



## KOMPETITÍVNY ÚČINOK BAKTÉRIÍ MLIEČNEHO KYSNUTIA NA RAST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

### Competitive effect of lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus*

A. MEDVEĎOVÁ, Ľ. VALÍK, B. BAJÚSOVÁ

Slovenská technická univerzita v Bratislave, Slovak Republic

---

#### ABSTRACT

In connection with ewe's lump cheese production, the inhibiting potential of two mesophilic cultures of lactic acid bacteria was described. The initial amount of lactic acid bacteria necessary for keeping the growth of *Staphylococcus aureus* under control were estimated in ultra-pasteurized milk. The growth inhibition of *S. aureus* 2064 with mesophilic culture Fresco was more effective when the higher addition of competitive microflora and the lower incubation temperature were used. At a temperature of 25 °C, *Staphylococcus aureus* 2064 at stationary phase reached counts higher than 10<sup>6</sup> CFU/ml by the Fresco culture addition  $N_{0\_Fr} = 2.95 \log_{10}$  counts and by the addition of Fresco  $N_{0\_Fr} = 6,6 \log_{10}$  in the beginning there was an increase of about 1 log in staphylococci counts. At a temperature of 18 °C, comparable addition of Fresco culture ( $N_{0\_Fr} = 6.7 \log_{10}$  counts) could increase the *S. aureus* count only at about 0.53 log. Increase of *S. aureus* 2064 in stationary phase against its initial numbers in co-culture with Fresco culture at 25 °C was determined using the equation  $N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa} = -0.7258N_{0\_Fr} + 5.6748$  ( $R^2_{N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}} = 0.9281$ ). The behaviour of *Staphylococcus aureus* 2064 and mesophilic culture A at a temperature of 25 °C was also studied. The culture A showed similar, even higher inhibitory effect on *S. aureus* growth at 25 °C. In this case, the growth of *S. aureus* 2064 in co-culture with culture A at 25 °C was described by the equation  $N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa} = -2.1814N_{0\_A} + 12.605$  ( $R^2_{N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}} = 0.9564$ ). The duration of pH lag-phase, hence the time during which no changes of pH values were observed was determined by initial inoculum of Fresco culture at each incubation temperature. These dependencies were described by statistically significant linear relations in this work. The maximal increase of *S. aureus* counts at stationary phase by 1 log against its initial numbers was controlled by the addition of the Fresco culture or the mesophilic A culture higher than 10<sup>6</sup> CFU/ml or 10<sup>5</sup> CFU/ml, respectively.

**Keywords:** Ewe's lump cheese, lactic acid bacteria, *Staphylococcus aureus*

---

#### ÚVOD

Kyslomliečne fermentácie sa už viac ako 6000 rokov využívajú pri príprave a výrobe mnohých potravín. Ich prostredníctvom sa predlžuje trvanlivosť, zvyšuje kvalita a v mnohých prípadoch zabezpečuje aj zdravotná neškodnosť východiskových surovín. Okrem týchto benefitov proces fermentácie priaznivo ovplyvňuje senzorické vlastnosti a akceptovateľnosť niektorých zložiek potravín. Typickým príkladom je laktóza v mlieku a zmiernenie jej intolerancie u citlivých

osôb konzumáciou kyslomliečnych výrobkov. Proces fermentácie navyše umožňuje využiť potraviny ako nosiče probiotických kultúr, čím takéto potraviny získajú atribút priaznivého vplyvu na zdravie človeka. Pre hore uvedené skutočnosti môžeme fermentované potraviny bez obáv označiť ako chutné, nutrične bohaté a zdraviu prospešné.

Originálnym slovenským krátko zrejúcim syrom vyrábaným zo surového ovčieho mlieka je bryndza. Polotovarom pri výrobe bryndze je ovčí hrudkový syr, ktorý sa vyrába na salašoch v horských

---

**Correspondence:** E-mail: lubomir.valik@stuba.sk

podmienkach zo surového mlieka. Tento syr podlieha prirodzenej fermentácii natívnymi, najprv baktériami mliečného kysnutia, neskoršie proteolytickými baktériami a vláknitými hubami a ich proteolytickými a lipolytickými enzýmami. Pôvodne v minulosti, proteolytické (sekundárne zrenie) trvalo na salaši a v bryndziarni spolu desať až štrnásť dní, neskoršie osem až dvanásť dní, pričom sa sušina zvýšila na 54 až 57 %. V súčasnosti tento syr je podrobený iba krátkemu zreniu trvajúcemu maximálne päť až sedem dní (spolu čas na salaši a v bryndziarni), (Görner a Valík, 2004).

V horských oblastiach v prípade nepriaznivých meteorologickým podmienok je ťažké zabezpečiť vhodné podmienky pre rýchlu fermentáciu baktériami mliečného kysnutia (BMK). Pomalý pokles hodnôt pH môže v praxi byť nedostatočnou prekážkou pre rast patogénnych baktérií, napr. aj toxínogénneho *Staphylococcus aureus* (Grieger a i., 1979). Podľa vlastných vyšetrení (Valík a i., 2004), môže tento organizmus, ktorého toxíny sú termostabilné, za krátky čas prekročiť počty  $10^6$  KTJ/g, pri ktorých môže koncentrácia toxínov v syre dosiahnuť takú úroveň, ktorá spôsobí intoxikáciu konzumentov, a to aj v potravinách alebo jedlách teplotne opracovaných (Asperger a Zangerl, 2002).

