

## KVANTITATÍVNA ANALÝZA RASTU *ESCHERICHIA COLI* A *LACTOCOCCUS LACTIS* subsp. *LACTIS* PRI SÚBEŽNEJ KULTIVÁCIÍ V MLIIEKU

### Quantitative analysis of growth of *Escherichia coli* in co-culture with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in milk

D. LIPTÁKOVÁ, Ľ. VALÍK, B. MEDVEĎOVÁ, A. HUDECOVÁ

Slovenská technická univerzita, Bratislava; Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic

---

#### ABSTRACT

The growth of the *Escherichia coli* strain isolated from lumpy goat cheese was studied in milk and in co-culture with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. The strain in mono-culture showed very good rate of growth in milk, reaching the numbers higher than 8 log CFU/ml during the stationary phase at all the tested temperatures. The minimal growth temperature of 9.5 °C was determined from secondary mathematical equation ( $Gr_{Ec} = 0.0327 \cdot T - 0.3101$ ;  $R^2 = 0.9755$ ). Primary modelling of the growth curves of two competitive organisms showed that only *L. lactis* inoculum of  $10^7$  CFU/ml at temperature from 18 to 21 °C could suppress the growth of *E. coli* and keep its numbers during stationary phase at maximal density of  $10^4$  CFU/ml. Combined effect of the initial inoculation of *L. lactis* and incubation temperature on *E. coli* was described with the highly significant second order equation:  $Gr_{Ec-Lc} = 0.02104 + 0.000693 \cdot T^2 - 0.000727 \cdot T \cdot N_{0-Lc}$ ; ( $R^2_{(u)} = 0.98$ ).

**Key words:** *Escherichia coli*, lactic acid bacteria, modelling of growth

---

#### ÚVOD

*Escherichia coli* patrí medzi najbežnejšie mikrobiálne kontaminanty v potravinárstve. Z hľadiska indikátrovej funkcie tento organizmus zaraďujeme medzi koliformné baktérie. Tvorí gramnegatívne kokoidné paličky, ktoré fermentujú laktózu za vzniku rôznych kyselín, predovšetkým kyseliny mliečnej, octovej a plynov ( $CO_2$  a  $H_2$ ) počas kultivácie pri 35 °C až 37 °C. Fermentuje glukózu, sacharózu, manitol a z tryptofánu tvorí indol (Görner a Valík, 2004; Votava a i., 2003).

V potravinárskej praxi je *E. coli* považovaná za kontaminanta, ktorý znehodnocuje viaceré potravinárske produkty. Pri výrobe syrov s nízkodohrievanou syrovinou (pri 36 °C až 40 °C) fermentáciou zbytkovej laktózy

vyvoláva ich skoré nadúvanie. Niektoré toxigénne kmene *E. coli* sa dokážu prichytiť na nerezových povrchoch technologických zariadení. Krížovou kontamináciou počas výroby alebo manipulácie s potravinami vstupujú napríklad shiga-toxín produkujúce kmene do potravinového reťazca (Görner a Valík, 2004; Rivas a i., 2007; Lim a i., 2007). Pasterizačné a sterilizačné teploty *E. coli* devitalizujú, naopak chladenie rast *E. coli* iba spomalí. Massa a i. (1999) vo svojej práci poukázali na veľmi dobrý rast *E. coli* O157:H7 pri 8 °C v surovom mlieku, pričom zaznamenali jej nárast o 2 až 3 log poriadky po 9 až 17 dňoch inkubácie.

Rast *E. coli* dokážu čiastočne limitovať baktérie mliečneho kysnutia, a to vďaka produkcii organických kyselín (pokles pH) a rôznych antimikrobiálnych

---

**Correspondence:** E-mail: denisa.laukova@stuba.sk

faktorov, utilizácii kyslíka (pokles redoxného potenciálu) a zníženia nutričných faktorov v prostredí. Podľa viacerých autorov (Glass a i., 1992; Burdová a Lauková, 2001; Gran a i., 2003; Mufandaedza a i., 2006) zníženie aktívnej kyslosti  $\text{pH} < 5,0$ , rast a rozmnožovanie *E. coli* obmedzuje až zastavuje. Podľa Pressera a i. (1998) nízke  $\text{pH}$  a nedisociovaná forma kyseliny mliečnej sú hlavné faktory limitujúce rast a rozmnožovanie *E. coli*.

U ľudí môže *E. coli* spôsobovať ochorenia močového traktu, sepsy, meningitídy, infikovanie rán a niektoré kmene aj infekcie tráviaceho traktu sprevádzané hnačkami, pričom vážnejšie prípady ochorenia môžu končiť až smrťou (Votava a i., 2003; Caro a García-Arnesto, 2007).

V súčasnosti sa potravinárski mikrobiológovia a technológovia spätne obracajú k princípom biokonzervácie, pričom prídavok špecifických druhov a kmeňov baktérií mliečneho kysnutia môže spomaliť rast kontaminujúcich mikroorganizmov a predĺžiť tak trvanlivosť produktu (Presser a i., 1997). Z tohto dôvodu existuje záujem odbornej praxe o aktualizované kvantitatívne charakterizácie rastu mikroorganizmov a tiež o rast kontaminantov pri spoločnej kultivácii so svojimi antagonistami rastu (Medved'ová a i., 2007; Liptáková a i., 2007). V tejto súvislosti sme sa v tejto práci zamerali na popisanie dynamiky vzájomného vzťahu medzi *Escherichia coli* a čistou mezofilnou kultúrou *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* v mlieku v závislosti od teploty. Cieľom našej práce bolo tiež hodnotiť získané výsledky vo vzťahu k podmienkam remeselnej výroby syrov zo surového mlieka.

