

OPAKOVATEĽNOSŤ STANOVENIA RASTOVÝCH PARAMETROV *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* REPEATABILITY OF GROWTH PARAMETERS OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

B. Bajúsová, E. Valík, D. Liptáková, A. Medved'ová

Abstract: *Staphylococcus aureus* is one of the ubiquitous contaminants of raw ewe's milk. Presence of the toxin producing strains and their enterotoxins in ewe's lump cheese produced from raw milk are dependent on various factors connected with animal health status and environmental, hygienical and technological conditions during production. On the other hand, fermentation and ripening resulting in specific intrinsic factors play key role in fate of this organism. In this work, an experimental survey and statistical evaluation of *Staphylococcus aureus* growth parameters is presented. Replicated growth curves of 15 strains were determined in milk at 15 °C. The results demonstrate that despite some inherent errors of the microbiological cultivation method, the growth curves and calculated growth rates can be determined with high repeatability represented with as low coefficient of variation (CV) as 7.1 % (for all the strains of *S. aureus* under study). The most accurate growth rate of the same strain was calculated from 6 growth curves resulted from two independent trials (CV = 1.2 %). The results confirmed the fact that the higher repeatability of growth curves and subsequent growth parameters is determined the best predictions can be postulated.

Kľúčové slová: *Staphylococcus aureus*, rastová čiara, prediktívna mikrobiológia

Staphylococcus aureus tvorí grampozitívne kokovité bunky, ktoré sa v kultúre vyskytujú vo forme strapcovitých zhlukov. Je fakultatívne anaeróbny, mezofilný, tvorí katalázu, ale oxidázu nie. Rastie v oblasti teplôt 7 až 48 °C a pH 4,2 až 9,3. Charakteristická je jeho halotolerantnosť ekvivalentná maximálne minimálnej hodnote $a_w = 0,83$ (21 % NaCl; Chen, 1989). Jeho kmene sa vyznačujú tvorbou termostabilných enterotoxínov, ktoré môže za aeróbných podmienok tvoriť už pri $a_w = 0,86$. *Staphylococcus aureus* sa principiálne nachádza na pokožke a mukózných membránach teplokrvných zvierat. Bežne sa nachádza v surovom mlieku a v syroch vyrobených zo surového mlieka. Jeho počty môžu byť v mlieku zvýšené, ak sa v stáde vyskytuje mastitídne ochorenie. V mliekarenskej praxi môže *S. aureus* kolonizovať technologické zariadenia na miestach, ktoré sa obtiažne čistia (Adams a Moss, 1995). V dobre nadojenom ovčom mlieku sa vyskytuje v počtoch medzi 100 až 200 KTJ.ml⁻¹ (Valík a kol., 2004). Podľa Aspergera a Zangerla (2002) sa za normálnych podmienok počas prvých 24 h dá očakávať jeho zvýšenie počtov o 1,5 až 3 logaritmickej poriadky. Preto aj súčasná legislatíva EÚ pripúšťa jeho maximálne limity v syroch vyrobených zo surového mlieka $m = 10^4$ a $M = 10^5$ KTJ.g⁻¹ (Regulation (ES) 2073/2005).

Všeobecným cieľom prediktívneho prístupu v potravinárskej mikrobiológii je na základe známych faktorov prostredia predpovedať rast mikroorganizmov a zhodnotiť jeho dôsledky pre bezpečnosť a trvanlivosť potravín (Roberts, 1995).

Prediktívna mikrobiológia využíva tzv. primárne a sekundárne matematické modely. K primárnym modelom najčastejšie zaraďujeme rastovú krivku v prípade rastu mikroorganizmov alebo tzv. letaltnú krivku v prípade ich devitalizácie.

Rast a rozmnožovanie mikrobiálnej populácie je zákonitý proces. Vo vhodnom prostredí vznikajú z jednej bakteriálnej bunky dve a ich počet sa ďalej s časom

zdvojnásobuje. V semilogaritmickom znázornení tento dej znázorňuje rastová krivka, ktorá má obyčajne sigmoidný tvar zahrňujúci jednotlivé fázy rastu. Z nich pre predikcie sú najdôležitejšie lag-fáza a tzv. fáza exponenciálneho alebo logaritmického rastu. Medzi najznámejšie primárne modely patria Gompertzova funkcia a Baranyiho dynamický model (Baranyi a kol., 1993; McKellar a Lu, 2004).