Z mikroorganizmov zúčastnených fermentačných procesoch prevládajú kultúry BMK. Ak sa tieto kultúry využívajú komerčne, musia spĺňať kritérium bezpečnosti, (označenie GRAS – generally regarded as safe). Do skupiny BMK síce patrí 12 rodov, ale pre účely kyslomliečnych fermentácií sú najvhodnejšie druhy z rodov *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* a *Leuconostoc* pre ich schopnosti homofermentatívne utilizovať sacharidy za vzniku sensoricky akceptovateľného hlavného metabolitu kyseliny mliečnej a ostatných chuťových látok a enzýmov, ktoré vhodným spôsobom ovplyvňujú aj fyzikálne vlastnosti finálnych produktov. Degradáciou antinutričných faktorov, zvýšením stráviteľnosti bielkovín, biosyntézou vitamínov a esenciálnych aminokyselín BMK zvyšujú nutričnú hodnotu fermentovaných potravín (Holzapfel, 1997). Spomedzi ich metabolitov antimikrobiálny účinok vykazujú kyselina mliečna a iné organické kyseliny, peroxid vodíka, diacetyl a bakteriocíny, pričom najvýznamnejšiu prekážku pre rast nežiadúcich a patogénnych mikroorganizmov predstavuje kyselina mliečna a s ňou súvisiace oxyslenie prostredia na hodnoty neakceptovateľné kontaminačnou mikroflórou (Aslim a i., 2005). Antimikrobiálny vplyv kyslého prostredia závisí od miery disociácie prítomnej kyseliny, (účinnější je jej nedisociovaná forma) a stupňa oxyslenia, teda od množstva kyseliny v prostredí, čo pri fermentácii priamo súvisí s množstvom prítomných BMK. Inhibícia prípadne prítomných patogénnych baktérií vo fermentovaných potravinách je podľa Adamsa (2001) a Görnera a Šimkovicovej (1979)

nevýznamná až do doby, kým BMK nedosiahnu patričnú dominanciu v prostredí a v dostatočnej koncentrácii nevytvoria kyselinu mliečnu. Miera inhibície nežiadúcich mikroorganizmov pôsobením kyseliny mliečnej závisí aj od ostatných faktorov prostredia, predovšetkým od teploty uchovávaní, pričom platí, že čím je teplota vyššia, tým dochádza k rýchlejšiemu odumieraniu patogénov (Aslim, 2001). Görner a Šimkovicová (1979) pritom zistili, že jednoduché zníženie pH nebolo dostatočným faktorom na inhibíciu rastu stafylokokov, pokiaľ toto nebolo sprevádzané enzymatickou aktivitou konkurenčnej mikroflóry.

*Staphylococcus aureus* sa v surovom ovčom mlieku vyskytuje prakticky bežne. Pre svoju schopnosť tvoriť celý rad enterotoxínov a dobrý rast v mlieku, patrí k najsledovanejším mikrobiologickým ukazovateľom, či v ručne alebo strojovo nadojenom mlieku alebo aj v remeselne vyrobenom syre. Podľa Aspergera a Zangerla (2002) a Normana a i. (2007) *S. aureus* je tiež tretím najčastejším agens potravinových otráv vo svete. Často sa vyskytuje na pokožke a slizniciach, v nosných dierkach, hltane, vo vlasoch, v gastrointestinálnom a urogenitálnom trakte ľudí, ale aj na koži, strukoch a mukózných membránach zvierat produkujúcich mlieko. Ak vemenó zvieratá je kontaminované, *S. aureus* sa dojením dostáva do mlieka, v ktorom sa jeho počty môžu pohybovať od  $10^1$  –  $10^8$  KTJ/ml, zvyčajne však okolo  $10^4$  KTJ/ml (Asperger a Zangerl, 2002). Podľa Valíka a i. (2004a) sa v dobre nadojenom ovčom mlieku môže vyskytovať medzi 100 až 200 KTJ/ml. Zvýšené počty *S. aureus* v mlieku je možné očakávať, ak sa v stáde vyskytuje mastitídne ochorenie. Vasil' a i. (2007) uviedli, že *S. aureus* sa podieľa na mastitídnych ochoreniach približne v rozsahu do 5 až 6%. Hoci väčšina prítomných kmeňov neprodukuje enterotoxíny, časť z populácie ich môže tvoriť. Na túto skutočnosť poukázali Vasil' a i. (2005), ktorí zistili túto schopnosť u 21% kmeňov izolovaných z ovčieho mlieka. Z tohto dôvodu je potrebné zabrániť pomnoženiu *S. aureus* pri výrobe syra, (čo je z pohľadu systému HACCP nebezpečenstvo) a predísť stafylokokovým enterotoxikózam z konzumácie syra, t.j. znížiť pravdepodobnosť ich vzniku (riziko). Nevyhnutné zvlášť pri remeselnej výrobe syra je, aby si personál na salaši osvojil princípy správnej výrobnéj a hygienickej praxe a minimalizoval kontamináciu mlieka nežiadúcimi mikroorganizmami (Valík a i., 2004b). V ostatnom čase boli Nariadením EÚ č. 2073/2005 definované kritériá bezpečnosti a hygieny procesu pre syry vyrábané zo surového mlieka. Popri kritériu pre *Listeria monocytogenes* ( $n = 5$ ,  $c = 0$ ,  $m < 100$  KTJ/g) je ďalším významným kritériom hygieny procesu počet koagulázopozitívnych stafylokokov, ktorý nemá prekročiť  $10^4$  KTJ/g, ( $n = 5$ ,  $c = 2$ ,  $m = 10^4$  a  $M = 10^5$  KTJ/g). Tieto štandardy môžu byť splnené na farmách, len ak sa mlieko na výrobu syrov

okamžite spracuje alebo schladí a pasterizuje (Asperger a Zangerl, 2002; Baird-Parker, 2000).

Počas výroby syra sa podľa Aspergera a Zangerla (2002) *Staphylococcus aureus* koncentruje v zrazenine a jeho obsah v mladom syre je priamo úmerný jeho počtom v mlieku. Za normálnych podmienok sa môže počas prvých 24h zretia syra očakávať jeho nárast o 1,5 až 3 log poriadky a pri spomalenej fermentácii až o 5 log poriadkov, pokiaľ kyseliny vytvorené baktériami mliečného kysnutia nezačnú jeho rast inhibovať. Dynamika množenia *S. aureus* v mlieku a v čerstvom syre je preto ovplyvnená druhovým zastúpením baktérií mliečného kysnutia, ich obsahom a aktivitou. Analogicky to platí aj v prípade aplikácie zákysových kultúr, ktorá okrem toho prispieje ku štandardizácii procesu fermentácie.

