

Význam termorezistentných mikroorganizmov a metódy ich stanovenia

JARMILA PREKOPPOVÁ – JANA HAVLOVÁ – EVA JIČÍNSKÁ

Súhrn. V predloženej práci sa uvádzajú výsledky porovnávania živných médií na stanovenie termorezistentných mikroorganizmov v mlieku a mliečnych výrobkoch.

Z porovnávaných piatich agarových médií sa najlepšie osvedčil agar so siričitanom sodným a citranom železitým (SFA II), na ktorom rástli charakteristické čierne kolónie klostrií redukujúcich sulfít. Najmenej sa osvedčilo médium CSA, ktoré silne inhibovalo rast termorezistentných mikroorganizmov.

Zo skúmakových metód bola najvhodnejšia metóda s použitím tioglykolátového bujónu.

Surové mlieko a mliekárske výrobky bývajú okrem iných mikroorganizmov kontaminované aj sporulujúcimi mikroorganizmami, spóry ktorých sa vyskytujú vo veľkom množstve v prostredí prvovýroby, kde kontaminujú surové mlieko.

Výskyt sporulujúcich mikroorganizmov v surovom mlieku je o to vzácnejší, že tieto mikroorganizmy sa nedajú z mlieka odstrániť bežnými formami pasteurizácie. Prechádzajú s tepelne ošetrovanou surovinou do ďalšieho výrobného procesu a môžu sa rozmnožovať v medziproduktoch alebo vo finálnom výrobku. Okrem toho vegetatívne formy sporulujúcich mikroorganizmov môžu vylučovať do mlieka termostabilné proteázy a lipázy, ktoré sa nedajú inaktivovať pasteurizačnou teplotou [1]. Medzi psychrotrofné termorezistentné baktérie zaraďuje Collins [2] okrem iných aj baktérie z rodu *Clostridium*; pravdepodobne sú variantmi mezofilných mikroorganizmov, ktoré sa adaptovali na nižšie teploty. Z hygienického hľadiska je závažné aj to, že medzi bežnými sporulujúcimi kontaminantmi surového mlieka sa môžu vyskytovať i podmienene patogénne druhy (napr. *Cl. perfringens*).

Ing. Jarmila Prekopková, CSc., Výskumný ústav mliekárenský, Rajecká cesta, 010 01 Žilina.

Ing. Jana Havlová, RNDr. Eva Jičínská, CSc., Výskumný ústav mliekárenský, Jindřišská 5, 110 00 Praha 1.

Z technologického hľadiska sú sporulujúce mikroorganizmy nežiadúce najmä v mlieku, ktoré sa používa na výrobu tvrdých syrov, kde spôsobujú obávanú chybu, neskoré nadúvanie, ako aj v mlieku používanom na výrobu niektorých náročnejších mliečnych výrobkov (napr. kondenzované mlieko).

V súčasnosti sa stanovenie termorezistentných baktérií robí v mliekárskych laboratóriách iba pri cielených rozboroch, spravidla pri zisťovaní príčin chýb v akosti výrobkov. Na to sa používa Weinzirlova skúška, pri ktorej sa vzorka kultivuje v sterilnom odstredenom mlieku prevrstvenom parafínom. Výhodou Weinzirlovej skúšky je, že je to metóda pomnožovacia, a preto záchytnejšia ako výsev na agarové pôdy, čo je výhodné najmä pri vzorkách s nízkym počtom mirkóbov alebo s poškodenými mikroorganizmami. Okrem toho je metóda technicky nenáročná.

Nevýhodnou tejto metódy je, že mlieko nemožno spoľahlivo vysterilizovať bez toho, aby nedošlo k silnej Maillardovej reakcii, tvorbe inhibičných látok a tým i k možnosti falošne negatívnych výsledkov, kým nedostatočne vysterilizované mlieko dáva zas falošne pozitívne výsledky.

Na stanovenie termorezistentných baktérií predpisuje ČSN 56 0100 metódu najpravdepodobnejšieho počtu s použitím želatínového agaru s glukózou prevrstveného parafínom. Kultivácia termorezistentných mikroorganizmov na agarových selektívnych médiách v anaerostatoch sa prakticky nepoužíva, hoci je výhodná najmä pri tých cielených rozboroch, keď treba mikroorganizmy izolovať a bližšie identifikovať.