## MATERIÁL A METÓDY

Kmeň *Escherichia coli* bol pôvodne izolovaný z ovčieho hrudkového syra vyrobeného zo surového mlieka na selektívnom médiu Chromocult Coliform agar (Merck, Darmstadt, Nemecko) pri 37 °C 24 h. Na povrchu tohto agaru tvorí *E. coli* tmavomodré kolónie vďaka štiepeniu X-glukuronidu enzýmom  $\beta$ -D-glukuronidáza a salmon-galaktóza substrátu enzýmom  $\beta$ -D-galaktózidáza. Kmeň bol následne uchovávaný na šikmom GTK agare (Imuna, Šarišské Michaľany, SR) pri teplote 5 °C. Na inokuláciu vzorky bola použitá suspenzia *E. coli* s denzitou  $N_{0, Ec} \cong 10^2$  KTJ/ml, pripravená z 24 h kultúry kmeňa vyrasteného na GTK agare pri 37 °C.

Kultúra *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* je čistá kultúra mezofilných baktérií mliečneho kysnutia, ktorá bola izolovaná z acidofilného mlieka (Rajo, Bratislava, SR) a uchovávaná v M17 bujóne (Merck, Darmstadt, Nemecko) pri teplote 5 °C. Otestovali sa jej rastové schopnosti pri teplote 10, 30, 40 a 45 °C, ďalej tolerancia voči  $\text{pH}$  9,2 a 9,6, tolerancia voči NaCl v koncentracii

4 a 6,5 % (w/w) v M17 bujóne (Merck, Darmstadt, Nemecko). Na rodovú identifikáciu kmeňa sme využili PCR analýzu, ktorú vykonala RNDr. Barbora Vidová z Ústavu molekulárnej biológie SAV a následne fenotypická identifikácia bola doplnená systémom API (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francúzko). Na jednotlivé experimenty bola použitá 24 h kultúra s denzitou  $N_{0, Le} \cong 10^4$  a  $N_{0, Le} \cong 10^7$  KTJ/ml, pripravená z 24 h kultúry kmeňa vyrasteného v M17 bujóne pri 37 °C.

Paralelné vzorky UHT mlieka s obsahom tuku 15 g/l boli v sérii experimentov súčasne inokulované čistou 24 h kultúrou *E. coli* a 24 h kultúrou *L. lactis* a inkubované pri teplotách 10 °C, 12 °C, 15 °C, 18 °C, 21 °C a 25 °C. Pre potvrdenie inhibičného účinku mliečnych baktérií na dynamiku rastu *E. coli* sme vykonali aj pokusy inkubácie čistej kultúry *E. coli* v UHT mlieku pri teplotách od 10 °C do 37 °C.

Zo zistených zmien počtov *E. coli* a *L. lactis* v UHT mlieku v závislosti od času inkubácie sme vypočítali pomocou Baranyiho D-modelu (1993) rastové parametre (rastová rýchlosť, trvanie lag-fázy), ktoré boli podrobené analýze v sekundárnej fáze matematického modelovania mikrobiálneho rastu.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

*Escherichia coli* rástla v mlieku už pri najnižších testovaných teplotách s generačným časom 28 h (10 °C) a 24 h (12 °C), pričom konečné počty v stacionárnej fáze boli rádovo  $10^8$  KTJ/ml. Zvyšovaním teploty sa rastová rýchlosť zvyšovala (z 0,081 log KTJ/h.ml pri 10 °C až na 0,943 log KTJ/h.ml pri 37 °C) a lag-fáza sa skrátila z 25 hodín pri 10 °C na 54 minút pri 37 °C (tab. 1). Syry a bryndza sa v salašnických podmienkach vyrábajú zo surového mlieka a kysnutie mlieka prebieha pri teplote 18 až 21 °C (Valík a i., 2004). Pri tejto pomerne vysokej teplote by mohlo za určitých podmienok, napríklad pri nízkych počtoch baktérií mliečneho kysnutia alebo nedostatočne rýchlej fermentácii mlieka, dôjsť k neprimeranému pomnoženiu *E. coli*, čo možno dokumentovať aj s nami zistenou dynamikou *E. coli*.

Súčasne pri každom odbere vzorky na mikrobiologickú analýzu bola stanovená aj aktívna kyslosť. K najvýznamnejším zmenám  $\text{pH}$  dochádzalo až na začiatku stacionárnej fázy rastu *E. coli*. Napríklad pri teplote 10 °C kleslo  $\text{pH}$  za 6 dní z hodnoty 6,7 na hodnotu 6,0, pričom v tomto čase bola denzita *E. coli*  $4,8 \cdot 10^8$  KTJ/ml a pri 37 °C poklesla aktívna kyslosť mlieka až na hodnotu 4,72 za 24 h. Marek a i. (2004) zaznamenali pokles aktívnej kyslosti pasterizovanej srvátky inokulovanej bunkami *E. coli*, pričom počas jej skladovania pri 15 °C pokleslo  $\text{pH}$  z hodnoty 5,5 na 4,2 vďaka metabolickej aktivite *E. coli*.