Cieľom našej práce bolo na podmienky výroby ovčieho hrudkového syra charakterizovať inhibičný potenciál mezofilnej kultúry baktérií mliečného kysnutia a stanoviť jej počiatočné koncentrácie potrebné na udržanie rastu *Staphylococcus aureus* pod kontrolou, t.j. minimálne na úrovni požadovanej nariadeniami EÚ.

## MATERIÁL A METÓDY

Kmeň *Staphylococcus aureus* 2064 bol pôvodne izolovaný z ovčieho hrudkového syra MVDr. A. Hanzélyovou zo Štátneho veterinárneho a potravinového ústavu v Prešove. Na inokuláciu vzorky bola použitá suspenzia *S. aureus* s denzitou  $N_{0,STA} \approx 10^3$  KTJ/ml, pripravená z 24 h kultúry kmeňa vyrastenej na GTK agare (Imuna, Šarišské Michaľany, SR).

Pri inkubačných teplotách 15, 18, 21, 25 a 30°C sme vykonali sériu pokusov, kedy sme do paralelných vzoriek sterilného UHT mlieka inokulovali súčasne štandardnú kultúru *Staphylococcus aureus* 2064 spolu s 24 h kultúrou Fresco (Danisco, Copenhagen, Dánsko). Pre potvrdenie inhibičného účinku baktérií mliečného kysnutia sme pri teplote 25°C vykonali aj pokusy pri spoločnej kultivácii *S. aureus* 2064 s čerstvou kultúrou A (Rajo, Bratislava, SR).

V príslušne stanovených časových intervaloch sme odoberali potrebné množstvá na stanovenie denzity *S. aureus* na Baird-Parkerovom agare (Imuna, Šarišské Michaľany, SR; Merck, Darmstadt, Nemecko) podľa STN ISO 6888. V tom istom čase sme stanovovali aj denzitu kultúry Fresco na M 17 agare (Biomark, Pune, India), resp. kultúry A na MRS agare (Biomark, Pune, India) podľa STN ISO 15214. Súčasne sa zisťovali hodnoty aktívnej kyslosti média pH metrom inoLab pH 720, WTW (Weilheim, Nemecko).

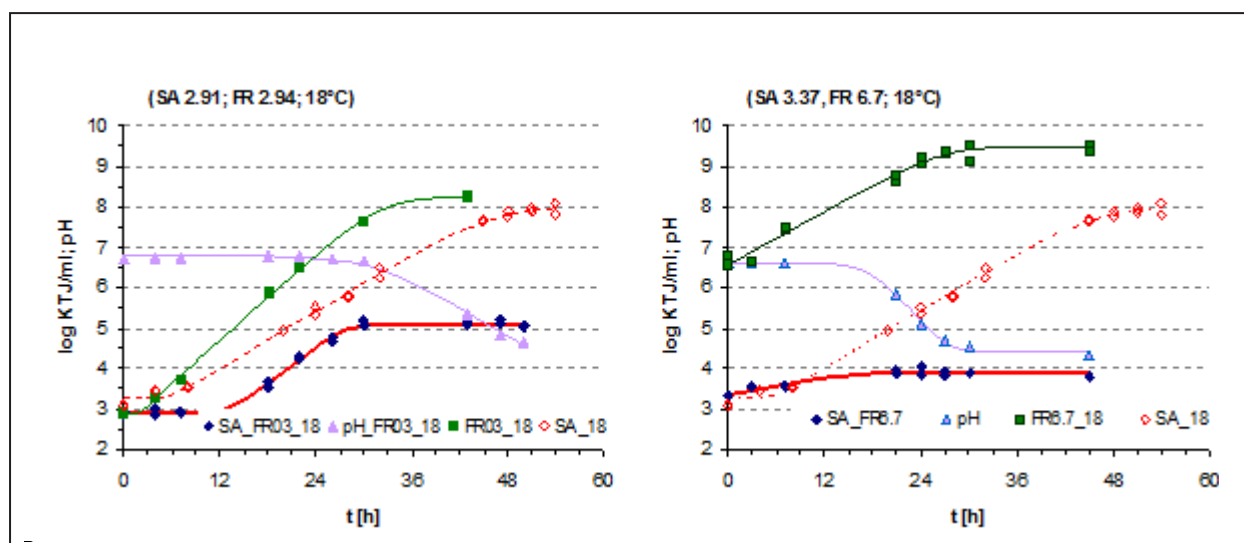
Zo zistených počtov jednotlivých typov mikroorganizmov sme zostrojili rastové čiary v závislosti od času inkubácie podľa Baranyiho D-modelu (Baranyi a i., 1993). Rastové parametre (lag-fáza, rastová rýchlosť

