence vůči záhřevu určitou měrou inaktivovány během pasterace mléka. Z původní mikrobioty syrového mléka se v pasterovaném mléce vyskytují především sporotvorné bakterie rodu *Bacillus* a případně též *Clostridium* a z nich vyčleněné nové rody a dále v omezené míře i nesporotvorné bakterie mírně termorezistentních druhů, jako jsou např. nezákysové bakterie mléčného kvašení rodů *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus* a další rody bakterií. Tyto bakterie mohou spolu s mléčnými meziprodukty některými technologickými operacemi procházet a popř. se dostat až do finálních výrobků (Christiansen a kol., 2006; Němečková a kol., 2011; Banykó a Vyletěllová, 2009; Ortuzar a kol., 2018).

Naproti tomu otázka post-pasterační kontaminace je více komplexní – jak svým mikrobiálním složením, tak nejvýznamnějšími místy vstupu. Proto se na provozech provádí rozsáhlá pravidelná i akutní mikrobiologická kontrola výrobního procesu i prostředí, včetně kontroly účinnosti sanitace. Danou problematikou se zabývá i řada úžeji zaměřených výzkumných prací (Martin a kol., 2018; Rankin a kol., 2017; Fysun a kol., 2019; Reichler a kol., 2020).

Tato práce si klade za cíl posoudit míru rizika kontaminace technologicky nežádoucími mikroorganismy z vybraných zdrojů v aktuálních podmínkách výroby v ČR. Zaměřuje se na suroviny a složky s výjimkou mikrobiálních kultur a syřidel, které jsou k mléčným meziproductům přidávány a společně s nimi již neprochází dalším tepelným ošetřením. Zařazeny jsou jak suroviny či složky, které samy o sobě byly při své výrobě tepelně či jinak ošetřeny, tak suroviny proti nežádoucím mikroorganismům nijak neošetřené.

Modelovými výrobky pro daný úkol mohou být např. ochucené fermentované mléčné výrobky a afinované přírodní sýry. Jako sledované suroviny a složky byly vybrány tepelně ošetřené gelové ochucující složky, ionizujícím zářením ošetřené sušené bylinky a koření, neošetřené čerstvé bylinky a neošetřená sůl.

## Materiál a metody

### Mikrobiologická analýza vzorků

Ve spolupráci s výrobcí ochucených fermentovaných mléčných výrobků a sýrů byly odebrány vzorky vybraných surovin, složek a případně i fázových vzorků. Ze vzorků byl odebrán reprezentativní podíl 10 g, který byl zhomogenizován ve stomacheru s 90 ml fyziologického roztoku. Následovalo desítkové ředění a vyočkování na příslušné živné půdy. Ve vzorcích byly stanovovány tyto parametry:

- celkový počet mikroorganismů na půdě s glukózou, tryptonem a kvasničným extraktem (GTK) (MIL-COM a.s., CZ) po kultivaci při 30 °C po dobu 3 dnů,

- kvasinky a plísně na půdě s glukózou, kvasničným extraktem a chloramfenikolem (GKCH) (MILCOM a.s., CZ) po kultivaci při 25 °C po dobu 3-5 dnů,
- koliformní bakterie a *E. coli* na Chromogen-ní půdě (MILCOM a.s., CZ) po kultivaci při 37 °C po dobu 24 h,
- termorezistentní mikroorganismy po inaktivaci vzorků záhřevem při 85 °C po dobu 10 min na půdě GTK (MILCOM a.s., CZ) po kultivaci při 30 °C po dobu 3 dnů,
- halotolerantní mikroorganismy na půdě Mannitol-salt-phenol-red (Merck, G) po kultivaci při 30 °C po dobu 3 dnů.

Pro analýzu vzorků soli byl do půd GTK a GKCH přidán navíc sterilní zásobní roztok NaCl (35 % hm.) na výslednou koncentraci NaCl 2 g/100 ml půdy. S cílem zvýšit záchytnost u fázových vzorků nakládání se solí bylo 5 g tekutého vzorku resp. 5 g sypkého vzorku rozpuštěného ve fyziologickém roztoku analyzováno mikrobiologickou filtrací.

