

Predikcia trvanlivosti pasterizovaného mlieka z hľadiska rastu *Bacillus cereus* pri $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$

MÁRIA GREIFOVÁ - LUBOMÍR VALÍK
- FRIDRICH GÖRNER - JANA PETRÍKOVÁ

SÚHRN. *Bacillus cereus* je ubikvitárny mikroorganizmus. Niektoré kmene však môžu spôsobiť alimentárne otravy, ak sú prítomné v pasterizovanom mlieku v množstvách nad 10^5 KTJ.ml⁻¹. V čerstvom pasterizovanom mlieku (74°C , 20 s) boli v jarých mesiacoch stanovené koncentrácie 0,5 až 1,0 KTJ.ml⁻¹. Z jednej výroby pasterizovaného mlieka sa izolovali psychrotrófnе kmene *B. cereus*, ktoré dobre rástli pri $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$ s generačnými časmi v log-fáze rastu 26 až 28 dní. Metódou predikcie sa vypočítalo, že tieto kmene v mlieku pri teplote $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$ dosiahnu limity 10^4 KTJ.ml⁻¹ alebo 10^5 KTJ.ml⁻¹ za 15,3 až 20,7 dní. Pasterizované mlieko uchovávané pri tejto teplote nebolo z pohľadu psychrotrófnych *B. cereus* rizikové.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: *Bacillus cereus*; pasterizované mlieko; generačný čas; prediktívna mikrobiológia

Bacillus cereus je mikroorganizmus, ktorý sa v dôsledku svojej aeróbnosti a schopnosti tvoriť spóry nachádza v pôde, v prachu, vo vode a v surových, alebo aj v požívatinách upravených teplotne pasterizáciou, či varením. Za vhodných podmienok môžu jeho určité kmene v požívatinách tvoriť dva druhy toxických metabolitov. Toxín spôsobujúci prevažne hnačku je proteín s vysokou molekulovou hmotnosťou a toxín spôsobujúci prevažne zvracanie je nízkomolekulový termorezistentný peptid [1-3].

B. cereus v suchých požívatinách vyrobených na báze škrobu, v sušených vajciach, na lúpanej ryži, v sušených mliekach, v mletých a v celých koreninách u nás nachádzali Piecková a Tomanová [4]. Stanovený obsah *B. cereus* v týchto požívatinách sa pohyboval v rozmedzí 10^2 až 10^3 KTJ.g⁻¹.

Technologickým významom *B. cereus* v mliekarenskej technológii sa u nás zaoberali Greifová a kol. [5]. Zistili, že keď sa pri výrobe miešaných jogurtov

Ing. Mária GREIFOVÁ, Ing. Lubomír VALÍK, PhD., Prof. Ing. Dr. Fridrich GÖRNER, DrSc.,
Ing. Jana PETRÍKOVÁ, Katedra mlieka, tukov a hygieny požívatín, Chemickotechnologická
fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

dostalo do mlieka viac ako 4 mg kyslíka na kg a východzie mlieko obsahovalo nadmerné množstvo aeróbných spór *B. cereus*, spôsobil tento mikroorganizmus v jogurte poruchy konzistencie a jeho chuťových vlastností.

Na schopnosti *B. cereus* tvoriť toxíny a na súčasnú psychrotrofnosť príslušných kmeňov upozornila u nás Kušnierová [6]. Popísala alimentárnu otravu spôsobenú *B. cereus* v pasterizovanom a prevarenom mlieku, pri ktorej ochorelo 247 stravníkov jedného stredoškolského internátu, čo sa prejavilo hnačkami a žalúdočnými kŕčmi trvajúcimi do dvoch dní. Ochoreli iba tí stravníci, ktorí po hlavných jedlách pili mlieko. Epidemiologickým vyšetrením bolo zistené, že otrava bola spôsobená pasterizovaným mliekom, do ktorého bol pridaný zvyšok prevareného pasterizovaného mlieka uchovávaného tri dni v chladničke (zo soboty do pondelka). Toto zmiešané mlieko obsahovalo *B. cereus* vo vysokom množstve $1,4 \cdot 10^7$ až $1,9 \cdot 10^7$ KTJ.ml⁻¹. Významnú úlohu tu zohrali s najväčšou pravdepodobnosťou toxínogénne psychrotrofne kmene *B. cereus*.

V súvislosti s psychrotrofnosťou a toxinogenitou niektorých kmeňov *B. cereus* sa v súčasnosti vynára podobný problém, ktorý súvisí so snahou predĺžovať trvanlivosť pasterizovaného konzumného mlieka z pôvodných troch dní na päť až sedem a v budúcnosti snád aj na viac dní [7].