a i.) vypočítané z príslušných rastových čiar boli podrobené analýze v sekundárnej fáze matematického modelovania mikrobiálneho rastu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Vzhľadom na to, že baktérie mliečného kysnutia ako aj *Staphylococcus aureus* sú prakticky mezofilné mikroorganizmy, teplota 25°C bola blízka ich optimálnym teplotám a umožnila obidvom druhom spočiatku rásť svojou prirodzenou rastovou rýchlosťou. Baktérie mliečného kysnutia za krátky čas dosiahli stacionárnu fázu (12-18h) v priemerných maximálnych počtoch  $\log N_{end,Fr} = 9,3$  KTJ/ml. Ich rast bol sprevádzaný tvorbou kyseliny mliečnej, v dôsledku čoho v prostredí klesala hodnota pH. Rast *S. aureus* sa zastavil, akonáhle dochádzalo k poklesu hodnoty pH, resp. keď sa skončila tzv. lag-fáza pH. Trvanie lag-fázy pH sa so zvyšujúcim prídavkom BMK prirodzene skracovalo z takmer 14 hodín pri počiatočnom množstve kultúry Fresco  $10^3$  KTJ/ml až po 5 hodín pri inokule kultúry Fresco  $N_{0,Fr} = 6,6$  KTJ/ml (tab. 1). Bolo zrejmé, že rast *S. aureus* sa v závislosti od veľkosti počiatočného nadbytku kompetitívnej mikroflóry, a tým od rýchlosti s akou sa táto dokázala množiť a produkovať kyselinu mliečnu, zastavoval na stále nižších konečných hodnotách. Pri rovnakých počiatočných počtoch obidvoch organizmov v spoločnej kultúre (obr. 1a), *S. aureus* dosiahol maximálnu hodnotu 6,5 log poriadku. Jeho rastová rýchlosť v tomto prípade bola 0,308 log KTJ.h<sup>-1</sup> ( $T_d = 1,0$  h), teda zdvojnásobenie stafylokokovej populácie nastalo za 1 h. Táto hodnota bola približne rovnaká, ako v prípade samostatného rastu *S. aureus* (čiarkovaná čiara). S postupným zvyšovaním počiatočného prídavku kultúry Fresco sa začala spomaľovať rastová rýchlosť *S. aureus* v exponenciálnej fáze a jeho maximálne počty v stacionárnej fáze dosahovali čoraz nižšie hodnoty. Táto závislosť je zhrnutá aj v tab. 1, kde pri všetkých počiatočných počtoch kultúry Fresco sú okrem dĺžky lag-fázy pH uvedené aj maximálne počty stafylokokov, jeho nárast v stacionárnej fáze oproti počiatočnému počtom a tiež aj hodnoty rastových rýchlostí *S. aureus*. Pri porovnaní rastových parametrov *S. aureus* pri počiatočnom počte kultúry Fresco vyššom ako  $10^6$  KTJ/ml (obr. 1b) oproti predchádzajúcemu pokusu (obr. 1a), *S. aureus* dosiahol v stacionárnej fáze nárast už len o 1 log poriadok vyšší v porovnaní s jeho počtom na začiatku. Vzhľadom na inhibíciu, ktorá vzápätí nasledovala, jeho rastová rýchlosť nadobudla už len tretinovú hodnotu ( $Gr_{sa} = 0,114$  log KTJ.h<sup>-1</sup>,  $T_d = 2,6$  h).

V dobre vykysnutom ovčom hrudkovom syre je rozmnožovanie a prípadná tvorba enterotoxínov potlačená fermentačným metabolizmom baktérií mliečného kysnutia. Na zabezpečenie správneho kysnutia



Obr. 1a a 1b: Dynamika rastu *Staphylococcus aureus* 2064 a kultúry Fresco (3,0 a 6,6 log KTJ/ml) počas spoločnej kultivácie v mlieku pri teplote 25 °C

Fig. 1a and 1b: Growth dynamics of *Staphylococcus aureus* 2064 and Fresco culture (3,0 a 6,6 log CFU/ml) during co-culture in milk at 25 °C

Tabuľka 1: Rastové parametre *S. aureus* 2064 a lag-fáza pH v závislosti od počiatocného množstva kultúry Fresco v spoločnej kultivácii v mlieku pri teplote 25 °C

Table 1: Growth parameters of *S. aureus* 2064 and pH lag-phase in dependence of initial amount of Fresco culture in co-culture in milk at 25°C

$N_{0\_Fr}$	lag_pH	$N_{max\_Sa}$	$N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}$	$Gr_{Sa}$
2,95	13,8	6,53	3,84	0,308
3,13	12,5	5,49	3,00	0,238
4,55	11	5,17	2,35	0,197
5,3	10,2	5,08	2,07	0,198
6,55	5,4	4,27	0,88	0,114

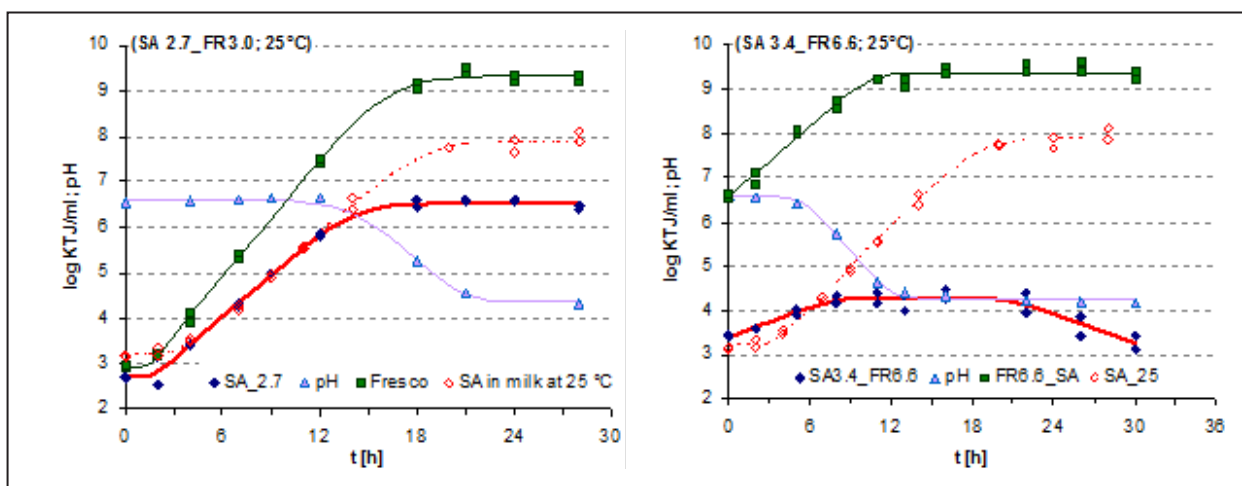
$N_{0\_Fr}$  - počiatocné množstvo kultúry Fresco (log KTJ/ml), lag\_pH - trvanie lag-fázy pH (h),  $N_{max\_Sa}$  - množstvo *S. aureus* v stacionárnej fáze (log KTJ/ml),  $N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}$  - nárast *S. aureus* v stacionárnej fáze oproti počiatocným počtom (log KTJ/ml),  $Gr_{sa}$  - rastová rýchlosť *S. aureus* (log KTJ/ml/h)

$N_{0\_Fr}$  - initial number of Fresco culture (log CFU/ml), lag\_pH - pH lag-phase duration (h),  $N_{max\_Sa}$  - number of *S. aureus* in stationary phase (log CFU/ml),  $N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}$  - net growth of *S. aureus* in stationary phase (log CFU/ml),  $Gr_{sa}$  - growth rate of *S. aureus* (log CFU/ml/h)

nemá, podľa Görnera a Valíka (2002) a Heriana (2002), počas zrenia ovčieho hrudkového syra po zasyrení mlieka klesnúť priemerná vnútorná teplota syreniny pod 18 °C. Z uvedeného dôvodu sme vykonali pokusy aj pri tejto, v procese výroby ovčích syrov, hraničnej teplote.