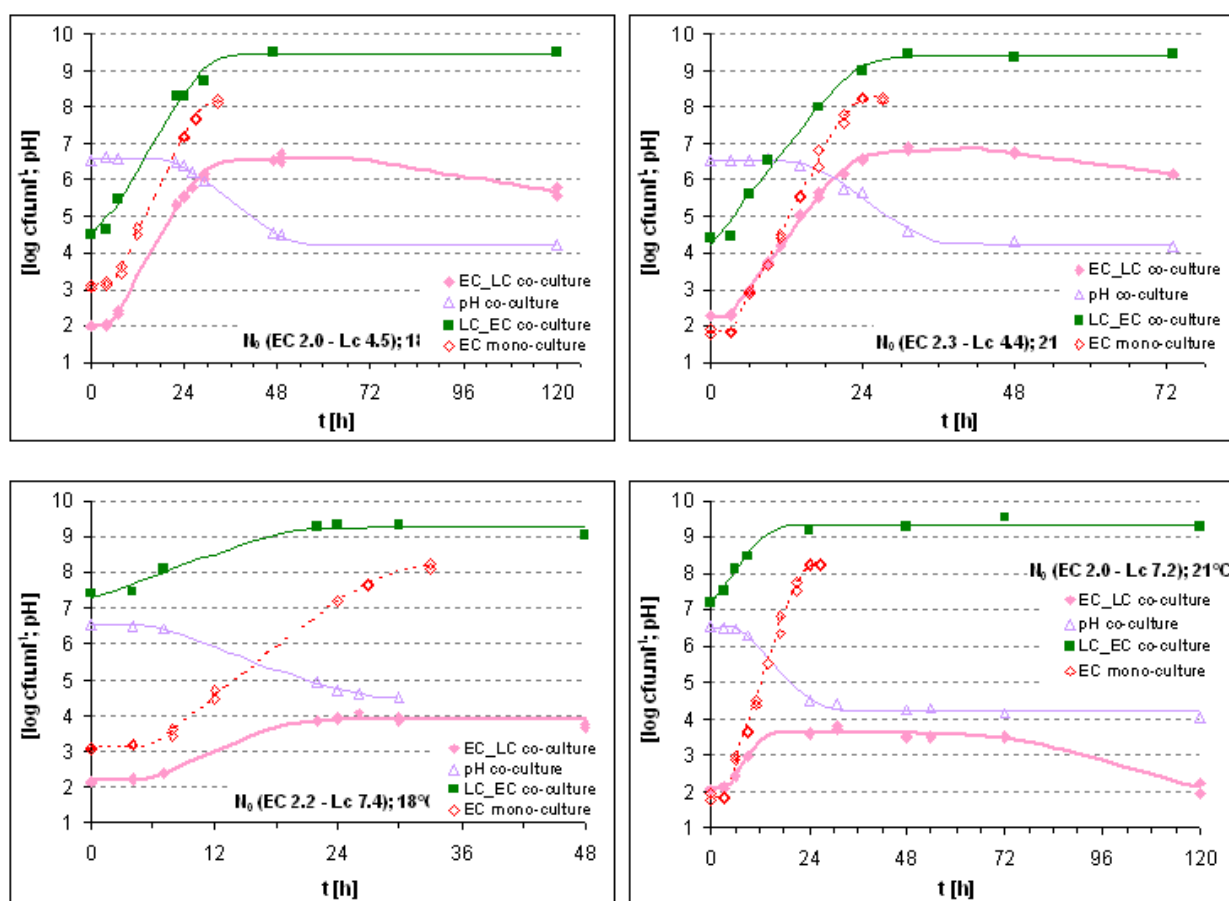
**Tab. 1: Rastové parametre *Escherichia coli* v mlieku v závislosti od teploty****Table 1: Growth parameters of *Escherichia coli* in milk in response to temperature**

Temperature	Gr <sub>Ec</sub>	Lag <sub>Ec</sub>
10 °C	0,081	25,2
12 °C	0,096	13,1
15 °C	0,169	8,5
18 °C	0,229	5,9
21 °C	0,35	3,3
25 °C	0,466	3,0
30 °C	0,681	1,5
37 °C	0,943	0,9

Gr<sub>Ec</sub> - rastová rýchlosť *E. coli* (log KTJ/h), Lag<sub>Ec</sub> - lag-fáza *E. coli* (h); Gr<sub>Ec</sub> – growth rate of *E. coli* (log KTJ/h), Lag<sub>Ec</sub> – lag phase of *E. coli* (h)

Vplyv teploty na rastovú rýchlosť *E. coli* bolo možné popísať Ratkowského modelom ( $\sqrt{\text{Gr}} = 0,0264 \cdot T + 0,0134$ ,  $R^2_{(\sqrt{\text{Gr}})} = 0,9905$ ), ktorý bol použitý aj v prípade *Bacillus cereus* (Valík a i., 2003) a *Candida maltosa* YP1 (Liptáková a i., 2006). Zo závislosti rastovej rýchlosti od teploty bola vypočítaná minimálna teplota rastu *E. coli* na 9,5 °C. Skracovanie lag-fázy *E. coli* v mlieku v závislosti od zvyšujúcej sa teploty inkubácie je štatisticky vysoko významné podľa rovnice:  $\ln \text{lag} = -0,1184 \cdot T + 4,0057$  ( $R^2_{(\ln \text{lag})} = 0,9372$ ).