Vybrané kolonie byly vyizolovány, přečištěny na Brain-heart infusion (BHI) agaru (Merck, G) a předány na identifikaci metodou MALDI-TOF MS na Státní veterinární ústav v Jihlavě.

### Modelový experiment s oplachováním bylinek

Vzorek čerstvých bylinek byl šetrně promíchán, následně bylo odebráno 10 g bylinek a vloženo do sterilní vzorkovnice. Třikrát za sebou byl na tomtéž vzorku bylinek opakován tento postup: do vzorkovnice bylo přilito 90 ml sterilní destilované vody, ve které byly bylinky inetnzivně míchány a obráceny po dobu 5 minut, načež bylo těchto 90 ml vody slito a podrobena mikrobiologické analýze. Pak byly bylinky homogenizovány ve Stomacheru s 90 ml fyziologického roztoku a proveden byl mikrobiologický rozbor. Jako srovnávací vzorek bylo použito 10 g neopláchnutých bylinek zhomogenizovaných stejným způsobem jako bylinky opláchnuté.

## Výsledky a diskuze

### Mikrobiologická analýza ochucujících surovin, složek a soli

Odebrány byly vzorky čtyř sledovaných skupin surovin a složek. Výsledky analýz jsou shrnuty v tab. 1 až 4, ze kterých je patrné, že mezi jednotlivými skupinami existují typické rozdíly. Tyto rozdíly se jeví jako významnější než závislost mikrobiologických parametrů na konkrétním druhu suroviny. Antimikrobiální účinek silic obsažených v jednotlivých druzích bylinek a koření se ve výsledcích významnou měrou neprojevil pravděpodobně proto, že antimikrobiálně aktivní látky zůstaly uzavřeny uvnitř rostlinných buněk, zatímco mikroorganismy kontaminovaly povrch pletiv.

**Tab. 1** Průměrné výsledky mikrobiologického vyšetření (log KTJ/g) tepelně ošetřených gelových ochucujících složek (n = 2)

	Celkový počet mikroorganismů	Kvasinky	Plísně	Koli-formní bakterie	<i>E. coli</i>	Termorezistentní mikroorganismy
Borůvka	1,4	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Jahoda	< 1,3	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,3
Jahoda 2	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Meruňka	< 1,3	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,3
Meruňka 2	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Jablko se skořicí	1,4	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Víšně s čokoládou	< 1,3	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Mix citrusů	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Brusinka	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,3
Mango-marakuja	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,3
Vanilka přírodní	1,9	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,6

V tepelně ošetřených gelových ochucujících složkách (tab. 1) byly mikroorganismy zachyceny pouze sporadicky – a pokud ano, jednalo se většinou o sporotvorné termorezistentní bakterie, které odolaly tepelnému ošetření složek. Všechny vzorky splňovaly specifikace dodavatelů, které limitovaly celkový počet mikroorganismů na maximálně 2 log KTJ/g. Limity pro kvasinky a plísně byly v různých specifikacích definovány vzhledem k různým množstvím vzorku, avšak vždy negativní. A rovněž za podmínek této práce negativní vyšly. Z hlediska rizika kontaminace technologicky nežádoucími mikroorganismy se takovéto ochucující složky jeví jako nerizikové.

Ionizujícím zářením ošetřené sušené bylinky a koření (tab. 2) obsahovaly celkový počet mikroorganismů o několik řádů vyšší než gelové ochucující složky, avšak rovněž i v nich jednoznačně převažovaly termorezistentní mikroorganismy. A s výjimkou vzorku feferonek a pepře všechny sušené vzorky splňovaly specifikace dodavatelů. Jednotlivé specifikace pro dané složky se mezi sebou lišily. Souhrnně lze ale říci, že celkový počet mikroorganismů byl limitován nejvyšší hodnotou 5,7 log KTJ/g a pokud byl limitován některý z dalších sledovaných parametrů, tak hodnotou 3,0 log KTJ/g. Získané

**Tab. 2** Průměrné výsledky mikrobiologického vyšetření (log KTJ/g) ionizačním zářením ošetřených sušených bylinek a koření (n = 2)