V paralelných pokusoch sme k počiatocným počtom stafylokoka (rádovo  $10^3$  KTJ/ml) zámerne pridávali zvyšujúce sa prídavky kultúry Fresco.

Na obr. 2a a 2b sú pre názornosť uvedené len rastové čiary pri spoločnej kultivácii *S. aureus* 2064 s najnižším ( $N_{0\_Fr} = 2,94$  KTJ/ml) a najvyšším ( $N_{0\_Fr} = 6,7$  KTJ/ml) počiatocným prídavkom kultúry Fresco. Ako možno z grafov vidieť, na kvalitu a kvantitu pomnoženia patogénneho mikroorganizmu mala vplyv jednak inkubačná teplota, ale hlavne množstvo prítomnej inhibične pôsobiacej mikroflóry BMK. Rastová rýchlosť *S. aureus* pri 18 °C sa oproti jeho rastovej rýchlosti pri 25 °C znížila takmer 3-násobne pri porovnateľných inokuláciách kultúry Fresco, napr.  $Gr_{Sa, 25^\circ C} = 0,308$  log KTJ.h<sup>-1</sup> pri  $N_{0\_FR} = 2,95$  KTJ/ml a  $Gr_{Sa, 18^\circ C} = 0,115$  log KTJ.h<sup>-1</sup> pri  $N_{0\_FR} = 2,94$  KTJ/ml. Navyše sa jeho rastová rýchlosť spomaľovala aj v dôsledku postupne sa zvyšujúceho prídavku kultúry BMK (tab. 2). Kým pri rovnakej inokulácii oboch typov mikroorganizmov ( $N_{0\_Fr} = 2,94$  KTJ/ml a  $N_{0\_SA} = 2,91$  KTJ/ml) (obr. 2a) bola rastová rýchlosť stafylokoka 0,151 log KTJ.h<sup>-1</sup>, pri inokulácii kultúry Fresco o 3,5 log poriadku vyššom (obr. 3b), sa rastová rýchlosť stafylokoka znížila 5-násobne. Z prezentovaných grafov je tiež zrejmé, že *S. aureus* opäť rástol len pri nezmenených hodnotách pH prostredia, teda len počas tzv. lag-fázy pH, ktorá sa so zvyšujúcim počiatocným prídavkom kultúry Fresco prirodzene skracovala. So skrátením dĺžky lag-fázy pH úzko súvisí aj postupný pokles maximálnych počtov stafylokoka v stacionárnej fáze charakterizovaný jeho nárastom oproti jeho počiatocným počtom ( $N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}$ ). Všetky tieto závislosti sú zhrnuté v tab. 2.



Obr. 2a a 2b: Dynamika rastu *Staphylococcus aureus* 2064 a kultúry Fresco (2,9 a 6,7 log KTJ/ml) počas spoločnej kultivácie v mlieku pri 18 °C

Fig. 2a and 2b: Growth dynamics of *Staphylococcus aureus* 2064 and Fresco culture (2,9 a 6,7 log CFU/ml) during co-culture in milk at 18 °C

Tabuľka 2: Rastové parametre *S. aureus* 2064 a lag-fáza pH v závislosti od počiatocného množstva kultúry Fresco v spoločnej kultivácii v mlieku pri teplote 18 °C

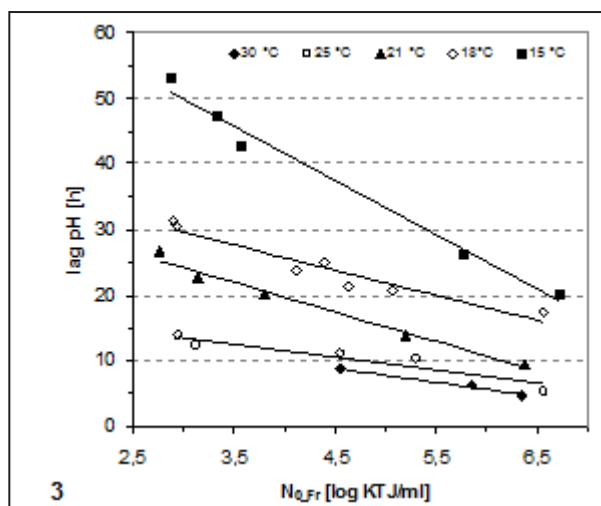
Table 2: Growth parameters of *S. aureus* 2064 and pH lag-phase in dependence of initial amount of Fresco culture in co-culture in milk at 18°C

$N_{0\_Fr}$	lag_pH	$N_{max\_Sa}$	$N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}$	$Gr_{Sa}$
2,91	31,16	5,11	2,20	0,151
2,94	30,58	4,98	1,88	0,115
3,32	25,44	4,58	1,73	0,071
4,11	23,68	3,80	0,98	0,046
4,63	21,36	3,62	0,73	0,027
4,40	24,87	5,67	1,03	0,036
5,07	20,79	3,44	0,76	0,044
6,70	17,29	3,88	0,53	0,035

$N_{0\_Fr}$  - počiatocné množstvo kultúry Fresco (log KTJ/ml), lag\_pH - trvanie lag-fázy pH (h),  $N_{max\_Sa}$  - množstvo *S. aureus* v stacionárnej fáze (log KTJ/ml),  $N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}$  - nárast *S. aureus* v stacionárnej fáze oproti počiatocným počtom (log KTJ/ml),  $Gr_{Sa}$  - rastová rýchlosť *S. aureus* (log KTJ/ml/h)