Prídavky čistej kultúry *L. lactis* spôsobili zníženie dynamiky rastu *E. coli* v porovnaní s monokultúrou a to predovšetkým produkovanou kyselinou mliečnou a následným rýchlym poklesom pH v mlieku (obr. 1a-d). Napríklad počiatočná denzita *L. lactis* 10<sup>7</sup> KTJ/ml pozastavila rast *E. coli* na koncentráciách nižších ako v prípade monokultúrnej kultivácie (tab. 2), kedy konečné počty *E. coli* dosiahli hodnoty 1,1·10<sup>5</sup> KTJ/ml pri 10 °C,



Obr. 1a, 1b, 1c a 1d: Dynamika rastu *Escherichia coli* a kultúry *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (4 a 7 log KTJ/ml) počas spoločnej kultivácie v mlieku pri teplote 18 a 21 °C

Fig. 1a, 1b, 1c a 1d: Growth dynamics of *Escherichia coli* and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (4,0 a 7,0 log KTJ/ml) during co-culture in milk at 18 and 21 °C

1,1 až 2,5.10<sup>4</sup> KTJ/ml (12 až 15 °C) a 4,0 až 7,1.10<sup>3</sup> KTJ/ml (18 až 25 °C). Hodnoty rastových rýchlostí čistej kultúry *E. coli* v mlieku bez prídavku *L. lactis* sa napr. pri teplotách 10 °C a 25 °C pohybovali v intervale 0,081 až 0,466 log KTJ/h.ml, kým v mlieku s vysokým prídavkom laktokoka (10<sup>7</sup> KTJ/ml) boli rastové rýchlosti *E. coli* o 27 až 40 % nižšie (0,049 a 0,339 log KTJ/h.ml; tab. 2). Konečné denzity laktokokov sa v stacionárnej fáze rastu pohybovali rádovo medzi 8 až 9 log KTJ/ml. Hodnoty aktívnej kyslosti v mlieku so spoločne kultivovanými kultúrami *E. coli* a *L. lactis* (N<sub>0</sub> = 7 log KTJ/ml) klesali pri teplote 18 °C až 21 °C po takmer 12 h inkubácie (obr. 1c-d).

Týmito výsledkami vyplývajúci zo spoločnej kultivácie baktérií mliečného kysnutia a kontaminanta *E. coli* sa potvrdili nálezy Mareka a i. (2004), ktorí v nepasterizovanej srvátke získanej pri výrobe čedarových syrov zistili, že až vysoké počiatočné koncentrácie baktérií mliečného kysnutia 10<sup>7</sup> KTJ/ml dokázali potlačiť, avšak nie úplne eliminovať, rast *E. coli* O157:H7 počas jej uchovávaní pri 4 °C, 10 °C a 15 °C.

**Tab. 2: Rastové parametre *Escherichia coli* v závislosti od teploty v spoločnej kultivácii s kultúrou *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (N<sub>0\_Lc</sub> = 10<sup>7</sup> KTJ/ml) v mlieku**

**Table 2: Growth parameters of *Escherichia coli* in response to temperature in co-culture with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (N<sub>0\_Lc</sub> = 10<sup>7</sup> KTJ/ml) in milk**

Temperature	Gr <sub>Ec</sub>	Nsf <sub>Ec</sub>	Gr <sub>pH</sub>	Gr <sub>Lc</sub>
10 °C	0,049	1,1.10 <sup>5</sup>	-0,025	0,02
12 °C	0,060	2,5.10 <sup>4</sup>	-0,030	0,071
15 °C	0,083	1,1.10 <sup>4</sup>	-0,088	0,082
18 °C	0,121	7,1.10 <sup>3</sup>	-0,105	0,105
21 °C	0,166	4,0.10 <sup>3</sup>	-0,121	0,152
25 °C	0,399	6,3.10 <sup>3</sup>	-0,28	0,219

Gr<sub>Ec</sub> - growth rate of *E. coli* (log KTJ/h), Nsf<sub>Ec</sub> - *E. coli* end count in stationary phase (log KTJ/ml), Gr<sub>pH</sub> - rate of pH decrease, Gr<sub>Lc</sub> - growth rate of *L. lactis* (log KTJ/h)

Vplyv *L. lactis* na *E. coli* bol viditeľný aj pri nízkych prídavkoch *L. lactis* (10<sup>4</sup> KTJ/ml), nakoľko denzity *E. coli* v stacionárnej fáze nedosiahli svoje maximálne hodnoty. Pre ilustráciu, pri počiatočnej koncentrácii 10<sup>4</sup> KTJ/ml *L. lactis*, denzita *E. coli* v stacionárnej fáze dosahovala hodnoty od 1,6.10<sup>6</sup> do 9,1.10<sup>7</sup> KTJ/ml (tab. 3) v závislosti od teploty, kým pri mono-kultúrach sa konečné denzity *E. coli* pohybovali rádovo 10<sup>8</sup> KTJ/ml. Zvýšené prídavky *L. lactis* viedli aj k zníženiu rastových rýchlostí *E. coli* v mlieku. Napríklad pri teplote inkubácie 18 °C a 21 °C

bola rastová rýchlosť *E. coli* v mono-kultúre (Gr<sub>mono-culture, 18 °C</sub> = 0,229 log KTJ/h.ml; Gr<sub>mono-culture, 21 °C</sub> = 0,35 log KTJ/h.ml) o 18 %, resp. o 32,5 % vyššia ako rastová rýchlosť *E. coli* (Gr<sub>co-culture, 18 °C</sub> = 0,187 log KTJ/h.ml; Gr<sub>co-culture, 21 °C</sub> = 0,236 log KTJ/h.ml) v spoločnej kultivácii s *L. lactis* o koncentrácii 10<sup>4</sup> KTJ/ml (obr. 1a-b). Rastové rýchlosti laktokokov boli približne rovnaké alebo nižšie ako rastové rýchlosti *E. coli* v spoločnej kultivácii a konečné denzity *L. lactis* dosahovali poriadkovo 8 až 9 log poriadkov (tab. 3).

