Kinetyka wzrostu i przeżywalności *Staphylococcus aureus* w regionalnym serze podpuszczkowym dojrzewającym, wyprodukowanym z surowego mleka koziego

ELŻBIETA BEDNARKO-MŁYNARCZYK, JOANNA SZTEYN, IRENEUSZ BIAŁOBRZEWSKI*,
AGNIESZKA WISZNIEWSKA-ŁASZCZYCH, KATARZYNA LIEDTKE

Katedra Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Oczapowskiego 14, 10-718 Olsztyn

*Katedra Inżynierii Procesów Rolniczych, Wydział Nauk Technicznych,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Heweliusza 14, 10-724 Olsztyn

Otrzymano 23.07.2015

Zaakceptowano 02.02.2016

Bednarko-Młynarczyk E., Szteyn J., Białobrzewski I., Wiszniewska-Łaszczych A., Liedtke K.
**Kinetics of the growth and survival of *Staphylococcus aureus* in regional rennet ripened cheese
manufactured from unpasteurized goat's milk**

Summary

The aim of the study was to determine the kinetics of the growth and survival of *Staphylococcus aureus* in regional rennet ripened cheese manufactured from unpasteurized goat's milk. Cheese samples were contaminated with *S. aureus* and stored at 4, 6, 20, or 22°C. During storage, pH balance, water activity, and the number of *S. aureus* cells per gram of the sample were determined. On the basis of the data, models of growth and survival of staphylococci in cheese were described, using a system of three coupled differential equations. The analysis of the measurements and fitting of the model demonstrated that the model consisting of a system of three differential equations was a good fit for the experimental data on water activity, pH, and the number of bacteria.

Keywords: cheese, regional food, staphylococcus

W wielu krajach europejskich od kilku lat obserwuje się narastające zainteresowanie konsumentów produktami lokalnymi, wytwarzanymi jak najbliżej domu (4, 6, 7, 9). Na kanwie tej tendencji powstała w 1995 r. Europejska Sieć Regionalnego Dziedzictwa Kulinarного promująca spożycie i zwiększoną produkcję regionalnej żywności. Jednym z polskich regionów należących do wymienionej sieci jest region Warmia, Mazury i Powiśle. Wśród długiej listy podmiotów o różnorodnej działalności, należących do sieci w regionie, są producenci oferujący produkty z mleka koziego. Dzięki warunkom naturalnym, charakterystycznym dla regionu Warmii i Mazur, wykorzystaniu lokalnego surowca i tradycyjnych procesów wytwarzania, produkty te odznaczają się wyjątkowymi walorami smakowymi i odżywczymi. Wyjątkowe cechy organoleptyczne uzyskiwane są m.in. dzięki rezygnacji z obróbki mleka w wysokiej temperaturze. Mleko kozie w produktach tradycyjnych, w odróżnieniu od produktów wytwarzanych metodami przemysłowymi, jest poddawane jedynie podgrzewa-

niu w temperaturze niższej niż pasteryzacja. Efektem zastosowania obróbki w niskich temperaturach może być przeżycie drobnoustrojów środowiskowych występujących w mleku (1). Podobnie jak przygotowanie surowca, warunki wytwarzania produktów lokalnych różnią się zasadniczo od tych wytwarzanych przemysłowo. Produkcją zajmują się z reguły osoby, które zarówno opiekują się stadem, jak i pozyskują mleko. Niesie to za sobą ryzyko przeniesienia drobnoustrojów, w tym bakterii z rodzaju *Staphylococcus*, powszechnie występujących na powierzchni ciała i błon śluzowych ludzi i zwierząt, na gotowe produkty (5, 10, 11). Mając na względzie prawdopodobieństwo występowania gronkowców w mleku surowym, podjęto badania nad zachowaniem się *Staphylococcus aureus* w serze podpuszczkowym dojrzewającym z mleka koziego. Badania te stały się podstawą do opracowania modeli matematycznych wzrostu i przeżywalności tych bakterii z uwzględnieniem następujących parametrów: pH i aktywności wodnej oraz różnych temperatur przechowywania produktu.