V tejto súvislosti sme si položili nasledovné otázky, resp. ciele:

1. Aké množstvo psychrotrofných kmeňov *B. cereus* sa nachádza v určitom priemyselne vyrábanom pasterizovanom mlieku?
2. Či a ako sa psychrotrofne kmene *B. cereus* rozmnožujú v komerčne pasterizovanom mlieku pri teplote uchovávania $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$?
3. Pomocou metód prediktívnej mikrobiológie bolo naším cieľom predpovedať rozmnoženie *B. cereus* v pasterizovanom mlieku pri $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$ za päť dní a predpovedať, za aký čas by sa v tomto pasterizovanom mlieku za rovnakých podmienok rozmnožili psychrotrofne kmene *B. cereus* na medzinárodne uznávanú rizikovú hranicu 10^4 až 10^5 KTJ.ml⁻¹. Zámerne sme pritom zvolili konštantnú teplotu uchovávania pasterizovaného mlieka $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$, aby sme získali porovnávacie hodnoty s ohľadom na nedodržanie tejto teploty uchovávania.

Materiál a metódy

Surové mlieko zvezené z poľnohospodárskych závodov v mesiacoch február a marec bolo v mliekarenskom závode prietokovo pasterizované pri 74°C počas 20 s, vychladené na 4 až 2°C a prechodne uchovávané v zásobnom tanku. Z neho bolo prečerpávané do plniaceho a baliaceho stro-

ja a v ňom balené po 1 litri do obalov Tetrabrik. Zabalené pasterizované mlieko bolo ihneď prenesené do laboratória, kde bolo uchovávané v chladiacom boxe pri konštantnej teplote $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$ 24 dní.

Vzorky na mikrobiologické vyšetrenia boli z tohto mlieka odoberané z troch paralelných obalov asepticky pomocou sterilnej injekčnej striekačky v trojdňových intervaloch v množstve naraz asi 20 ml.

Pasterizované mlieko bolo mikrobiologicky vyšetrované na obsah *B. cereus* podľa STN 56 0092 (ISO 7932) „Všeobecné pokyny na stanovenie počtu baktérií *Bacillus cereus*“ na žltkovom agare s manitolom a polymyxínom [8].

Všetky vyšetrenia sa vykonali z pasterizovaného mlieka uchovávaného pri $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$, preto získané výsledky udávajú počty *B. cereus* rastúcich v pasterizovanom mlieku pri teplote $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$ za viac dní, čiže psychrotrófnych.

Pre početne malý výskyt *B. cereus* v čerstvom pasterizovanom mlieku, ktorý sa pohyboval v jednotkách KTJ v 10 ml mlieka sme nemohli pokračovať zriedovacou metódou. Očkovali sme preto na selektívne kultivačné médium [8] v Petriho miskách (PM) 25-krát po 0,4 ml na jednu PM. Na týchto PM so selektívnym agarom sme spočítali vyrastené typické kolónie a udávali ako n KTJ/10 ml alebo po prepočítaní ako n KTJ.ml⁻¹. Na každej PM sme u typických kolónií (v počte \sqrt{n}) kontrolovali ich schopnosť anaeróbne rásť a fermentovať glukózu, tvoriť acetoín vo Voges-Proskauerovom médiu a redukovať dusičnan v dusičnanovom médiu [8].