$N_{0\_Fr}$  - initial number of Fresco culture (log CFU/ml), lag\_pH - pH lag-phase duration (h),  $N_{max\_Sa}$  - number of *S. aureus* in stationary phase (log CFU/ml),  $N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}$  - net growth of *S. aureus* in stationary phase (log CFU/ml),  $Gr_{Sa}$  - growth rate of *S. aureus* (log CFU/ml/h)

Dĺžka trvania lag-fázy pH je odrazom rýchlosti metabolizmu baktérií mliečného kysnutia. S postupným zvyšovaním inkubačnej teploty sa mikroorganizmy všeobecne, rýchlejšie prispôbia novým životným podmienkam a následne sa skrčuje trvanie ich lag-fázy. Vďaka fermentačnému metabolizmu BMK sa v prostredí hromadí kyselina mliečna, čoho následkom je pokles

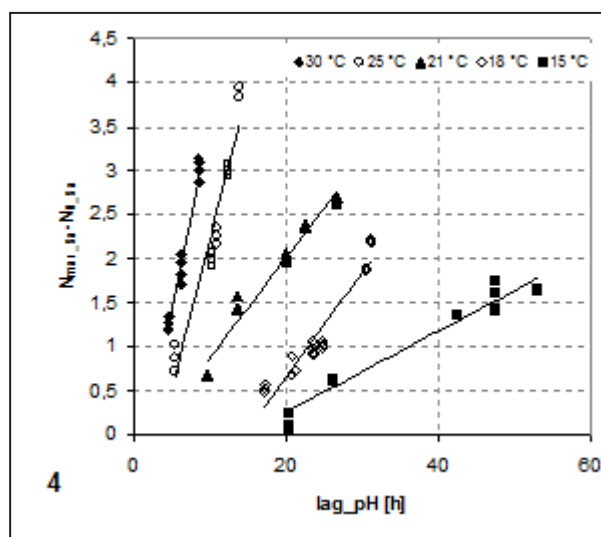


Obr. 3: Grafické znázornenie vplyvu počiatocného počtu kultúry Fresco na trvanie lag-fázy pH v závislosti od teploty inkubácie

Fig. 3: The effect of initial number of Fresco culture on duration of pH lag-phase in dependence of incubation temperature

hodnôt pH a to sa v závislosti od stúpajúcej teploty prostredia a zvyšujúceho sa počiatočného množstva prítomných baktérií deje rýchlejšie. Tento jav je zrejmy aj zo smerníc jednotlivých čiar závislostí vplyvu počiatočného počtu kultúry Fresco na trvanie lag-fázy pH s ohľadom na teplotu inkubácie (obr. 3).

To, ako dlho trvá lag-fáza pH ma priamy vplyv na nárast *S. aureus*, ktorý je limitovaný hodnotou pH prostredia. Jeho rast sme vo všetkých pokusoch pri všetkých teplotách a prídavkoch kultúry Fresco pozorovali len dovtedy, kým sa nemenila hodnota pH prostredia. Keď hodnota pH začala klesať, jeho rast sa pozastavil na maximálnych hodnotách a potom postupne začal odumierať. Z obr. 4 je zrejmé, že čím kratšie bola hodnota pH prostredia pri konkrétnej teplote nemenná, tým sme pozorovali menší nárast stafylokoka v stacionárnej fáze oproti jeho počiatočným počtom. Zvyšujúca sa teplota však podporovala rast nielen baktérií mliečného kysnutia, ale predovšetkým aj rast *S. aureus*. Preto na zabezpečenie jeho minimálneho nárastu boli potrebné čoraz vyššie prídavky kultúry Fresco. Na nárast stafylokoka o 1 rád bolo pri teplote 15 °C potrebných 4,7 log poriadku kultúry Fresco (pri 36 h trvajúcej lag-fáze pH) ale na rovnaký nárast pri teplote 25 °C už bol potrebný prídavok 6,3 log KTJ/ml kultúry Fresco (lag-fáza pH trvala 7h).



Obr. 4: Grafické znázornenie vplyvu trvania lag-fázy pH na nárast *S. aureus* 2064 v mlieku v závislosti od teploty inkubácie

Fig. 4: The effect of pH lag-phase on the net growth of *Staphylococcus aureus* 2064 in milk in dependence of incubation temperature

Tabuľka 3: Výsledky analýzy vplyvu počiatočných podmienok ( $N_{0\_Fr}$ , resp. lag pH) na následný rozvoj BMK (lag pH) a *S. aureus* 2064 ( $N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}$ )

Table 3: Results of analysis of the influence of initial conditions ( $N_{0\_Fr}$  or lag pH) on the activity of lactic acid bacteria (lag pH) and *S. aureus* 2064 ( $N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}$ )

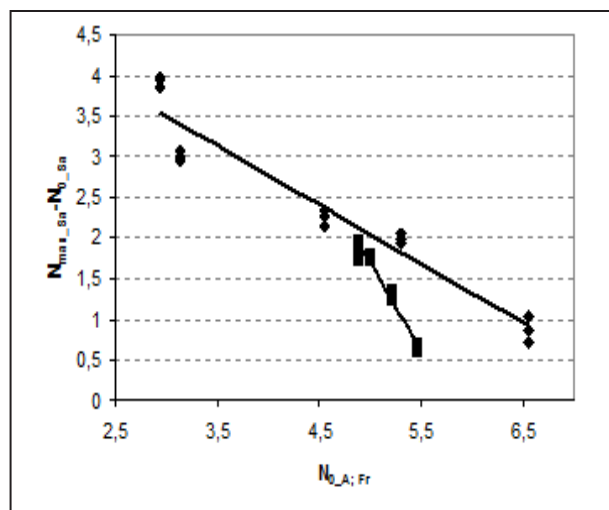
Teplota	Rovnica	$R^2$
15 °C	$N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa} = 0,0461 * lag\ pH - 0,6669$ $lag\ pH = -8,2405 * N_{0\_Fr} + 74,523$	$R^2(N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}) = 0,9559$ $R^2(lag\ pH) = 0,9822$
18 °C	$N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa} = 0,1189 * lag\ pH - 1,7263$ $lag\ pH = -3,8398 * N_{0\_Fr} + 41,099$	$R^2(N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}) = 0,9254$ $R^2(lag\ pH) = 0,9256$
21 °C	$N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa} = 0,1130 * lag\ pH - 0,2553$ $lag\ pH = -4,5140 * N_{0\_Fr} + 37,776$	$R^2(N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}) = 0,9686$ $R^2(lag\ pH) = 0,9792$
25 °C	$N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa} = 0,3406 * lag\ pH - 1,2003$ $lag\ pH = -2,0226 * N_{0\_Fr} + 19,696$	$R^2(N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}) = 0,9201$ $R^2(lag\ pH) = 0,9088$
30 °C	$N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa} = 0,4409 * lag\ pH - 0,8427$ $lag\ pH = -2,1373 * N_{0\_Fr} + 18,525$	$R^2(N_{max\_Sa} - N_{0\_Sa}) = 0,9774$ $R^2(lag\ pH) = 0,9822$