	Celkový počet mikroorganismů	Kvasinky	Plísně	Koli-formní bakterie	<i>E. coli</i>	Termorezistentní mikroorganismy
Bylinkové máslo	4,1	1,8	< 1,3	< 1,0	< 1,0	3,9
Pažitka	3,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	2,8
Tzatziky	4,6	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	4,4
Gyros	5,4	< 1,0	< 1,0	< 1,3	< 1,0	5,2
Grilovací koření	4,1	< 1,0	< 1,3	< 1,0	< 1,0	3,8
Česnek granulovaný	5,4	< 1,0	< 1,3	< 1,0	< 1,0	5,1
Majoránka	1,5	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Pepř	3,4	< 1,0	4,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Feferonky	6,2	< 1,0	3,4	< 1,3	< 1,0	6,1
Feferonky 2	2,6	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0



**Tab. 3** Výsledky mikrobiologického vyšetření (log KTJ/g) neošetřených čerstvých bylinek (n = 1)

	Celkový počet mikroorganismů	Kvasinky	Plísně	Koli-formní bakterie	<i>E. coli</i>	Termorezistentní mikroorganismy
Rukola	6,1	3,7	< 3,0	< 1,0	< 1,0	2,7
Rukola 2	8,1	5,3	5,1	3,6	< 1,0	2,0
Medvědí česnek	7,0	5,0	3,7	< 1,0	< 1,0	2,0
Bazalka	6,0	5,9	4,7	4,0	2,0	< 1,0
Bazalka 2	6,5	< 3,0	4,1	1,8	< 1,0	3,0
Petržel kudrnka	9,6	6,9	5,2	8,6	5,2	2,4
Petržel hladkolistá	6,2	4,6	4,8	3,9	1,0	1,6
Kopr	6,6	4,3	4,2	5,3	1,0	1,3
Pažitka	5,0	< 3,0	< 3,0	4,3	< 3,0	2,9
Máta	5,2	5,0	4,1	4,0	1,0	2,5
Rozmarýn	7,2	4,4	4,3	2,6	< 2,0	4,2
Koriandr	6,3	4,7	3,7	6,0	4,0	3,1

**Tab. 4** Výsledky mikrobiologického vyšetření (log KTJ/g) neošetřené soli (n = 1)

	Celkový počet mikroorganismů	Kvasinky	Plísně	Halotolerantní mikroorganismy
Sůl kamenná	1,7	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Sůl mořská	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Sůl mořská 2	4,3	2,7	1,9	3,9
Sůl kamenná růžová	2,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Sůl kamenná černá	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0

výsledky ukazují, že je při vývoji výrobků ochucených sušenými bylinkami či kořením a při nastavení jejich doby spotřeby nutno počítat s vyšší mírou kontaminace potenciálně enzymaticky aktivními termorezistentními mikroorganismy. Kromě toho mohou být tyto složky kontaminovány i plísněmi, a proto je žádoucí důsledně dbát na jejich správné uskladnění v uzavřených obalech bez přístupu vlhkosti, aby se riziko růstu plísní minimalizovalo.

Oproti ošetřeným sušeným bylinkám se mikrobiota neošetřených čerstvých bylinek (tab. 3) ukázala jako svým složením pestřejší a kvantitativně hojnější. V některých vzorcích byly detekovány všechny sledované skupiny mikroorganismů. Nejvíce kontaminován byl vzorek petržele kudrnky, kde celkový počet mikroorganismů dosahoval dokonce 9,6 log KTJ/g, kvasinky 6,9 log KTJ/g, plísně 5,2 log KTJ/g, koliformní bakterie 8,6 log KTJ/g, *E. coli* 5,2 log KTJ/g a termorezistentní mikroorganismy 2,4 log KTJ/g. Takto masivní mikrobiální kontaminace čerstvých bylinek už může negativně ovlivňovat mikrobiologickou kvalitu a bezpečnost ochucených výrobků. Mikrobiální kontaminaci je možné ovlivnit, pokud se bylinky před použitím opláchnou. Těmto aspektům se věnují následující podkapitoly. Je žádoucí, aby i ochucené výrobky splňovaly mikrobiologická kritéria pro potraviny určené k přímé spotřebě uvedená v ČSN 56 9609 (2008). Mezní hodnoty

pro aerobní mezofilní mikroorganismy je 6,0 log KTJ/g, kvasinky 7,0 log KTJ/g, plísně 4,0 log KTJ/g a *E. coli* 4,0 log KTJ/g.