Rast mikroorganizmov závisí od faktorov súvisiacich so samotným mikrobiálnym druhom, jeho vlastnosťami, fyziologickým stavom a v neposlednom rade od faktorov vnútorného a vonkajšieho prostredia potravín (Valík a Görner, 1995; Görner a Valík, 2004). Nakoľko podľa viacerých autorov, ako napríklad, podľa Monoda (1949) a Rossa a McMeekina (1994), sú odozvy populácií mikroorganizmov na tieto faktory reprodukovateľné, je možné matematicky určiť vzťah medzi parametrami vypočítanými z rastových alebo letalitných kriviek a týmito faktormi prostredia. Tieto vzťahy sú definované skupinou tzv. sekundárnych modelov (Ross a Dalgaard, 2004).

MATERIÁL A METÓDY

Kmene *Staphylococcus aureus* boli izolované z ovčieho mlieka a ovčieho syra na Štátnom veterinárnom a potravinovom ústave v Prešove (poskytnuté MVDr. Hanzélyovou). Jeden kmeň bol izolovaný z materského mlieka (Úrad verejného zdravotníctva SR; Ing. Sirotná). Identifikácia kmeňov bola dodatočne potvrdená systémom API (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francúzsko).

Štandardné 24h kultúry čistých kmeňov sa inokulovali do sterilného UHT mlieka tak, aby sa získal čo najmenší rozptyl počiatočných počtov *S. aureus* v mlieku. Paralelne naočkované mlieko sa inkubovalo pri 15 °C, pričom v príslušne stanovených intervaloch sa vyšetroval aktuálny počet KTJ.ml⁻¹ *S. aureus*, kultivačne na Agare podľa Baird-Parkera (Imuna, Šarišské Michaľany, SR) a neskôr na GTK agare (Imuna, Šarišské Michaľany, SR).

Zo zistených počtov sa zostrojili rastové čiary, ktoré sa podrobili primárnemu modelovaniu podľa Baranyiho (Baranyi a kol., 1993), výsledkom ktorého boli vypočítané rastové parametre (rastová rýchlosť, lag-fáza a i.).

Rastové parametre boli podrobené základnému matematicko-štatistickému hodnoteniu s využitím štatistického balíka Microsoft a Statistica Cz.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na obr. 1 sú znázornené rastové čiary 6 kmeňov *S. aureus*. Pre prehľadnosť ďalšie rastové čiary už nebolo vhodné znázorniť. Aj z týchto prezentovaných čiar je vidieť, že sa líšili navzájom len minimálne, čo potvrdzujú aj rozmedzia v akom sa pohybovali príslušné lag-fázy a smernice exponenciálnej fázy. Pozoruhodné pritom je, že rastové čiary vychádzali z výsledkov získaných klasickou zried'ovacou kultivačnou metódou, ktorá sa všeobecne vyznačuje 16 až 52% opakovateľnosťou stanovenia (STN ISO 6888).