Materiał i metody

Mikroorganizm i przygotowanie inokulum. Drobnoustrojem wykorzystanym w badaniu był szczep *S. aureus* pochodzący z kolekcji (ATTC 25923, Meccenti, Luxemburg). Przygotowaną zgodnie z instrukcją producenta zawiesinę bakterii posiano na agar odżywczy i inkubowano w 37°C przez 24 godziny. Wyizolowaną na agarze, pojedynczą kolonię zawieszono w bulionie mózgowo-sercowym (Brain Heart Infusion, BHI, Oxoid, Basingstoke, Wielka Brytania) i inkubowano przez 20 godzin w temperaturze 37°C. Do uzyskanej zawiesiny dodawano glicerynę w stosunku objętościowym, odpowiednio, 17 : 3. Mieszaninę dzielono na 1,5 ml porcje i zamrażano w temperaturze -80°C (12). Każdorazowo przed inokulacją próbek sera, 1,5 ml porcje po rozmrożeniu posiewano na agar odżywczy i inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C. Następnie jedną wyhodowaną kolonię *S. aureus* zawieszano w BHI i inkubowano kolejne 20 godzin w tej samej temperaturze. Uzyskaną hodowlę rozcieńczano w płynie do rozcieńczeń (Maximum Recovery Diluent, Merck, Germany) do uzyskania rozcieńczenia 10⁻³. Inokulum dla próbki stanowiło 100 µl rozcieńczonej hodowli.

Materiał. Materiał do badań stanowił ser podpuszczkowy dojrzewający, wyprodukowany z mleka koziego niepasteryzowanego w gospodarstwie rolno-przetwórczym położonym na Warmii i Mazurach. W gospodarstwie pobierano całe bloki serowe i transportowano do laboratorium w warunkach chłodniczych. Sery rozdrabniano na tarce i odważono 10-gramowe porcje w sposób uniemożliwiający dodatkową kontaminację. Pojedyncze porcje stanowiące próbki laboratoryjne umieszczano w jałowych woreczkach, przeznaczonych do kontaktu z żywnością. Połowę próbek inokulowano zawiesiną *S. aureus*, a druga połowa stanowiła kontrolę.

Przechowywanie próbek. Taką samą liczbę próbek inokulowanych i stanowiących kontrolę umieszczono w chłodziarkach w temperaturach 4 i 6°C oraz w ciepłarniach w temperaturach 20 i 22°C.

Oznaczanie jednostek tworzących kolonie *S. aureus* w próbkach sera. W trakcie przechowywania co 72 godziny pobierano po dwie próbki (inokulowaną i kontrolną) do oznaczania liczby gronkowców w 1 g produktu przechowywanego w każdej z wymienionych powyżej temperatur. Oznaczenie liczby *S. aureus* w gramie dokonano zgodnie z procedurą opisaną w normie PN-EN ISO 6888-1 (8).

Pomiar pH i aktywności wody. Pomiaru pH dokonano przy użyciu pH-metru firmy Hanna Instruments (HI model 9224, USA). Aktywność wody oznaczano przy użyciu aparatu firmy NAGY Mess systeme GmbH (typ AWMD-10, Gaufelden, Niemcy). Pierwszy pomiar pH i aw dokonany został bezpośrednio po inokulacji próbek sera zawiesiną gronkowca. Kolejne pomiary pH i aw w próbkach, przecho-

wywanych w czterech temperaturach, wykonywane były co 72 godziny. Oznaczanie liczby gronkowców w 1 gramie, pH i aktywności wodnej dokonano w trakcie przechowywania w 15 punktach czasowych dla próbek przechowywanych w każdej z czterech badanych temperatur. Badania te przeprowadzono w pięciokrotnym powtórzeniu.