Matematické závislosti vplyvu počiatočného množstva kultúry Fresco ( $N_{0\_Fr}$ ) na trvanie lag-fázy pH a následné závislosti vplyvu dĺžky lag-fázy pH na nárast *S. aureus* v stacionárnej fáze oproti jeho počiatočným počtom pri jednotlivých teplotách sú spolu s príslušnými korelačnými koeficientmi uvedené v tab. 3.

Pri závislostiach vplyvu veľkosti počiatočného inokula kultúry Fresco na trvanie lag-fázy pH sa korelačný koeficient ( $R^2$ ) pohyboval v rozmedzí 0,9201 až 0,9774. V prípade vplyvu dĺžky trvania lag-fázy na nárast stafylokoka bol korelačný koeficient ( $R^2$ ) v rozpätí od 0,9088 po 0,9822.

Obdobné pokusy ako pri použití kultúry Fresco sme vykonali aj s použitím komerčnej mezofilnej kultúry A. K priemerným počiatočným množstvám *S. aureus*  $10^3$  KTJ/ml sme opäť pridávali zvyšujúce sa prídavky kultúry A. Vďaka produkcii kyseliny mliečnej sa aj kultúra A ukázala ako inhibične pôsobiaca na rast *S. aureus*. Pri spoločnej kultivácii *S. aureus* 2064 a kultúry A, *S. aureus* znova rástol len dovtedy, kým sa baktérie mliečného kysnutia nepričinili o klesanie hodnôt pH v prostredí. A so zvyšujúcim sa prídavkom kultúry A sme pozorovali pokles maximálnych počtov stafylokoka v stacionárnej fáze.

Na obr. 5 je znázornený vplyv počiatočnej inokulácie zákysových kultúr na nárast patogénneho mikroorganizmu v stacionárnej fáze oproti jeho počiatočným počtom pri teplote 25 °C. Pre lepšie znázornenie nerovnakého inhibičného pôsobenia použitých kultúr na ten istý kmeň *S. aureus* sme zostrojili závislosť nárastu *S. aureus* 2064 v stacionárnej fáze, (t.j. rozdielu medzi jeho konečným a počiatočným obsahom), od prídavku oboch kultúr. Z lineárneho grafického znázornenia a tiež z uvedených rovníc 1 (pre kultúru Fresco) a 2 (pre kultúru A) je možné vypočítať, aký nadbytok BMK musí byť na začiatku fermentácie pri teplote 25 °C, aby maximálny nárast *S. aureus* neprekročil limity definované v Nariadení (ES) č. 2073/2005. Hoci pri použití kultúry A sme nepokryli tak široký rozsah počiatočných počtov ako pri kultúre Fresco, zo smerníc závislostí je jasné, že kultúra A mala silnejší inhibičný účinok na rast *S. aureus* 2064.



Obr. 5: Grafické znázornenie závislosti vplyvu počiatočného množstva kultúry Fresco (◆) a kultúry A (■) na nárast *Staphylococcus aureus* 2064 pri teplote 25 °C

Fig. 5: The effect of initial number of Fresco (◆) and culture A (■) on the net growth of *Staphylococcus aureus* 2064 in milk at 25 °C

$$N_{\max\_Sa} - N_{0\_Sa} = -0,7258 * N_{0\_Fr} + 5,6748$$

$$R^2 (N_{\max\_Sa} - N_{0\_Sa}) = 0,9281 \quad (1\blacklozenge)$$

$$N_{\max\_Sa} - N_{0\_Sa} = -2,1814 * N_{0\_A} + 12,605$$

$$R^2 (N_{\max\_Sa} - N_{0\_Sa}) = 0,9564 \quad (2\blacksquare)$$

## ZÁVER

Našími pokusmi sme kvantitatívne dokázali a popisali skutočnosť, že použitím vhodnej kompetitívnej kultúry baktérií mliečného kysnutia a zvyšovaním jej inokulácie sa dá spomaliť rastová rýchlosť *S. aureus* v exponenciálnej fáze a znížiť jeho maximálne počty dosiahnuté v stacionárnej fáze. Zastavenie rastu *S. aureus* 2064 nastalo pri všetkých študovaných teplotách. Inhibícia jeho nárastu bola tým účinnejšia, čím bol prídavok kompetitívnej mikroflóry vyšší a inkubačná teplota nižšia. V prípade dobre nadojeného mlieka s počiatočnými počtami stafylokoka poriadkovo  $10^2$  KTJ/ml by sa pri všetkých použitých koncentráciách kultúry Fresco nedosiahol nárast stafylokoka na hodnoty vyššie ako  $10^6$  KTJ/ml, ktoré by mohli znamenať riziko vzniku enterotoxínov. K inhibícii študovaného kmeňa dochádzalo predovšetkým vďaka tvorbe kyseliny mliečnej baktériami mliečného kysnutia, čo potvrdili aj pokusy s kultúrou A. Obe použité kultúry preukázali významný inhibičný účinok. Intenzívnejšiu inhibíciu pritom vykazovala kultúra A, pretože jej nižší počiatočný počet, (poriadkovo  $10^5$  KTJ/ml), dovolil dosiahnuť zvýšenie počtu *S. aureus* len o 1 log poriadok. Na udržanie rovnakého „nárastu“ *S. aureus*, (max. 1 log), v prípade kultúry Fresco boli potrebné vyššie počiatočné počty ako  $10^6$  KTJ/ml. Aplikáciou zákysových kultúr pri remeselnej výrobe ovčích syrov zo surového mlieka by sa takýmito počiatočnými koncentraciami mohlo zabezpečiť nielen dostatočné okyslenie mlieka, ale s najväčšou pravdepodobnosťou aj významné zníženie rizika enterotoxikóz spôsobených *S. aureus*.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-20-005605.