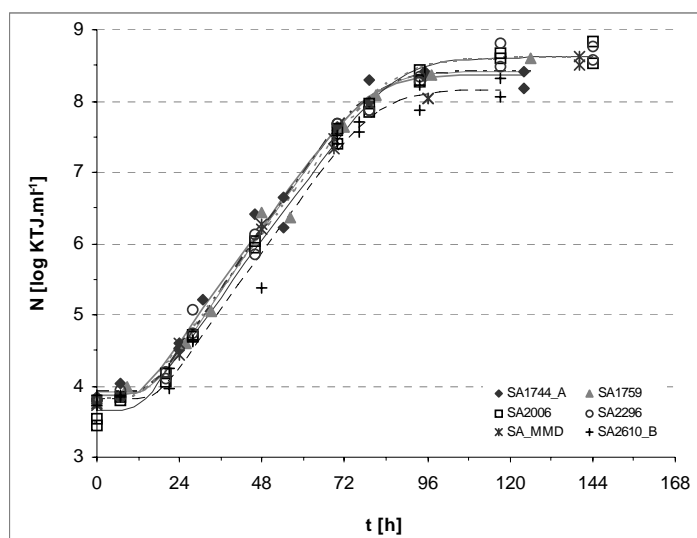
V tab. 1 sú zhrnuté výsledky štatistického zhodnotenia rastových parametrov, ktoré potvrdzujú minimálne odchýlky od ich priemerných hodnôt očakávané z grafického znázornenia rastových čiar. Priemerná rastová rýchlosť kmeňov *S. aureus* v mlieku pri 15 °C činila $0,067 \pm 0,005 \text{ h}^{-1}$ ($n = 87$; $v_k = 7,1 \%$), čo zodpovedalo priemerne generačnému času $4,5 \pm 0,3 \text{ h}$. Generačný čas sa pritom pohyboval v intervale 3,9 až 5,5 h. Podobne priemerná dĺžka lag-fázy *S. aureus* bola $14,4 \pm 2,4 \text{ h}$ ($n = 87$; $v_k = 16,8 \%$)

Tabuľka 1

Priemerné hodnoty rastových parametrov *S. aureus* v mlieku inkubovanom pri 15 °C a ich základné matematicko-štatistické hodnotenie

	Lag-fáza [h]	Rastová rýchlosť [h ⁻¹]	Čas zdvojenia [h]	N ₀ [logKTJ.ml ⁻¹]	N _{max} [logKTJ.ml ⁻¹]
Stredná hodnota	14,4	0,067	4,5	3,68	8,17
Smerodajná odchýlka výberu	2,4	0,005	0,3	0,20	0,29
Medián	14,8	0,068	4,4	3,71	8,21
Minimum	8,1	0,054	3,9	3,16	7,19
Maximum	18,7	0,077	5,5	4,14	8,71
Počet	87	87	87	87	87
v _k [%]	16,8	7,1	7,4	5,5	3,5

pri rozpätí minimálnej a maximálnej hodnoty 8,1 až 18,7 h. Pre minimalizáciu chýb počas rastových experimentov bolo potrebné precízne postupovať pri príprave inokula, samotnej inokulácii, kultivačnom stanovení počtov *S. aureus* ako aj dôsledne dodržiavať podmienky inkubácie. O týchto skutočnostiach počas našej práce svedčia aj ďalšie ukazovatele uvedené v tab. 1. Ako príklad uvádzame priemerný počiatkový počet *S. aureus* v mlieku po inokulácii ($\log N_0 = 3,68 \pm 0,20$ KTJ.ml⁻¹; v_k = 5,5 %) a tiež aj priemerný maximálny počet *S. aureus* dosiahnutý v stacionárnej fáze ($\log N_{\max} = 8,17 \pm 0,29$ KTJ.ml⁻¹; v_k = 3,5 %).

**Obr. 1**

Grafické porovnanie priebehu rastových čiar 6 kmeňov *Staphylococcus aureus* v mlieku pri 15 °C.

VALIDÁCIA VÝSLEDKOV

Naše hodnoty rastových rýchlostí sú veľmi blízke hodnotám vygenerovaným softvérom PMP ver. 7.0 (Pathogen Modeling Program) a Combase Predictor (LeMarc, 2005; Tab II). Priemerná hodnota rastovej rýchlosti našich kmeňov *S. aureus* je nepatrne nižšia, čo sa prejavilo v dlhšom v čase zdvojenia o 0,5 h. Túto skutočnosť je

možné vysvetliť tým, že rastové experimenty, z ktorých vychádzali obidva programy, boli vykonané v bujóne a nie v mlieku.