Modelowanie. Model przeżywalności, zaproponowany dla wyjaśnienia badanych procesów prowadzonych w temperaturach 4°C i 6°C, opisany jest układem trzech sprzężonych równań różniczkowych. Równanie nr 1 opisuje kinetykę zmian liczebności bakterii, równanie nr 2 aktywności wodnej, a równanie nr 3 pH.

$$\frac{dX}{dt} = -\gamma_{wa} \cdot \gamma_{pH} \cdot \mu_x \cdot e^{-b \cdot \left| 1 - \frac{X}{X_{min}} \right|} \cdot X \quad \text{równanie nr 1}$$

$$\frac{dwa}{dt} = -\mu_{wa} \cdot wa \quad \text{równanie nr 2}$$

$$\frac{dpH}{dt} = \mu_{pH} \cdot pH \quad \text{równanie nr 3}$$

Model wzrostu, zaproponowany dla wyjaśnienia badanych procesów prowadzonych w temperaturach 20°C i 22°C, podobnie jak model przeżywalności, opisany jest układem trzech sprzężonych równań różniczkowych, które opisują kinetykę zmian liczebności bakterii – równanie nr 4, aktywności wodnej – równanie nr 5 oraz pH – równanie nr 6.

$$\frac{dX}{dt} = \gamma_{wa} \cdot \gamma_{pH} \cdot \mu_x \cdot \left| 1 - \frac{X}{X_{end}} \right| \cdot X \quad \text{równanie nr 4}$$

$$\frac{dwa}{dt} = -\mu_{wa} \cdot wa \quad \text{równanie nr 5}$$

$$\frac{dpH}{dt} = \mu_{pH} \cdot pH \cdot \left(1 - \frac{pH}{pH_{max}} \right) \quad \text{równanie nr 6}$$

Zarówno dla modelu wzrostu, jak i przeżywalności, sprzężenie wynika z zależności empirycznych opisujących wpływ aktywności wodnej (równanie nr 7) i pH (równanie nr 8) na liczbę drobnoustrojów. Postać tych równań jest analogiczna do tego, co zaproponował Mason, określając wpływ temperatury na badane procesy biotechnologiczne (3). Wartości minimalne, optymalne i maksymalne aktywności wodnej i pH, uśrednione na podstawie danych podręcznikowych, zestawiono w tab. 1.

Tab. 1. Wartości kardynalne zakresu zdolności wzrostu *S. aureus* (aktywności wodnej i pH)

Wartość	aw	pH
min	0,8139	4
opt	0,9764	6,9
max	0,9924	10

$$\gamma_{wa} = \frac{(aw - aw_{max})(aw - aw_{min})^2}{(aw_{opt} - aw_{min}) \{ (aw_{opt} - aw_{min})(aw - aw_{opt}) - (aw_{opt} - aw_{max})(aw_{opt} + aw_{min} - 2aw) \}} \quad \text{równanie nr 7}$$

$$\gamma_{pH} = \frac{(pH - pH_{max})(pH - pH_{min})^2}{(pH_{opt} - pH_{min}) \{ (pH_{opt} - pH_{min})(pH - pH_{opt}) - (pH_{opt} - pH_{max})(pH_{opt} + pH_{min} - 2pH) \}} \quad \text{równanie nr 8}$$

Do wyznaczenia wartości poszukiwanych współczynników, μ_x , b , μ_{wa} , μ_{pH} w modelu składającym się z równań 1-3 i 4-6 wykorzystano procedurę optymalizacyjną, ga, zaimplementowaną w Optimization Toolbox MATLAB (MathWorks, USA). Funkcja celu, J_c określona współczynnikiem Nasha-Sutcliffe'a, została zdefiniowana jako suma różnic wartości zmian wielkości, ogólnie oznaczonych symbolem W , zmierzonych i symulowanych (2):

$$J_c(\text{wsp. modelu}) = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n |W_{i,pom} - W_{i,model}|}{\sum_{i=1}^n |W_{i,pom} - \bar{W}_{pom}|} \quad \text{równanie nr 9}$$

Wartość współczynnika dopasowania opisanego równaniem nr 9 wynosząca 1 (maksymalna teoretyczna wartość) oznacza, że model jest idealnie dopasowany do danych eksperymentalnych. Wartość 0 oznacza, że model może być zastąpiony średnią wartością z pomiarów. Wartość > 0 – model lepiej aproksymuje niż średnia z pomiarów. Wartość < 0 – model gorzej aproksymuje niż średnia z pomiarów. Dolna granica współczynnika Nasha-Sutcliffe'a może dążyć do $-\infty$.