**Tab. 3: Rastové parametre *Escherichia coli* v závislosti od teploty v spoločnej kultivácii s kultúrou *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (N<sub>0\_Lc</sub> = 10<sup>4</sup> KTJ/ml) v mlieku**

**Table 3: Growth parameters of *Escherichia coli* in response to temperature in co-culture with *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (N<sub>0\_Lc</sub> = 10<sup>4</sup> KTJ/ml) in milk**

Temperature	Gr <sub>Ec</sub>	Nsf <sub>Ec</sub>	Gr <sub>pH</sub>	Gr <sub>Lc</sub>
10 °C	0,090	9,1.10 <sup>7</sup>	-0,047	0,062
12 °C	0,109	7,6.10 <sup>7</sup>	-0,047	0,084
15 °C	0,121	3,3.10 <sup>7</sup>	-0,086	0,115
18 °C	0,187	3,2.10 <sup>6</sup>	-0,083	0,180
21 °C	0,236	1,6.10 <sup>6</sup>	-0,125	0,225
25 °C	0,412	1,1.10 <sup>7</sup>	-0,154	0,43

Gr<sub>Ec</sub> - growth rate of *E. coli* (log KTJ/h), Nsf<sub>Ec</sub> - *E. coli* end count in stationary phase (log KTJ/ml), Gr<sub>pH</sub> - rate of pH decrease, Gr<sub>Lc</sub> - growth rate of *L. lactis* (log KTJ/h)

So zvyšujúcim sa prídavkom *L. lactis* a so znižujúcou sa teplotou klesala rastová rýchlosť *E. coli* v mlieku (obr. 2). Spoločný vplyv teploty a počiatočnej inokulácie *L. lactis* na rastovú rýchlosť vyjadruje rovnica 1, ktorú je možné použiť na predpovedanie správania sa *E. coli* v mlieku s prídavkom *L. lactis* s 98 % pravdepodobnosťou a variačným koeficientom 12,9 %:

$$\text{Gr}_{\text{Ec}_Lc} = 0,02104 + 0,000693 \cdot T^2 - 0,000727 \cdot T \cdot N_{0_Lc} \quad R^2 = 0,98 \quad (1)$$

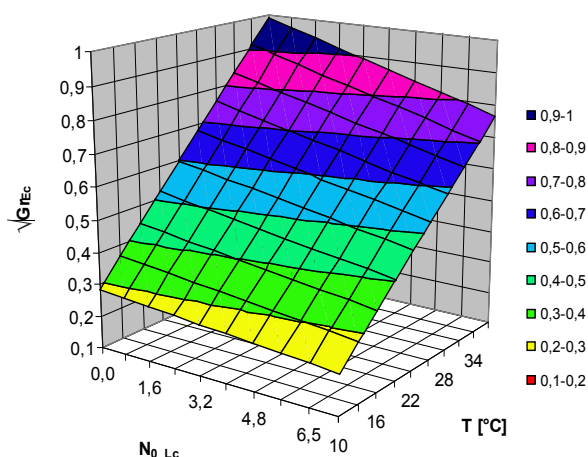
kde:

Gr<sub>Ec\_Lc</sub> - rastová rýchlosť *E. coli* v log KTJ/h.ml,

T - teplota v °C,

N<sub>0\_Lc</sub> - počiatočná inokulácia *L. lactis* v KTJ/ml.

Závislosť konečných počtov *E. coli* od spoločného vplyvu teploty a počiatočnej inokulácie *L. lactis* (obr. 3) bolo možné popísať viacparametrovou rovnicou (2), ktorá sa s 98 % pravdepodobnosťou a variačným koeficientom 3,9 % dá použiť na predpovedanie správania sa *E. coli* v mlieku s prídavkom *L. lactis*.



**Obr. 2:** Spoločný vplyv teploty a počiatkovej inokulácie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* na rastový rýchlosť *Escherichia coli* počas súbežnej kultivácie v mlieku

**Fig. 2:** Combined effect of temperature and initial inoculation of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* on growth rate of *Escherichia coli* during concurrent cultivation in milk

$$N_{\max\_Ec\_Lc} = 10,05 - 0,123 * N_{0\_Lc}^2 + 0,417 * N_{0\_Lc} + 0,00309 * T^2 - 0,155 * T - 0,00727 * T * N_{0\_Lc}$$

$$R^2 = 0,98 \quad (2)$$

kde:

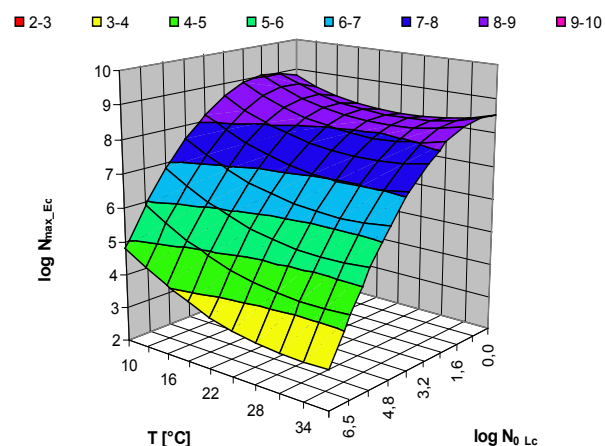
$N_{\max\_Ec\_Lc}$  - koncentrácia *E. coli* v stacionárnej fáze v KTJ/ml,

$N_{0\_Lc}$  - počiatková inokulácia *L. lactis* v KTJ/ml,

$T$  - teplota v °C.