Výsledky mikrobiologického vyšetření neošetřené soli jsou shrnuty v tab. 4. Ve vzorcích kamenné soli dosahovala mikrobiální kontaminace nejvýše 2,0 log KTJ/g, přičemž izolované kmeny byly identifikovány jako *Bacillus* spp. Naproti tomu mořská sůl dosahovala vyšší úroveň kontaminace a detekovány byly různé mikrobiální druhy – *Staphylococcus haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. equorum*, *Bacillus mojavensis*, *Candida inconspicua*, *Paenibacillus pabuli*. Gelbíčová a Karpíšková (2019) zjistily v mořské soli pro solení sýrů dokonce výskyt meticilin rezistentního kmene *S. aureus*. Příčinou může být znečištění organickým materiálem (peří, prach, stébka rostlin) na makroskopické i mikroskopické úrovni. Výsledky dalšího šetření jsou uvedeny dále.

### Fázová kontrola použití potenciálně problematických surovin

Z výše uvedených výsledků vyplývá, že neošetřené čerstvé bylinky a mořská sůl by mohly představovat riziko kontaminace výroby technologicky nežádoucími mikroorganismy. Otázkou však je, jak tyto potenciálně problematické suroviny ve sledovaných provozech reálně ovlivňují další fáze výroby.

Makroskopické nečistoty se z mořské soli odstraňují pomocí sít. Následně se sůl rozpouští v dosolovací nádrži, odkud se potřebné množství přečerpává do solných lázní.

**Tab. 5** Fázová kontrola rozpouštění mořské soli pro přípravu solné lázně – průměrné výsledky (log KTJ/g) získané přepočtem po mikrobiologické filtraci 5 g vzorku (n = 2)

	Celkový počet mikroorganismů	Kvasinky	Plísně	Halotolerantní mikroorganismy
Sůl mořská originálně zabalená	0,1	neg.	neg.	neg.
Solný roztok v dosolovací nádrži	0,2	0,6	neg.	0,1

**Tab. 6** Fázová kontrola používání čerstvých bylinek – průměrné výsledky (log KTJ/g) mikrobiologické analýzy (n = 2)

	Celkový počet mikroorganismů	Kvasinky	Plísně	Koli-formní bakterie	<i>E. coli</i>	Termorezistentní mikroorganismy
Bylinky originálně zabalené	6,2	3,5	3,5	2,4	< 1,0	2,7
Bylinky po prvním oplachu	6,3	4,1	3,0	3,8	< 1,0	ND
Bylinky po druhém oplachu	7,2	4,2	3,3	4,6	< 1,0	ND
Čerstvý sýr ochucený	7,2	4,0	1,5	4,2	2,3	< 1,0
Čerstvý sýr neoouchený (kontrola)	5,2	2,1	< 1,0	1,3	< 1,0	< 1,0

V tab. 5 jsou výsledky fázové kontroly rozpouštění soli. Kvůli vyšší záchytnosti se jedná o výsledky mikrobiologické filtrace 5 g vzorku přepočtené na log KTJ/g. Denzita mikroorganismů v solném roztoku v dosolovací nádrži odráží průměrnou výši mikrobiální kontaminace v celé hmotě rozpouštěné soli a k tomu navíc případnou kontaminaci z biofilmů v nádrži a z prostředí. Z hodnot v tab. 5 je patrné, že se jedná o hodnoty velmi nízké, které jsou ve srovnání s mírou výskytu kontaminujících mikroorganismů v solných lázních zanedbatelné. Potenciální riziko použití mořské soli by však mohlo být v přítomnosti patogenních mikroorganismů, které mohou být nebezpečné i v nízkých dávkách. Při rozhodování, zda používat mořskou sůl, by proto měla být uvážena mikrobiologická rizikovost solného syra a faktory, které ovlivňují složení mikrobioty syra – mj. fyzikálně-chemické parametry syra a doba zrání, popř. tepelné ošetření syra.