Pretože stanovenie počtu a prítomnosti termorezistentných mikroorganizmov vyžaduje špeciálne vybavenie mikrobiologických laboratórií, toto stanovenie sa v praxi takmer nerobí. Predmetom tejto práce bolo nájsť podľa možnosti jednoduchú metódu na stanovenie termorezistentných mikroorganizmov, vhodnú na rutinné rozbor, ktorú by bolo možné používať v mliekárskych i poľnohospodárskych laboratóriách.

Materiál a metóda

Na stanovenie termorezistentných mikroorganizmov sa okrem pôdy odporúčanej ČSN a Weinzirlovej skúšky použili živné médiá odporúčané viacerými autormi.

Vzorky mliekárskych výrobkov sa odoberali z obchodnej siete, vzorky surového mlieka zo závodu Laktos Radlice. Vzorky surového mlieka sa dopravovali do laboratória v chladenom boxe a spracovali sa najneskôr do 3 hodín po odbere.

Inaktivácia vzoriek. Surové mlieko, obnovené sušené mliečne výrobky a su-

spenzia mliečnych výrobkov sa inaktivovali 10 minút vo vodnom kúpeli pri 85 °C, vychladili v studenej vode a vhodné riedenia sa naočkovali do tekutých alebo agarových médií teploty 45 ± 1 °C.

Príprava a zloženie kultivačných médií. Zloženie jednotlivých médií sa uvádza v g.l⁻¹.

Agar na stanovenie klostrídií (Reinforced Clostridium Medium, RCM, Hirsch a Grinstead [3]): kvasničný extrakt, 3; mäsový extrakt, 10; peptón, 5; škrob, 1; glukóza, 5; L(+)-cysteín, 0,5; chlorid sodný, 5; octan sodný, 3; agar, 15.

Selektívny agar na stanovenie klostrídií (Clostridium Selective Agar, US Pharmacopoeia, CSA [4]): kyslý hydrolyzát kazeínu, 17; sójový peptón, 3; glukóza, 6; tioglykolát sodný, 1,8; chlorid sodný, 2,5; L(-)-cystín, 0,25; neomycínsulfát, 0,5; azid sodný, 0,2; agar, 12.

Agar so siričitanom sodným a citranom železitým (IHE, Návrh štandardnej metódy, 1982, značenie SFA I a SFA II [5]). SFA I: trypton, 10; siričitan sodný, 0,6; citran železitý, 0,5; agar, 12. SFA II: enzymatický hydrolyzát kazeínu, 15; sójový peptén, 5; kvasničný autolyzát, 1; citran železito-amónny, 1; siričitan sodný, 1; agar, 20.

Príprava agarových pôd. Komponenty sa rozmiešajú v 1000 ml destilovanej vody a rozvaria do úplného rozpustenia všetkých zložiek. pri agarových pôdach RCM, CSA a SFA I sa pH upraví na hodnotu 7,0–7,1 (po vychladení), pri SFA II na 7,6. Sterilizácia 15 minút pri 121 °C. K agarom SFA I a SFA II sa pred použitím pridá 1 ml 4 % vodného roztoku D-cykloserínu (sterilizovaného filtráciou) na 100 ml pôdy.

Mäsopeptónový agar s laktózou (MPAL) (podľa ČSN 56 0100 6).

Tioglykolátový bujón TB (US Pharmacopoesia [4]): sójový peptón, 15; kvasničný autolyzát, 5; glukóza, 5; chlorid sodný, 2,5; tioglykolát sodný, 0,5. Zložky sa rozpustia v 1000 ml destilovanej vody, pH sa upraví na 7,0–7,1. Bujón sa naplní do skúmaviek po 10 ml a sterilizuje sa 3 dni za sebou 15 minút pri 100 °C.

Želatínový agar s glukózou (podľa ČSN 56 0100 [6]).

Odstredené mlieko na Weinzirlovu skúšku: sušené odstredené mlieko 100 g, destilovaná voda 900 ml. Obnovené mlieko rozplnené do skúmaviek po 10 ml sa sterilizovalo frakcionovane 3 dni za sebou 10 minút pri 100 °C.