Podľa Potravinového kódexu SR je potrebné udržať množstvo koliformných baktérií vrátane *E. coli* v ovčom a kozom hrudkovom syre vyrábanom zo surového mlieka na hodnotách nižších ako  $10^4$  KTJ/ml. V prípade, že by počet koliformných baktérií prekročil hodnotu  $10^6$  KTJ/ml, mohli by sme spozorovať kazenie potraviny aj senzorycky, vznikom tzv. „off-flavour“.

Zvýšený prídavok *L. lactis* do mlieka ( $10^7$  KTJ/ml) na začiatku inkubácie viedol k rýchlemu poklesu aktívnej kyslosti na hodnoty nižšie ako pH 5,0 ( $Gr_{pH\ 18^\circ C} = -0,105\ h^{-1}$ ;  $Gr_{pH\ 25^\circ C} = -0,28\ h^{-1}$ ; tab. 2). Podľa Brocklehursta a Wilsona, (2000) bola vypočítaná koncentrácia nedisociovej formy kyseliny mliečnej pre pH = 4,1 a  $pK_{LA\ 25^\circ C} = 3,86$  na hodnotu 0,44 %, pričom spolupôsobenie všetkých spomenutých faktorov viedlo k pozastaveniu rastu *E. coli* na koncentrácii nižšej ako  $2,5 \cdot 10^4$  KTJ/ml pri všetkých teplotách, okrem  $10^\circ C$ , čím sa podarilo splniť požiadavku Potravinového kódexu.



**Obr. 3:** Závislosť množstva *Escherichia coli* v stacionárnej fáze od spoločného vplyvu teploty a počiatkovej inokulácie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* počas súbežnej kultivácie v mlieku

**Fig. 3:** Dependence of amount of *Escherichia coli* in stationary phase from combined effect of temperature and initial inoculation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* during concurrent cultivation in milk

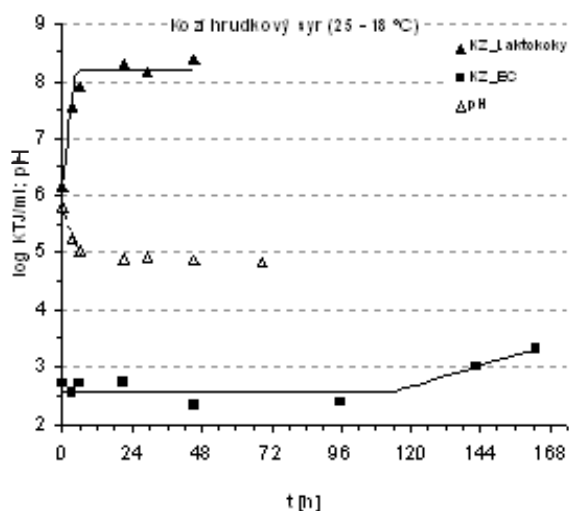
Pri zníženej inokulácii kultúrou *L. lactis* ( $10^4$  KTJ/ml) bol pozorovaný nižší inhibičný účinok na kultúru *E. coli* ( $Gr_{pH\ 18^\circ C} = -0,083\ log\ KTJ/h.ml$ ;  $Gr_{pH\ 25^\circ C} = -0,154\ log\ KTJ/h.ml$ ; tab. 3), pričom koncentrácia nedisociovej formy kyseliny mliečnej bola vypočítaná pri  $25^\circ C$  a pH = 4,1 na 0,33%. Konečné denzity *E. coli* v stacionárnej fáze boli do  $9,1 \cdot 10^7$  KTJ/ml.

Kyselina mliečna ako slabá organická kyselina produkovaná baktériami mliečného kysnutia dokáže na rozdiel od silných kyselín (HCl) parciálne disociovať. Jej nedisociovaná forma vďaka svojmu lipofilnému charakteru prestupuje cez plazmatickú membránu do cytoplazmy buniek jednoduchou difúziou, v nej následne disociuje, a tým dochádza k zníženiu intracelulárneho pH (Coroller a i., 2005). Všetky snahy bunky o obnovenie homeostázy idú na úkor vlastných metabolických procesov, akými sú rast a rozmnožovanie (Brul a Coote, 1999; Holyolák a i., 1999). Následne môže dôjsť ku kumulácii toxického aniónu v intracelulárnom prostredí, čím sa narušia ďalšie metabolické procesy v bunke (Piper a i., 1998). Ďalším možným mechanizmom inhibície rastu mikroorganizmov kyselinou mliečnou je podľa Pressera a i. (1997) chelatácia kovov, napríklad železa, nevyhnutných pre rast buniek. Lin a i. (1996) a Jordan a i. (1999) sledovali mechanizmy adaptácie komenzálnej a patogénnej *E. coli* voči nízkemu pH (pH 2 a 3). Kmene *E. coli* sa voči kyslému pH v prostredí bránili prostredníctvom arginin-závislého a glutamát-závislého

adaptačného mechanizmu. V prostredí s kyslým pH dochádzalo k intracelulárnej dekarboxylácii arginínu a kyseliny glutámovej a k súčasnej spotrebe  $H^+$  protónov uvoľnených zo slabých organických kyselín, čím bunky udržovali vnútorné pH v homeostáze.