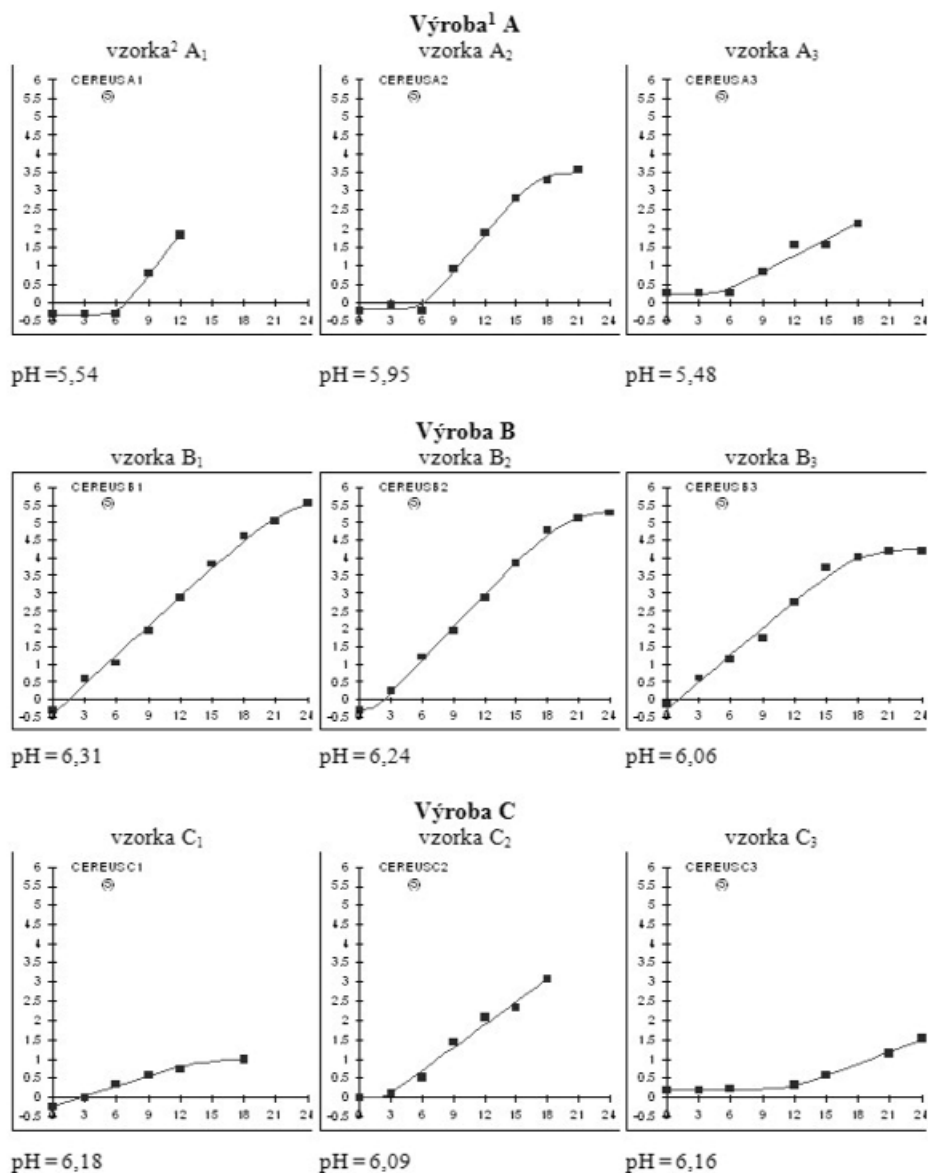
Pre získanie hodnoverných výsledkov boli vyšetrovaniu podrobené tri odlišné výroby pasterizovaného mlieka v dvoj- a trojdňovom odstupe (A, B a C). Z jednej výroby boli odobrané vždy tri jednolitrové balenia vychádzajúce za sebou z baliaceho stroja. Takto boli získané z každej výroby tri paralelné vzorky, ktoré sme označili: A₁, A₂, A₃, B₁, B₂, B₃, C₁, C₂ a C₃.

Získané mikrobiologické výsledky sme usporiadali do tabuliek, graficky znázornili a podrobili matematickej analýze podľa programu D-model [9-11]. Na konci vyšetrovania sme v každej vzorke pasterizovaného mlieka stanovili hodnotu pH potenciometricky.

Výsledky a diskusia

B. cereus v pasterizovanom mlieku a jeho rast pri $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$

Obsah a rast *B. cereus* v pasterizovanom mlieku (74°C , 20 s), ktoré bolo uchovávané 24 dní pri $(5 \pm 1)^\circ\text{C}$, je znázornený na obr. 1. Z tohoto vyobrazenia je vidieť, že počiatočný obsah tohoto mikroorganizmu v pasterizovanom mlieku sa pohyboval v rozmedzí 0,5 až 1,0 KTJ.ml⁻¹. Ďalej je vidieť, že vo vzorkách z jednotlivých výrob, ba ani vo vzorkách z totožnej výroby, nebol



OBR. 1. Dynamika obsahu *B. cereus* v pasteurizovanom mlieku (74 °C, 20 s), uchovávanom pri (5±1) °C počas 24 dní (os x = čas [d], os y = [log KTJ.ml⁻¹]).