Wartości poszukiwanych współczynników zostały wyznaczone jako rozwiązanie problemu optymalizacyjnego:

$$\max_{\text{wsp. modelu}} -J_c(\text{wsp. modelu}).$$

Wykaz oznaczeń: b – stała w modelu, $\max$ – wartość maksymalna, mean – wartość średnia, min – wartość minimalna, pH – odczyn, std – odchylenie standardowe, wa – aktywność wodna, W – ogólny symbol zmiennej stanu, $\bar{W}$ – średnia wartość zmiennej, X – populacja bakterii [$\log \text{ jtk/ml}$], γ – wyrażenie limitujące wzrost bakterii, μ – stała wzrostu [$1/\text{min}$]; indeks dolny: model – wartość modelowa, pom – pomiar, opt – wartość optymalna.

Wyniki i omówienie

W modelu wzrostu jako wartości, X_{end} , przyjęto wartość średnią uzyskaną z 5 końcowych pomiarów. Na podstawie przebiegu linii modelowych prezentowanych na ryc. 1-3 oraz miar dopasowania, J_c , zamieszczonych w tab. 2 można stwierdzić dobre dopasowanie modelu składającego się z układu trzech równań różniczkowych, zarówno do danych eksperymentalnych aktywności wodnej, pH , jak i liczebności bakterii.

W tab. 2 przedstawiono wyznaczone z wykorzystaniem metod optymalizacyjnych wartości liczbowe współczynników w modelu przeżycia (temperatura 4°C i 6°C) i wzrostu (temperatura 20°C i 22°C) oraz miary ich dopasowania (wartości współczynników Nasha-Sutcliffe'a)

Tab. 2. Wartości liczbowe współczynników w modelu przeżycia (temperatura 4°C i 6°C) i wzrostu (temperatura 20°C i 22°C) oraz miary ich dopasowania (wartości współczynników Nasha-Sutcliffe'a)

Temperatura ($^\circ\text{C}$)	μ_x	b	$\mu_{wa} \cdot 10^5$	$\mu_{pH} \cdot 10^4$	J_c
4	0,025	1,295	1,882	1,819	0,8159
6	0,073	1,979	1,748	1,376	0,8252
20	0,064	–	3,859	16,62	0,6661
22	0,1198	–	4,305	16,75	0,4721

Ryc. 1. Zmiany liczebności komórek *S. aureus* w serze przechowywanym w czterech różnych temperaturach. Dane eksperymentalne i modelowe

Ryc. 2. Zmiany pH w serze przechowywanym w czterech różnych temperaturach. Dane eksperymentalne i modelowe

Ryc. 3. Zmiany aktywności wodnej w serze przechowywanym w czterech różnych temperaturach. Dane eksperymentalne i modelowe

mają odmienną postać, to wspólne jest to, iż wartości współczynnika, μ_x , i b (model wzrostu) są większe dla wyższych temperatur, co m.in. potwierdzają szybsze

Ryc. 4. Współczynnik Nasha-Sutcliffe'a – analiza wrażliwości wpływu wartości współczynnika μ_x i b na liczebność bakterii w temperaturze 4°C

Ryc. 5. Współczynnik Nasha-Sutcliffe'a – analiza wrażliwości wpływu wartości współczynnika μ_x i b na liczebność bakterii w temperaturze 6°C

zmiany liczby bakterii w wyższych temperaturach. Znajduje to też potwierdzenie w charakterze krzywych modelowych prezentowanych na ryc. 1. Szybkość zmian pH badanych w serze była większa w temperaturze 4°C przechowywania w porównaniu do zmian zachodzących w 6°C, co można stwierdzić zarówno na podstawie wartości współczynnika, μ_{pH} (tab. 2), jak i na podstawie graficznej prezentacji zmian modelowych i eksperymentalnych przedstawionych na ryc. 2.

Natomiast w temperaturach 20°C i 22°C wartości współczynnika i w konsekwencji linie modelowe są do siebie zbliżone. Dodatkowo na podstawie ich przebiegów przedstawionych na ryc. 2 można stwierdzić, że w okresie prowadzenia eksperymentu pH próbek sera w temperaturach 20°C i 22°C zaczyna przechodzić w zakres stałych wartości, czego nie zaobserwowano w niższych temperaturach.