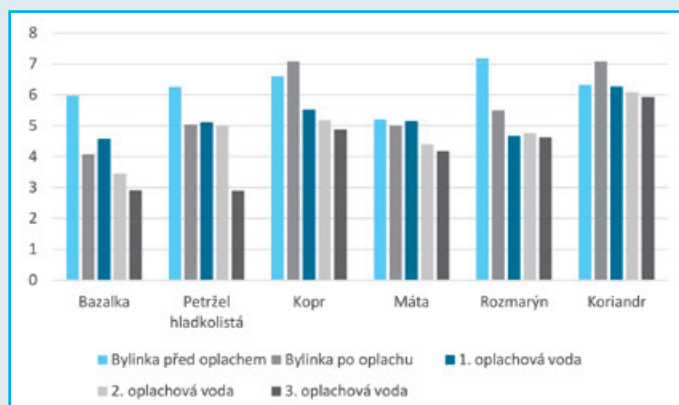
Čerstvé bylinky se oplachují ve dvou oplachovacích lázních s čistou pitnou vodou a poté se vmíchávají dovnitř hmoty čerstvého syra. Výsledky fázové kontroly, a rovněž porovnání s kontrolním neochuceným sýrem z těch samých šarží jako sýr ochucený, jsou shrnuty v tab. 6. Je vidět, jak přídavek čerstvých bylinek může zhoršit mikrobiologické parametry čerstvého syra od převažujících zákysových bakterií směrem k převaze mikroorganismů kontaminujících bylinky. Mikrobiologickou kvalitu čerstvých bylinek ani oplach ve dvou lázních nezlepšil, a dokonce by se mohlo zdát, že zhoršil. Vysvětlením zvyšujících se záchyťů v průběhu praní bylinek by mohlo být postupné rozvolňování shluků mikroorganismů ukrytých ve struktuře rostlinných pletiv, a tím i zvyšování počtu kolonie tvořících jednotek. Jiné vysvětlení může spočívat v nerovnoměrném rozložení mikrobiální kontaminace v rámci daného vzorku, které se nepodařilo eliminovat ani homogenizací vzorku, ze kterého byl následně odebrán alikvotní podíl pro analýzu. Problematice oplachu čerstvých bylinek je věnována následující podkapitola.

### Modelový experiment s oplachováním bylinek

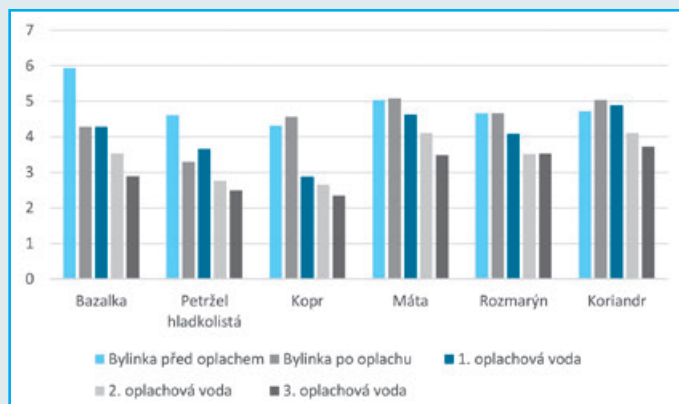
Změny mikrobiologických parametrů čerstvých bylinek při oplachování vodou za modelových podmínek jsou znázorněny na obr. 1 až 3. Z obrázků je dobře patrné, že při použití dalších oplachových vod postupně klesá množství mikroorganismů uvolněných z bylinek do oplachové vody. Přesto i ve třetí oplachové vodě byla denzita mikroorganismů nemalá. Z mikrobiologického hlediska by tedy mohlo být výhodné použít další oplachové vody, avšak přesto tento krok doporučit nelze, neboť se už při třetím oplachu začalo projevovat mechanické poškození rostlinných pletiv. Takto poškozené bylinky by nejen zhoršovaly vzhled ochucených sýrů, ale zejména by se staly náchylnými k mikrobiologickému a enzymatickému kažení.