FIG. 1. Dynamics of the *B. cereus* content in pasteurized milk (74 °C, 20 s) stored at (5±1) °C for 24 days (axis x = time [d], axis y = [log CFU.ml⁻¹]).
1 - production, 2 - sample.

kvalitatívny obraz rastu kmeňov *B. cereus* rovnaký. Poskytovali síce rovnakú odpoveď pri skúmaní charakteristických biochemických znakov podľa STN 56 0092 (ISO 7932), ale neboli rovnaké z hľadiska ich psychrotrófnosti. Právě psychrotrófnе kmene sa nachádzali prevažne vo vzorkách výroby B (B₁, B₂ a B₃). Rozmnožovali sa prakticky bez lag-fázy, exponenciálna fáza rastu mala veľmi podobnú smernicu a ich stacionárna fáza započala asi pri 10⁴ KTJ.ml⁻¹ a dosahovala až 10^{5,5} KTJ.ml⁻¹, a to za 18 až 24 dní.

Tento pokus dokázal, že psychrotrófnе kmene *B. cereus* sa nenachádzajú rovnako v každom pasterizovanom mlieku. Je to aj z matematicko-štatistického pohľadu pravdepodobné, lebo čím menej je určitých mikroorganizmovov v prostredí prítomných, tým je homogenita ich výskytu menšia [12]. Podľa Mayra a kol. [13] bolo v pasterizovanom mlieku 0,005 % až 0,075 % psychrotrófnych kmeňov *B. cereus*, vzhľadom na celkový počet mikroorganizmov v ňom.

Analýza rastových parametrov psychrotrófnych kmeňov B. cereus pri (5±1) °C

Z troch výrob pasterizovaného mlieka bola vybraná výroba B, z ktorej boli izolované psychrotrófnе kmene *B. cereus*. V tab. 1 sú zhrnuté charakteristické parametre týchto kmeňov. Zaujímavé je, že tieto kmene mali pri teplote (5±1) °C veľmi krátku lag-fázu. Jej hodnoty buď neboli v intervale 3 dní vôbec zaznamenané (B₁ a B₃), alebo bola iba naznačená v trvaní 1,4 d (B₂). Kmene *B. cereus* z ostatných výrob vykazovali lag-fázu významne dlhšiu,

TABUĽKA 1. Rastové parametre psychrotrófnych kmeňov *B. cereus* z pasterizovaného mlieka (74 °C, 20 s), uchovávaného 24 d pri (5±1) °C a predikcia počtu dní na dosiahnutie kritických hodnôt 10⁴ KTJ.ml⁻¹ a 10⁵ KTJ.ml⁻¹.

TABLE 1. Growth parameters of psychrotrophic strains of *B. cereus* from pasteurized milk (74 °C, 20 s) stored at (5±1) °C for 24 d and prediction of number of days to reach critical limits 10⁴ CFU.ml⁻¹ and 10⁵ CFU.ml⁻¹.

Výroba pasterizov. mlieka ¹	Vzorka pasterizov. mlieka ²	Trvanie lag-fázy ³ [d]	Priemerný počet v lag-fáze ⁴ [KTJ.ml ⁻¹] ⁵	Priemerný počet za 5 dní ⁶ [KTJ.ml ⁻¹]	Generačný čas ⁷ <i>B. cereus</i> [h]	Počet dní potrebných na dosiahnutie ⁸ [d]	
						10 ⁴ KTJ.ml ⁻¹	10 ⁵ KTJ.ml ⁻¹
B	B ₁	neg.	0,40	9,54	26	16,0	19,6
	B ₂	1,4	0,51	6,45	23	15,3	18,5
	B ₃	neg.	0,54	10,16	28	16,7	20,7

neg. - lag-fáza nebola vykonanými meraniami zaznamenaná.

neg. - lag-phase was not observed by the measurements carried out.

1 - production of pasteurized milk, 2 - sample of pasteurized milk, 3 - persistence of lag-phase, 4 - average number within lag-phase, 5 - CFU.ml⁻¹, 6 - average number in 5 days, 7 - generation period, 8 - number of days to reach.

výroba A: 6,1; 6,0 a 5,1 d a výroba C: neg.; 2,6 a 11,6 d. Aj táto skutočnosť naznačuje, že u kmeňov z výroby B sa jednalo skutočne o psychrotrófnе kmene *B. cereus* (obr. 1).