## LITERATÚRA

- ADAMS, M. R. 2001. Why fermented foods can be safe. In: ADAMS, M. R. - NOUT, R. M. J.: Fermentation and Food Safety. Gaithersburg: In: *Aspen Publishers, Inc.*, 2001, p. 39-52.
- ASLIM, B. - YUKSEKDAG, Z. N. - SARIKAYA, E. - BEYATLI, Y. 2005. Determination of bacteriocin-like substances produced by LAB isolated from Turkish dairy products. In: *LWT - Food Science and Technology*, vol. 38, 2005, No. 6, p. 691-694.

- ASPERGER, H. - ZANGERL, P. 2002. *Staphylococcus aureus*. In: ROGINSKI, H. - FUQUAY, J.W. - FOX, P.F.: Encyclopedia of Dairy Science. In: *San Diego Academic Press*, 2002, vol. 4, p. 2563-2569.
- BAIRD-PARKER, T. C. 2000. *Staphylococcus aureus*. In: LUND, B. M. - BAIRD-PARKER, T. C. - GOULD, G. W.: The Microbiological Safety and Quality of Food. Gaithersburg. In: *Aspen Publishers, Inc.*, 2000, vol. 1, p. 1317-1330.
- BARANYI, J. - ROBERTS, T. A. - MCCLURE, P. 1993. A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. In: *Food Microbiology*, vol. 10, 1993, no. 1, p. 43-59.
- GÖRNER, F. - ŠIMKOVICOVÁ, H. 1979. Dynamika obsahu stafylokokov pri fermentácii kyslomliečnych produktov. In: *Československá hygiena*, roč. 24, 1979, č. 2, s. 69-80.
- GÖRNER, F. - VALÍK, L. 2002. Mikrobiologické a technologické otázky výroby ovčieho hrudkového syr a bryndze. In: *Mliekarstvo*, roč. 33, 2002, č. 4, s. 16-17.
- GÖRNER, F. - VALÍK, L. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívateľov. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2004. ISBN 80-967064-9-7
- GRIEGER, C. - BEDNARČIKOVÁ, E. - VERDON, F. 1979. Vplyv zrenia ovčieho hrudkového syra na rastovú krivku *S. aureus*. In: *Veterinárství*, roč. 29, 1979, s. 407-409.
- HERIAN, K. 2002. Zásady správnej výroby ovčích hrudkových syrov. In: *Mliekarstvo*, roč. 33, 2002, č. 1, s. 42-45.
- HOLZAPFEL, W. H. 1997. Use of starter cultures in fermentation on household scale. In: *Food control*, vol. 8, 1997, no. 5/6, p. 241-258.
- Nariadenie komisie (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériách pre potraviny. NORMANNO, G. - LA SALANDRA, G. - DAMBROSIO, A. - QUAGLIA, N.C. - CORRENTE, M. - PARISI, A. - SANTAGADA, G. - FIRINU, A. - CRISSETTI, E. - CELANO, G.V. 2007. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 115, 2007, no. 3, p. 290-296.
- STN ISO 6888. 1997. Všeobecné pokyny na stanovenie počtu baktérií *S. aureus*.
- STN ISO 15214. 2002. Horizontálna metóda na stanovenie počtu mezofilných kyslomliečnych baktérií.
- VALÍK, L. - GÖRNER, F. - SONNEVELD, K. - POLKA, P. 2004. Faktory ovplyvňujúce fermentáciu ovčieho hrudkového syra na salaši. In: ŠTĚTINA, J. - ČURDA, L.: Celostátní přehledky sýrů, 2004: Výsledky přehledek a sborník přednášek semináře Mléko a sýry 2004. Praha: Česká společnost chemická, 2004a, s. 85-87. ISBN 978-80-86238-42-5
- VALÍK, L. - GÖRNER, F. - POLKA, P. - SONNEVELD, K. 2004. Fermentácia (kysnutie) ovčieho hrudkového syra v podmienkach salašnej výroby. In: *Chov oviec a kôz*, roč. 24, 2004b, s. 23-24.
- VALÍK, L. - SONNEVELD, K. - GÖRNER, F. 2004. The Lump Cheese from Raw Sheep Milk: Pre-Bryndza Cheese. In: IDF Symposium on Cheese: Ripening, Characterization & Technology, Book of Abstracts. Prague, Czech Republic, 2004, p.112.
- VASIL, M. - FOTTA, M. - ELEČKO, J. 2005. Výskyt enterotoxínov u kmeňov *S. aureus* izolovaných z ovčieho mlieka. In: *Mliekarstvo*, roč. 36, 2005, č. 3, s. 32.
- VASIL, M. - FOTTA, M. - ELEČKO, J. 2007. Enterotoxin production in *Staphylococcus sp.* isolated from sheep milk. In: *Slovak J. Anim. Sci.*, vol. 40, 2007, no. 3, p. 132-140.

**Adresa autorov:** Ing. Alžbeta Medved'ová, Doc. Ing. Ľubomír Valík, PhD., Ing. Barbora Bajúsová, Oddelenie výživy a hodnotenia potravín, Ústav biochémie, výživy a ochrany zdravia, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita v Bratislave, Radlinského 9, 812 37 Bratislava 1; e-mail:alzbeta.medvedova@stuba.sk