Relativně vysoká denzita mikroorganismů ve všech třech oplachových vodách může znamenat, že oplachováním bylinek k (několika)řádkovému snížení mikrobiální kontaminace nedochází. Rozdíl v míře mikrobiální kontaminace bylinek na počátku a po třech oplacích v rozpětí pokles o dva řády až nárůst o jeden řád by pak mohl souviset s nerovnoměrnou distribucí mikroorganismů na povrchu bylinek. Přesto oplachování bylinek před použitím význam má, a to k odstranění případných hrubých mechanických nečistot a chemické kontaminace (např. agrochemikálie, polutanty z ovzduší, apod.).

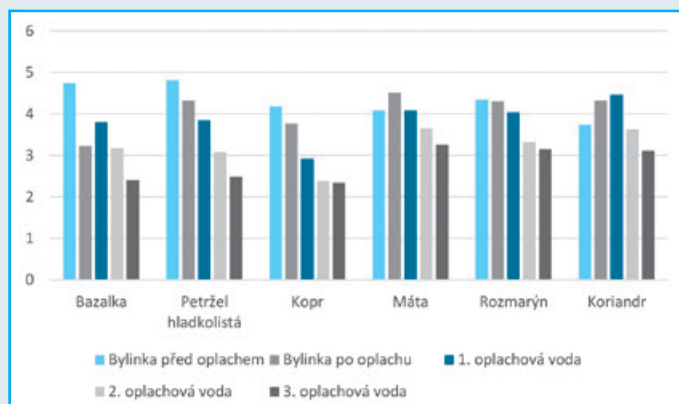
V této práci vyšel nejlépe vzorek bazalky, ve kterém mikrobiální kontaminace praním klesla a v jednotlivých oplachových vodách se postupně snižovala. Naopak



Obr. 1 Celkový počet mikroorganismů (log KTJ/g) během modelového oplachování bylinek



Obr. 2 Kvasinky (log KTJ/g) během modelového oplachování bylinek



Obr. 3 Plísňe (log KTJ/g) během modelového oplachování bylinek

nejhůře vyšly vzorky kopru a koriandru, u kterých byly jen malé rozdíly v celkovém počtu mikroorganismů a v počtu kvasinek a plísní v bylinkách před a po praní a také mezi jednotlivými oplachovými vodami. Souvislost mezi vlastnostmi bylinky (např. velikost listů, členitost povrchu, apod.) a účinností oplachu však shledána nebyla.

## Závěr

Provedeny byly odběry vybraných vzorků surovin a složek, které jsou k mléčných meziproductům přidávány a které společně s nimi tepelným ošetřením neprocházejí. Stanoveny v nich byly hlavní skupiny kontaminujících a technologicky nežádoucích mikroorganismů. Tepelně ošetřené gelové ochucující složky vyšly jako mikrobiologicky nerizikové. V případě použití sušených bylinek ošetřených ionizujícími zářeními by problémy mohly způsobovat kontaminace termorezistentními mikroorganismy. To v případě, pokud by se jednalo o enzymaticky vysoce aktivní kmeny a fyzikálně-chemické vlastnosti výrobku a podmínky jeho skladování by pomnožování těchto mikroorganismů umožňovaly. Nežádoucí mikroorganismy byly zachyceny i v neošetřené soli, přičemž vzorky mořské soli vyšly hůře než vzorky soli kamenné. Organická kontaminace mořské soli může být zdrojem nejen technologicky nežádoucích, ale i patogeních mikroorganismů, a proto by mořská sůl měla být používána pouze u výrobků mikrobiologicky nerizikových. V rámci sledovaného souboru nejrizikovější byly neošetřené čerstvé bylinky, které typicky obsahovaly pestré směs nežádoucích mikroorganismů, někdy i ve vysoké denzitě. Ani oplach ve třech vodách nebyl dostatečně spolehlivý pro snížení míry mikrobiální kontaminace, a tak opláchnuté čerstvé bylinky významně zhoršovaly mikrobiologickou kvalitu ochucených výrobků.