Priemerné počiatkové obsahy kmeňov *B. cereus* v pasterizovanom mlieku z výroby B, pri nepretržitej teplote uchovávania (5 ± 1) °C, boli 0,40; 0,51 a 0,54 KTJ.ml⁻¹. Za 5 dní, čo je legálna trvanlivosť pasterizovaného mlieka s predĺženou trvanlivosťou, bol v tomto prípade dosiahnutý počet *B. cereus* [KTJ.ml⁻¹]: 9,5; 6,5 a 10,2. Tieto hodnoty boli hlboko pod limitom pre *B. cereus* v pasterizovanom mlieku. Anderssonová a kol. [1] udávajú limity 10³ KTJ.ml⁻¹, čo by bolo možné považovať za operačnú limitnú hodnotu pre závody. Vo väčšine štátov Európskej únie sa za hraničnú hodnotu považuje podľa Notermansa [14] 10⁴ KTJ.ml⁻¹ *B. cereus*, čo by bolo možné považovať za kritický hygienický limit.

Vypočítané generačné časy *B. cereus* pre konkrétne merania u výroby B (v log-fáze ich rastu) boli 26; 23 a 28 h, pričom pred stacionárnou fázou, ktorá začala za 15 až 18 dní, boli dosiahnuté skutočné denzity psychrotrófnych kmeňov *B. cereus* 51 000 až 600 000 KTJ.ml⁻¹. Výpočtom sa potvrdilo, že limit 10⁴ KTJ.ml⁻¹ by mal byť dosiahnutý za 15,3 až 16,7 dní, čo bolo v dobrej zhode so skutočnosťou (15 až 18 dní; obr. 1). Anderssonová [1] udala generačné časy psychrotrófnych *B. cereus* pri teplote 8 °C, teda o 3 °C vyššej teplote, 10 až 12 h. Pritom poznamenáva, že predlžovanie generačného času tohoto mikroorganizmu medzi teplotami 8 až 6 °C, teda o 2 °C, je 1,5 až 1,7-násobné.

Tieto experimentálne získané a vypočítané údaje z konkrétnej výroby pasterizovaného mlieka, uchovávaného nepretržite pri (5 ± 1) °C, sú z hľadiska rizikovosti *B. cereus* v pasterizovanom mlieku uspokojujúce. V praxi však teplota uchovávania takéhoto mlieka môže značne kolísať. Počas uchovávania vo veľkoobchodných skladoch sú z ekonomických príčin bežné teploty do 8 °C. Samotný konzument často vystavuje pasterizované mlieko vyšším teplotám, napr. v zle nastavenej chladničke, počas raňajok a pod. Táto skutočnosť však vyžaduje ďalší výskum predovšetkým pri teplotách 8; 10 až 12 °C a následné porovnanie s údajmi získanými pri (5 ± 1) °C, prezentovanými v tejto práci.

V našej experimentálnej práci sme dokázali, že psychrotrófnosť nie je všeobecnou vlastnosťou *B. cereus*, ale že je vlastnosťou iba niektorých kmeňov. Túto skutočnosť si v poslednom čase všimli aj iní pracovníci, čo viedlo k tomu, že v r. 1998 navrhli, aby definované psychrotrófnе kmene *B. cereus* dobre rastúce pri teplotách 4 až 7 °C a nerastúce pri teplote 43 °C, boli uznané za samostatný bakteriologický druh s pomenovaním taxónu *Bacillus weihenstephanensis* (WSBC 10204T) [15]. Súčasne sa prišlo k výsku-

mu rozlíšenia a dôkazu tohto druhu metódou polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) spočívajúcej na určení cielenej sekvencie nukleových kyselín zodpovedajúcich za vznik špecifickej bielkoviny v dôsledku chladového šoku. Táto nová metóda poskytuje možnosť rýchlej analýzy a predpovede trvanlivosti pasterizovaného mlieka uchovávaného v chlade [16]. S metódou PCR pracovali aj Mayr a kol. [13] pri skúmaní výskytu psychrotrofných kmeňov *B. cereus* tolerujúcich 7 °C v nemeckom vysokopasterizovanom mlieku (HTST). Nájdene a identifikované psychrotrofné kmene *B. cereus* pomenovali taxónom *Bacillus weihenstephanensis*.