Ako anaeróbny uzáver pre médiá v skúmavkách (tioglykolátový bujón, želatínový agar, sterilné mlieko) sa používal parafín v dvojcentrimetrovej vrstve.

Inkubácia Petriho misiek sa robila v anaerostate tuzemskej výroby (Vývojové pracovisko SVÚ Brno) (obr. 1). Na odstránenie vzdušného kyslíka a na kontrolu anaeróbných podmienok sa používali preparáty Anaerocult (Merck).

Inkubačné podmienky: 48 hodín pri $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

Vyhodnotenie výsledkov. Na Petriho miskách sa počítali narastené typické kolónie, ktoré sa prepočítali podľa použitého riedenia na 1 g alebo 1 ml vyšetrenej vzorky. Pri použití skúmavkových metód sa za pozitívne považovali tie skúmavky, v ktorých bola vytlačená parafínová zátka, prípadne potrhaná alebo zakalená živná pôda. Pravdepodobný počet mikroorganizmov sa vypočítal podľa McCradyho tabuľky 5 (ČSN 56 0100).

Štatistické hodnotenie rozdielov počtov mikroorganizmov stanovených rôznymi metódami sa robilo Wilcoxonovým neparametrickým testom pre prárované hodnoty a *D*-testom [7].



Obr. 1. Anaerostat (Vývojové pracovisko SVÚ Brno).
Fig. 1. Anaerostat (Evolutionary Working-Place Brno).

Výsledky a diskusia

Napriek značnému úsiliu, ktoré sa venovalo výskumu technologických postupov na inaktiváciu spór v mlieku, nedosiahli sa v tomto smere uspokojivé výsledky a spóry v mlieku a mliečnych výrobkoch stále zostávajú problémom.

Zlepšenie akosti surového mlieka v tomto ukazovateli závisí predovšetkým od hygienických podmienok a úrovne sanitácie pri získavaní a uchovávaní mlieka v prvovýrobe.

Naše výsledky, získané rozborom malých sérií troch skupín mliečnych výrobkov (surové mlieko, syry, sušené mliečne výrobky), ukazujú veľmi nepriaznivé počty termorezistentných mikroorganizmov (tab. 1). Vo veľkom percente vzoriek sa zistili aj anaeróbne mikroorganizmy redukujúce sulfít (podmienene patogénne).

Tabuľka 1. Rast termorezistentných mikroorganizmov na selektívnych médiách
Table 1. The growth of thermoresistant microorganisms on selective media

Médium ¹	n	Počet ² .g ⁻¹ (ml ⁻¹)					
		surové mlieko ³		syry ⁴		suš. mlieč. výrobky	
		max.	min.	max.	min.	max.	min.
želatínový agar (ČSN) ⁶	30	1,1×10 ⁴	2,5×10 ²	1,1×10 ⁵	0	1,1×10 ⁵	0
RCM	30	2,6×10 ⁴	1,3×10 ²	4,4×10 ⁴	6,0×10 ¹	4,0×10 ³	0
SFA I	30	6,8×10 ³	1,1×10 ²	3,4×10 ⁴	1,0×10 ¹	5,8×10 ³	0
SFA II	30	9,1×10 ³	1,9×10 ²	2,4×10 ⁴	1,4×10 ²	6,9×10 ³	0
MPL	30	3,4×10 ³	2,2×10 ²	3,8×10 ⁴	1,0×10 ²	4,4×10 ³	0
TB	30	1,3×10 ³	2,5×10 ²	1,1×10 ⁵	0	7,0×10 ⁴	0

¹Culture medium; ²Number; ³Raw milk; ⁴Cheeses; ⁵Dried milk products; ⁶Gelatinous agar (according to Czechoslovak Standard).

Z porovnávaných piatich agarových médií sa najlepšie osvedčil agar SFA II, na ktorom sa vytvárali charakteristické čierne kolónie klostrídií redukujúcich sulfít. Uvedené mikroorganizmy rástli dobre aj na agare SFA I, ale kolónie neboli typicky zafarbené. Médium RCM umožňuje aj dobrý rast termorezistentných mikroorganizmov, podporuje však plazivý rast na povrchu agaru a potlačuje tvorbu plynu. To je nevýhodné pri silnejšie zakalených vzorkách (väčšina mliečnych výrobkov pri použitých nižších riedeniach je silne zakalená), kde tvorba plynu často uľahčuje detekciu kolónií a môže byť dôležitá aj z diagnostických dôvodov.