## Poděkování

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

## Literatura

- BANYKÓ J., VYLETĚLOVÁ M. (2009): Determining the sources of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Letters of Applied Microbiology*, 48, s. 318-323.
- ČSN 56 9609 (2008): Pravidla správné hygienické a výrobní praxe – Mikrobiologická kritéria pro potraviny – Principy stanovení a aplikace. Český normalizační institut.
- FYSUN O., KERN H., WILKE B., LANGOWSKI H.CH. (2019): Evaluation of factors influencing dairy biofilm formation in filling hoses of food-processing equipment. *Food and Bioprocess Technology*, 113, s. 39-48.
- GELBÍČOVÁ T., KARPIŠKOVÁ R. (2019): Kontrola výskytu a šíření *Staphylococcus aureus* v mlékárenských provozech. Dostupné online: [http://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/vysledky\\_projektu/syr-kval/03\\_w\\_syr-kval\\_s\\_aureus.pdf](http://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/vysledky_projektu/syr-kval/03_w_syr-kval_s_aureus.pdf)
- CHRISTIANSEN P., WAAGNER NIELSEN E., VOGENSEN F.K., BRAYEN C.H., ARDÖ Y. (2006): Heat resistance of *Lactobacillus paracasei* isolated from semi-hard cheese made of pasteurized milk. *International Dairy Journal*, 16, s. 1196-1204.

- MARTIN N.H., BOOR K.J., WIEDMANN N. (2018): Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality. *Journal of Dairy Science*, 101, s. 861-870.
- NĚMEČKOVÁ I., SCHMIDTOVÁ M., ROHACKÁ H., ROUBAL P., DRBOHLAV J. (2011): Metody stanovení a charakterizace termorezistentních mikroorganismů v mléce. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 125, s. I-IV.
- ORTUZAR J., MARTINEZ B., BIANCHINI CH., STRATTON J., RUPNOW J., WANG B. (2018): Quantifying changes in spore-forming bacteria contamination along the milk production chain from farm to packaged pasteurized milk using systematic review and meta-analysis. *Food Control*, 86, s. 319-331.
- RANKIN S.A., BRADLEY R.L., MILLER G., MILDENHALL K.B. (2017): A 100-year review: A century of dairy processing advancements – Pasteurization, cleaning and sanitation, and sanitary equipment design. *Journal of Dairy Science*, 100, s. 9903-9915.
- REICHLER S.J., MURPHY S.I., ERICKSON A.W., MARTIN N.H., SNYDER A.B., WIEDMANN M. (2020): Intervention designed to control post-pasteurization contamination in high-temperature, short-time-pasteurized fluid milk processing facilities: A case study on the effect of employee training, clean-in-place chemical modification, and preventive maintenance programs. *Journal of Dairy Science*, v tisku, dostupné na <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022030220304136>

**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: 30. 7. 2020

Lektorováno: 22. 9. 2020

## VÝSKYT METHICILIN A VANKOMYCIN REZISTENTNÍCH KMENŮ STAPHYLOCOCCUS AUREUS V SYROVÉM KRAVSKÉM MLÉCE

Marcela Klimešová<sup>1</sup>, Tereza Gelbíčová<sup>2</sup>,  
Renáta Karpíšková<sup>2</sup>, Miroslav Skřivánek<sup>3</sup>,  
Hana Nejeschlebová<sup>4</sup>, Ludmila Nejeschlebová<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Praha

<sup>2</sup> Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

<sup>3</sup> Mendelova univerzita v Brně, Agronomická fakulta

<sup>4</sup> Bentley Czech s.r.o., Praha

**Occurrence of methicillin and vancomycin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* in raw cow's milk**

### Abstrakt

Byla testována rezistence k vankomycinu, oxacilinu a cefoxitinu u bakteriálních kmenů *Staphylococcus aureus* izolovaných z kravského mléka v letech 2019 a 2020. Celkem bylo vyšetřeno 689 vzorků syrového kravského mléka ze 14 farem, z toho 630 individuálních a 59 bazénových vzorků. Jako *S. aureus* bylo identifikováno 96 kmenů (13,9 %), u kterých byl proveden test citlivosti k antibiotikům diskovou difúzní metodou. U rezistentních a intermediárních kmenů byla provedena metodou PCR