Literatúra

1. ANDERSSON, A. - RÖNNER, U. - GRANUM, P. E.: What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*? International Journal of Food Microbiology, 28, 1995, s. 145-155.
2. MOLSKA, I.: Czy mleko pasteryzowane może być przyczyną zatrucia pokarmowych powodowanych przez *Bacillus cereus*? Przegląd Mleczarski, 16, 1998, s. 305-307.
3. *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. In: Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxin handbook. U. S. Food & Drug Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition, 1999. <http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap12.html>.
4. PIECKOVÁ, E. - TOMANOVÁ, E.: *Bacillus cereus* v požívatinách. Bulletin potravinárskeho výskumu, 37, 1988, s. 237-245.
5. GREIFOVÁ, M. - VALÍK, L. - MEČIAROVÁ, M. - GÖRNER, F.: Vplyv prítomnosti *Bacillus cereus* na konzistenciu miešaného jogurtu. Bulletin potravinárskeho výskumu, 37, 1998, s. 237-245.
6. KUŠNIEROVÁ, M.: *Bacillus cereus* ako pôvodca alimentárnych ochorení. In: Sborník přednášek Čs. společnosti mikrobiologické „Zkušenosti s novými laboratorními přístupy v mikrobiologii potravin“, Liblice, 3.-5. mája 1988. Praha : Československá společnost mikrobiologická, 1998, s. 172-175.
7. GÖRNER, F. - VALÍK, L.: Analýza rizika z hľadiska HACCP a prediktívna mikrobiológia. Bulletin potravinárskeho výskumu, 37, 1998, s. 71-82.
8. STN ISO 7932 (56 0092). Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na stanovenie počtu baktérií *Bacillus cereus*. Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 30 °C. 1998.
9. BARANYI, J. - ROBERTS, T. A. - MCCLURE, P.: A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. Food Microbiology, 10, 1993, s. 43-49.
10. BARANYI, J. - ROBERTS, T. A.: Mathematics of predictive food microbiology. International Journal of Food Microbiology, 26, 1995, s. 199-218.
11. VALÍK, L. - GÖRNER, F.: Prognostické aspekty v potravinárskej mikrobiológii. Potravinárske vedy, 14, 1996, s. 261-273.
12. VALLUŠOVÁ-GREIFOVÁ, M. - GÖRNER, F.: Biometrické hodnotenie stanovenia počtu baktérií v sušenom mlieku. Bulletin potravinárskeho výskumu, 26, 1987, s. 77-83.
13. MAYR, R. - EPPERT, I. - SCHERER, S.: Incidence and identification of psychrotrophic (7 °C-tolerant) *Bacillus* spp. in German HTST pasteurized milk. Milchwissenschaft, 54, 1999, s. 26-30.

14. NOTERMANS, S.: Risiko-Analyse als Basis der Herstellung sicherer Lebensmittel. Lebensmittel und Biotechnologie, 3, 1997, s. 98-101.
15. LECHNER, S. - MAYR, R. - FRANCIS, K. P. - PRÜSS, B. - KAPLAN, T. - WIESSNER-GUNKEL, E. - STEWART, G. - SCHERER, S.: *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. International Journal of Systematic Bacteriology, 48, 1998, s. 1373-1382.
16. FRANCIS, K. P. - MAYR, R. - VON STETTEN, F. - STEWART, G. - SCHERER, S.: Discrimination of psychrotrophic and mesophilic strains of the *Bacillus cereus* group by PCR targeting of major cold shock protein genes. Applied and Environmental Microbiology, 64, 1998, s. 3525-3529.
17. MAYR, R. - VON STETTEN, F. - FRANCIS, K. P. - SCHERER, S.: Significance of psychrotolerant aerobic sporeformers in food spoilage and methodologies for their detection and identification. Mitteilungen Lebensmittel Hygiene, 90, 1999, s. 42-61.

Do redakcie došlo 29.7.1999.

Shelf-life prediction of pasteurized milk considering growth of *Bacillus cereus* at (5 ± 1) °C

GREIFOVÁ, M. - VALÍK, L. - GÖRNER, F. - PETRÍKOVÁ, J.:
Bulletin potrav. Výsk., 38, 1999, p. 243-250.

SUMMARY. *Bacillus cereus* represents an ubiquitous microorganism. Some strains, however, can cause food-borne diseases if present in pasteurized milk in higher numbers than 10^5 CFU.ml⁻¹. The content 0,5 to 1,5 CFU.ml⁻¹ was determined in pasteurized fresh milk (74 °C, 20 s) during spring months. The psychrotrophic strains of *B. cereus* that grew at (5 ± 1) °C with the generation time 26 to 28 days were isolated within one of three productions. Applying a prediction method, the growth maximum limits at (5 ± 1) °C were defined as 10^4 or 10^5 CFU.ml⁻¹ in 15,3 to 20,7 days. Considering psychrotrophic *B. cereus*, pasteurized milk stored at the mentioned temperature did not represent any hazard.

KEYWORDS: *Bacillus cereus*; pasteurized milk; generation time; predictive microbiology