Tabuľka 2

Hodnoty rastových parametrov *S. aureus* pri 15 °C vygenerované softvérom PMP vz. 7.0 a Combase Predictor (LeMarc, 2005)

	Lag-fáza [h]	Rastová rýchlosť [h ⁻¹]	Čas zdvojenia [h]
PMP 7.0	8,9	0,077	3,9
Combase Predictor	14,3	0,074	4,1

ZÁVER

Záverom konštatujeme, že hlavným výsledkom tejto práce bola zistená opakovateľnosť stanovenia rastových parametrov vyplývajúcich z rastových čiar, ktoré patrili jednému kmeňu alebo druhu *S. aureus* všeobecne (15 kmeňov). Získané výsledky sú v zhode s údajmi publikovanými vo vedeckej literatúre. Opakovateľnosť stanovenia rastových parametrov vzhľadom na všeobecnú presnosť výsledkov kultivačných stanovení počtu mikroorganizmov bola nad očakávanie lepšia. Na základe získaných štatistických parametrov sa dá predpokladať, že vyslovené predpovede podložené príslušnými experimentmi budú v maximálnej zhode so skutočnosťou.

LITERATÚRA

1. ANONYMUS. *Microbial pathogen data sheets: Staphylococcus aureus*. New Zealand Food Safety Authority, Wellington, NEW ZEALAND. Plný text tiež na adrese: <http://www.nzfsa.govt.nz/science/data-sheets/staphylococcus-aureus.pdf>
2. ASPERGER, H. - ZANGERL, P. *Staphylococcus aureus*. In: *Encyclopedia of Dairy Science*. Academic Press, 2002, s. 2563-2509.
3. BARANYI, J. – ROBERTS, T.A. - MCCLURE, P. A non- autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology*. Roč.10, (1993), s. 43-59.
4. BUCHANAN, R.L. Predictive food microbiology. In: *Trends in Food Science & Technology*. Roč. 4, č. 1 (1993), s. 6-11.
5. GÖRNER, F. – VALÍK, Ľ. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. 1. vyd. Bratislava: Malé Centrum, 2004. 528s. ISBN 80-967064-9-7.
6. CHEN, C.S. Water Activity – Concentration Models for Solutions of Sugar, Salts and Acids. In: *Journal of Food Science*. Roč. 54, č. 5 (1989), s. 1318-1321.
7. LEMARC, Y. Osobné zdedenie. Norwich. 2005.
8. MCKELLAR, R.C. - LU, X. Primary Models. In: *Modeling Microbial Responses in Food*. London: CRC Press, 2004, s. 21-62.
9. MONOD, J. The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*. Roč. 3, (1949), s.371-394.
10. COMMISSION REGULATION (EC) 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* (2005). Plný text tiež na adrese: http://europa.eu.int/eur-lex/lex/LexUriServ/site/en/oj/2005/l_338/l_33820051222en00010026.pdf
11. ROBERTS, T.A. Microbial Growth and Surfoval: Developments in Predictive Modelling. In: *International Biodeteriation & Biodegradation*. (1995), s. 297-309.
12. ROSS, T. - DALGAARD, P. Secondary Models. In: *Modeling Microbial Responses in Food*. London: CRC Press, 2004, s. 63-150.
13. ROSS, T. - MCMEEKIN, T.A. Predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*. Roč. 23, (1994), s. 241-264.
14. StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA Cz [Softwarový systém na analýzu dat], verze 7. [Www.StatSoft.Cz](http://www.StatSoft.Cz)
15. STN ISO 6888. Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na stanovení počtu baktérií *Staphylococcus aureus*. Metóda počítania kolónií. Slovenský ústav technickém normalizácie, 1997, 16 s.
16. VALÍK, Ľ. - GÖRNER, F. Predpovedná mikrobiológia. *Bulletin potravinárskeho výskumu*. Roč. 34, č.3-4 (1995), s.123-134.

17. VALÍK, Ľ. – GÖRNER, F. – SONNEVELD, K. – POLKA, P. Faktory ovplyvňujúce fermentáciu ovčieho hrudkového syra na salaši. In: *Celostátní přehlídka sýrů, 2004: Výsledky přehlídek a sborník přednášek semináře Mléko a sýry 2004*. Ed.: J. ŠTĚTINA, L. ČURDA L. Praha: Česká společnost chemická, 2004, s.85-87. ISBN 978-80-86238-42-5.

Kontaktná adresa:

Doc. Ing. Valík Ľubomír PhD., Ing. Bajusová Barbora, FCHPT STU, Radlinského 9, 812 37, Bratislava