V nadväznosti na predchádzajúce experimenty, v ktorých sme sa venovali analýze rastu *E. coli* v mlieku v prítomnosti kompetitívnych kultúr baktérií mliečného kysnutia, v tejto práci sme pokračovali charakterizáciou rastu kontaminanta v modelovom syre z kozieho mlieka. Syr bol vyrobený zo surového mlieka za laboratórnych podmienok bez prídavku doplnkovej mezofilnej kyskovej kultúry a jeho zrenie prebiehalo pri 18 °C.

Počiatkové koncentrácie *E. coli* v syre z kozieho mlieka (obr. 4) boli stanovené na  $5,0 \cdot 10^2$  KTJ/g. Po 114 h lag- fáze vzrástol obsah *E. coli* o 1 log poriadok rýchlosťou 0,015 log KTJ/h.ml na konečné počty  $2,0 \cdot 10^3$  KTJ/g. Vysoký počiatkový obsah natívnych laktokokov, 6,15 log, a laktobacilov, 7,20 log, v kozom syre ako aj rýchly pokles aktívnej kyslosti (z 5,79 na 5,24 rýchlosťou  $-0,137 \text{ h}^{-1}$ ) zabezpečili, že počas celej doby uchovávania kozieho syra (7 dní pri 18 °C) nedošlo k prekročeniu limitov pre *E. coli*, ktoré by viedli k znehodnoteniu produktu alebo k produkcii toxínov ohrozujúcich zdravie konzumenta. Vernozy-Rozand a i. (2005) stanovili pokles aktívnej kyslosti v syre vyrobenom zo surového kozieho mlieka zo 6,7 na 4,3 po 5 dňoch, čo následne viedlo k parciálnej inhibícii rastu *E. coli* O157:H7 ( $N_0 = 10^1$  až  $10^2$  KTJ/ml v mlieku).



Obr. 4: Dynamika rastu mikroorganizmov a zmeny hodnôt pH počas zrenia kozieho hrudkového syra bez prídavku štartovacej kultúry pri teplote 18 °C

Fig. 4: Growth dynamics of microorganisms and changes in pH during maturation of lumpy goat cheese without addition of initial culture at 18°C

## ZÁVER

V našej práci sme dokázali, že počiatková koncentrácia baktérií mliečného kysnutia aspoň  $10^6$  až  $10^7$  KTJ/ml, resp. KTJ/g, dokáže udržať zdravotne a technologicky nežiaduce mikroorganizmy pod kontrolou v súlade s legislatívnymi nariadeniami. Produkcia kyseliny mliečnej kyskavými kultúrami a rýchly pokles aktívnej kyslosti na hodnoty rovné a nižšie ako pH 5,0 zohrali významnú úlohu v parciálnej inhibícii rastu *E. coli* v mlieku i kozom syre, pričom jej konečné denzity dosahovali počty rovné a nižšie ako  $10^4$  KTJ/ml, resp. KTJ/g. Nižšie počiatkové koncentrácie laktokokov v mlieku umožnili relatívne rýchly rast *E. coli*, pričom sa konečné denzity pohybovali v rozmedzí do  $9,1 \cdot 10^7$  KTJ/ml.

Ďalej sme našimi pokusmi potvrdili fakt, že teplota fermentácie minimálne 18 °C je vhodná pre spomalenie rastu sledovaného kontaminanta využitím princípov biokonzervácie, čo je v súlade s prácou Valíka a i. (2004), podľa ktorej sú teploty 18 až 21 °C veľmi dôležité z technologického hľadiska pri remeselnej výrobe syrov zo surového ovčieho mlieka.

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja na základe Zmluvy č. APVV-20-005605 a z grantu MŠ VEGA č. 1/3488/06.

## LITERATÚRA

- 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.
- BROCKLEHURST, T. F. – WILSON, P. D. G. 2000. The role of lipids in controlling microbial growth. In: *Grasas y Aceites*, vol. 51, 2000, no. 1-2, p. 66-73.
- BRUL, S. – COOTE, P. 1999. Preservative agents in food. Mode of action and microbial resistance mechanisms. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 50, 1999, no. 1-2, p. 1-17.
- BURDOVÁ, O. – LAUKOVÁ, A. 2001. Zdravotná neškodnosť mlieka a mliečnych výrobkov. In: *Mliekarstvo*, roč. 32, 2001, č. 1, s. 22-23.
- CARO, I. – GARCÍA-ARMESTO, M. R. 2007. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a Spanish raw ewe's milk cheese. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 116, 2007, no. 3, p. 410-413.
- COROLLER, L. – GUERROT, V. – HUCHET, V. – LE MARC, Y. – MAFART, P. – SOHIER, D. – THUAULT, D. 2005. Modelling the influence of single acid and mixture on bacterial growth. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 100, 2005, no. 1-3, p. 167-178.
- GLASS, K.A. – LOEFFELHOLZ, J.M. – FORD, P. – DOYLE, M.P. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 58, 1992, no. 8, p. 2513-2516.