Hoci mäsopeptónový agar s laktózou je neselektívne médium, nevykazoval väčšiu záchytnosť ako selektívne médiá SFA I a SFA II.

Z testovaných médií sa najmenej osvedčilo médium CSA, ktoré silne inhibovalo rast termorezistentných mikroorganizmov. Ak na tomto médiu mikroorganizmy rástli, tvorili často mikrokolónie zo silne deformovaných buniek.

Vzájomné štatistické porovnanie štyroch použitých agarových médií (CSA

nebolo do porovnania zahrnuté) ukázalo významne nižšiu záchytnosť (na hladine významnosti 0,05) iba pri agare SFA I v porovnaní s RCM, ostatné médiá boli vzájomne rovnocenné (tab. 2).

Tabuľka 2. Štatistické porovnanie výsledkov inkubácie termorezistentných mikroorganizmov na selektívnych agarových pôdach

Table 2. Statistical result comparison of an incubation of thermoresistant microorganisms on selective agar substrates

Porovnávané médiá ¹	Vypočítaná hodnota testovacieho kritéria D^2	Významnosť rozdielov ³	
		0,05	0,01
RCM/SFA I	11	+	–
RCM/SFA II	7	–	–
RCM/MPL	6	–	–
SFA I/MPL	5	–	–
SFA II/MPL	2	–	–
SFA I/SFA II	4	–	–

¹Compared media; ²Calculated value of the testing criterium D ; ³Importance of differences.

Tabuľka 3. Štatistické porovnanie výsledkov inkubácie termorezistentných mikroorganizmov metódou podľa ČSN a inými metódami

Table 3. Statistical result comparison of an incubation of thermoresistant microorganisms using the method according to Czechoslovak Standard, as well as other methods

Metóda porovnávaná s metódou podľa ČSN ¹	Vypočítaná hodnota testovacieho kritéria D^2	Významnosť rozdielov ³	
		0,05	0,01
RCM agar	4	–	–
SFA I agar	11	–	–
SFA II agar	7	–	–
MPL agar	6	–	–
tioglykolátový bujón ⁴	3	–	–

Metóda podľa ČSN: želatínový agar.

Method according to Czechoslovak Standard: gelatinous agar.

¹Method compared with method according to Czechoslovak Standard; ²Calculated value of testing criterium D ; ³Importance of differences; ⁴Thioglycolate culture medium.

Ani porovnanie počtov termorezistentných mikroorganizmov, zisťovaných metódou najpravdepodobnejšieho počtu na želatínovom agare a v tioglykolátovom bujóne, s počtami zisťovanými platňovou metódou na agarových médiách neukázalo štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými metódami (tab. 3).

V porovnaní s tioglykolátovým bujónom vykazovala Weinzirlova skúška falošne pozitívne i falošne negatívne výsledky (tab. 4). Falošne negatívne výsledky môžu byť pravdepodobne spôsobené tým, že mnohé druhy klostrídií (napr. *Clostridium fallax*, *Cl. pasteurianum*, *Cl. sporogenes*, *Cl. difficile*, *Cl. botulinum*, *Cl. propionicum*) nemia alebo aspoň neskladujú laktózu, a preto nie sú touto skúškou detegované. Falošne pozitívne výsledky môžu byť spôsobené niekedy vysoko rezistentnými spórmi, ktoré prípadne prežijú v mlieku použitom na skúšku.

Tabuľka 4. Porovnanie výsledkov zistených Weinzirlovou skúškou a v tioglykolátovom bujóne pri sušených mliečnych výrobkoch

Table 4. The comparison of results determined using Weinzirl's test and in thioglycolate medium of dried milk products

Živné médium ¹	n	Percento ²		
		pozitívnych vzoriek ³	falošne pozitívnych vzoriek ⁴	falošne negatívnych vzoriek ⁵
tioglykolátový bujón ⁶	64	21,9	0	0
Weinzirlova skúška ⁷	64	12,5	3,1	9,4

¹Substrate; ²Percentage; ³Positive samples; ⁴Apparent positive samples; ⁵Apparent negative samples; ⁶Thioglycolate culture medium; ⁷Weinzirl's test.

Podľa našich výsledkov možno namiesto metódy ČSN používať na rutinné i ciele rozborov na prítomnosť a počet termorezistentných mikroorganizmov rastúcich za anaeróbných podmienok stanovenie počtu na agare SFA II alebo stanovenie najpravdepodobnejšieho počtu v tioglykolátovom bujóne. Uvedené metódy dávajú rovnocenné výsledky a v porovnaní s metódou ČSN majú určité výhody, a to: médium SFA II umožňuje aj stanovenie podmienene patogénnych klostrídií, ktorých prítomnosť, prípadne počet bude pravdepodobne limitovaný pri mnohých mliekárskych výrobkoch pripravovanou hygienickou smernicou pre mikrobiologické hodnotenie potravín. Prítomnosť týchto mikroorganizmov môže byť dôležitá aj pri výrobkoch určených na export.

Príprava tioglykolátového bujónu a manipulácia s ním je jednoduchšia ako so želatínovým agarom, ktorý je veľmi hustý, zakalený, zle sa rozpúšťa a rýchle tuhne.

Aj pre jednotlivé orientačné rozborov by bolo výhodné nahradiť Weinzirlovu skúšku stanovením v tioglykolátovom bujóne. Ako pomnožovacie médium má tioglykolátový bujón rovnaké výhody ako sterilné mlieko, ale nemá jeho nevýhody.

Predložená práca ukázala aj to, že rutinné a cielené rozborы mlieka a mliečnych výrobkov na prítomnosť a počet termorezistentných mikroorganizmov možno urobiť za použitia pomerne jednoduchých médií, zariadenia a metód dostupných pre bežne vybavené mliekárské i poľnohospodárske laboratóriá. Prácu by veľmi uľahčilo, keby výrobcovia mikrobiologických médií zaviedli na trh sušené médiá typu SFA II a tioglykolátového bujónu a vhodne volenú reakčnú zmes a indikátor typu Anaerocult.

Literatúra

- [1] ADAMS, D.M. – BARACH, J.T. – SPECK, M.L., Heat-resistant proteases produced in milk by psychotropic bacteria of dairy origin. *J. Dairy Sci.* 58, 1975, s. 828–834.
- [2] COLLINS, E.B. *J. Dairy Sci.*, 64, 1981, s. 157.
- [3] HIRSCH, A. – GRINSTED, E., *J. Dairy Res.*, 21, 1954, s. 101.
- [4] United States Pharmacopoeia: Microbial limit tests. Culture media for sterility tests. 2nd Rev. Natl. Inst. Health Circular, 18, 1970.
- [5] Návrh standardní kultivační metody. Stanovení počtu mezofilních klostridií redukujících sulfity plotnovou metodou. Praha, Institut hygieny a epidemiologie 1982.
- [6] ČSN 56 0100: Mikrobiologické zkoušení poživatin, předmětů běžného užívání a prostředí potravinářských provozů. 1979.
- [7] REISENAUER, R.: Metody matematické statistiky a jejich aplikace v technice. Praha, SNTL 1970.

Значение термостойких микроорганизмов и методы их определения

Резюме

В предлагаемой работе приводятся результаты сравнения питательных сред для определения термостойких микроорганизмов в молоке и молочных продуктах.

Из сравниваемых пяти агарных сред лучше всех проявился агар с сульфитом натрия и лимонитом железа (SFA II), на котором возрастали характерные черные колонии клостридий редуцирующих сульфит. Хуже всех проявился medium CSA, который сильно тормозил рост термостойких микроорганизмов.

Среди методов использующих пробирки лучше всех оказался метод использующий тиогликольный бульон.

Importance of thermoresistant microorganisms and methods of their determination

Summary

The comparison results of substrates for the determination of thermoresistant microorganisms in milk and milk products are described in this paper. Agar comprising sodium sulfite and ferric citrates (SFA II) was the best culture medium from 5 compared agar media. The typical black colonies of sulfite-reducing clostridia grew on this medium. The CSA (Closbudium selective agar) medium was the worst one. It highly inhibited the growth of sporulating anaerobic microorganisms.

The method using the thioglycolate culture medium was the best of test tube methods.