- GÖRNER, F. - VALÍK, E. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívatin. 1. vyd. Bratislava : Malé centrum, 2004, ISBN 80-967064-9-7.
- GRAN, H. M. - GADAGA, H. T. - NARVHUS, J. A. 2003. Utilization of various starter cultures in the production of Amasi, a Zimbabwean naturally fermented raw milk product. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, 2003, no. 1, p. 19-28.
- HOLYOLAK, C.D. - BRACEY, D. - PIPER, P.W. - KUHLER, K. - COOTE, P.J. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* weak-acid-inducible ABC transporter PDR12 transports fluorescein and preservative anions from the cytosol by an energy-dependent mechanism. In: *Journal of Bacteriology*, vol. 181, 1999, no. 15, p. 4644-4652.
- JORDAN, K. N. - OXFORD, L. - O'BYRNE, C. P. 1999. Survival of low-pH stress by *Escherichia coli* O157:H7: Correlation between alterations in the cell envelope and increased acid tolerance. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 65, 1999, no. 7, p. 3048-3055.
- LIM, S. K. - LEE, H. S. - NAM, H. M. - CHO, Y. S. - KIM, J. M. - SONG, S. W. - PARK, Y. H. - JUNG, S. CH. 2007. Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003-2004. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 116, 2007, no. 2, p. 283-286.
- LIN, J. - SMITH, M. P. - CHAPIN, K. C. - BAIK, H. S. - BENNET, G. N. - FOSTER, J. W. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, 1996, no. 9, p. 3094-3100.
- LIPTÁKOVÁ, D. - VALÍK, E. - BAJÚSOVÁ, B. 2006. Effect of protective culture on the growth of *Candida maltosa* YP1 in yoghurt. In: *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 45, 2006, no. 4, p. 147-151.
- LIPTÁKOVÁ, D. - VALÍK, E. - LAUKOVÁ, A. - STROMPFOVÁ, V. 2007. Characterisation of *Lactobacillus rhamnosus* VT1 and its effect on the growth of *Candida maltosa* YP1. In: *Czech Journal of Food Science*, vol. 25, 2007, no. 5, p. 272-282.
- MAREK, P. - NAIR, M. K. M. - HOAGLAND, T. - VENKITANARAYANAN, K. 2004. Survival and growth characteristics of *Escherichia coli* O157:H7 in pasteurized and unpasteurized Cheddar cheese whey. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, 2004, no. 1, p. 1-7.
- MASSA, S. - GOFFREDO, E. - ALTIERI, C. - NATOLA, K. 1999. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8 °C. In: *Letters in Applied Microbiology*, vol. 28, 1999, no. 1, p. 89-92.
- MEDVEĐOVÁ, A. - VALÍK, E. - BAJÚSOVÁ, B. 2007. Kompetitívny účinok baktérií mliečného kysnutia na rast *Staphylococcus aureus*. In: *Slovak Journal of Animal Science*, roč. 40, 2007, č. 4, s. 196-203.
- MUFANDAEDZA, J. - VILJOEN, B. C. - FERESU, S. B. - GADAGA, T. H. 2006. Antimicrobial properties of lactic acid bacteria and yeast-LAB cultures isolated from traditional fermented milk against pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* strains. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 108, 2006, no. 1, p. 147-152.
- PIPER, P. - MAHÉ, Y. - THOMPSON, S. - PANJAITAN, R. - HOLYOLAK, C. - EGNER, R. - MÜHLBAUER, M. - COOTE, P. - KUHLER, K. 1998. The PDR12 ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. In: *The EMBO Journal*, vol. 17, 1998, no. 15, p. 4257-4265.
- PRESSER, K. A. - RATKOWSKY, D. A. - ROSS, T. 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 63, 1997, no. 6, p. 2355-2360.
- PRESSER, K.A. - ROSS, T. - RATKOWSKY, D. A. 1998. Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. In: *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 64, 1998, no. 5, p. 1773-1779.
- RIVAS, L. - FEGAN, N. - DYKES, G. A. 2007. Attachment of Shiga toxinogenic *Escherichia coli* to stainless steel. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 115, 2007, no. 1, p. 89-94.
- VALÍK, E. - GÖRNER, F. - LAUKOVÁ, D. 2003. Growth dynamics of *Bacillus cereus* and shelf-life of pasteurised milk. In: *Czech Journal of Food Science*, vol. 21, 2003, no. 6, p. 195-202.
- VALÍK, E. - GÖRNER, F. - POLKA, P. - SONNEVELD, K. 2004. Fermentácia (kysnutie) ovčieho hrudkového syra v podmienkach salašníckej výroby. In: *Chov oviec a kôz*, roč. 24, 2004, č. 1, s. 23-24.
- VERNOZY-ROZAND, C. - MAZUY-CRUCHAUDET, C. - BAVAI, C. - MONTET, M.P. - BONIN, V. - DERNBURG, A. - RICHARD, Y. 2005. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses. In: *International Journal of Food Microbiology*, vol. 105, 2005, no. 1, p. 83-88.
- VOTAVA, M. - ČERNOHORSKÁ, L. - HERPLDOVÁ, M. - HOLÁ, V. - MEJZLÍKOVÁ, L. - ONDROVČÍK, P. - RŮŽIČKA, F. - DVOŘÁČKOVÁ, M. - WOZNICOVÁ, V. - ZAHRADNÍČEK, O. 2003. Lékařská mikrobiologie speciální. 1. vyd. Brno: Neptun, 2003. ISBN 80-902896-6-5.

**Adresa autorov:** Liptáková Denisa, Valík Ľubomír, Medveďová Alžbeta, Hudecová Anna, Oddelenie výživy a hodnotenia potravín ÚBVOZ, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.