Obniżenie aktywności wodnej zaobserwowano zarówno dla przeżywalności, jak i wzrostu bakterii w próbkach sera. Charakter tych zmian jest podobny w temperaturach 4°C i 6°C, tak jak charakter linii modelowych prezentowanych na ryc. 3 oraz wartości współczynnika, μ_{wa} , tabela 2. Porównując przebiegi zmian aktywności wodnej w temperaturach chłodniczych i pokojowych, można zaobserwować dużo większą szybkość zmian i znaczących różnic przebiegów w temperaturach 20°C i 22°C (większe wartości, μ_{wa} , i bardziej nachylone linie modelowe).

Analiza wrażliwości. Metody optymalizacji pozwoliły znaleźć takie wartości współczynników w modelach, które zapewniają najlepsze dopasowanie modelu do danych eksperymentalnych. Natomiast zastosowanie metody analizy wrażliwości daje odpowiedź na pytanie, na ile inne wartości współczynników dają dopasowanie zbliżone do optymalnego.

Na ryc. 4 przedstawiono analizę wrażliwości wpływu wartości współczynników, μ_x , oraz b , na liczebność bakterii. Z ułożenia płaszczyzny utworzonej dla współczynnika b z przedziału $\langle 0,1; 3 \rangle$ oraz współczynnika μ_x z przedziału $\langle 0,01; 0,9 \rangle$, po podziale każdego przedziału na 200 równomiernie rozłożonych punktów, można zaobserwować „grzbiet” utrzymujący się na poziomie ok. 0,8 wartości współczynnika dopasowania. Optymalna wartość tego współczynnika wyniosła 0,8159 dla wartości $b = 1,295$ i $\mu_x = 0,023$, ale zbliżone dopasowanie można uzyskać dla innych kombinacji wartości współczynników. Podobny „grzbiet” można zaobserwować na ryc. 5 przedstawiającej analizę wrażliwości współczynników, μ_x , oraz b w temperaturze 6°C.

Wyniki analizy wrażliwości wpływu wartości współczynnika, μ_x , (równanie nr 4) na liczebność bakterii w temperaturach 20°C i 22°C prezentowane na rycinie 6 pozwalają stwierdzić, że w temperaturze 22°C zakres zmienności tego współczynnika od ok. 0,1 do 0,18 daje równie dobre dopasowanie, jak wartość optymalna wynosząca 0,1198. Natomiast w temperaturze 20°C przedział wokół wartości optymalnej 0,064 jest wyraźnie mniejszy.

Ryc. 6. Współczynnik Nasha-Sutcliffe'a – analiza wrażliwości wpływu wartości współczynnika, μ_x na liczebność bakterii w temperaturach 20°C i 22°C

Zaproponowane modele matematyczne opisujące kinetykę zachowania *S. aureus* w badanym serze podpuszczkowym, zdaniem autorów, zostały zweryfikowane z zadowalającą dokładnością. Modele te mają charakter semi-empiryczny co oznacza, że zakres ich stosowania odpowiada zakresowi zmienności stanu uzyskanego w badaniach. Ewentualna predykcja poza zakres zmienności eksperymentalnej może wynosić kilka procent. Rozszerzenie zakresu stosowalności tego typu modelu wymaga przeprowadzenia dodatkowych badań.

Piśmiennictwo

1. Cokal Y., Dagdelen A., Cenet O., Gunsen U.: Presence of *L. monocytogenes* and some bacterial pathogens in two Turkish traditional food, Mihalic cheese and Hosmerim dessert. *Food Control* 2012, 26, 337-340.
2. Koch K., Lübken M., Gehring T., Wichern M., Horn H.: Biogas from grass silage – Measurements and modeling with ADM1. *Bioresource Technol.* 2010, 21, 8158-8165.
3. Mason I. G.: Mathematical modeling of the composting process: A review. *Waste Management* 2006, 26, 3-21.
4. McIntyre L., Rondeau K.: Individual consumer food localism: A review anchored in Canadian farmwomen's reflections. *J. Rural Stud.* 2011, 27, 116-124.
5. Nouwen J. L., van Belkum A., Verbrugh H. A.: Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. *Neth. J. Med.* 2001, 59, 126-133.
6. Panagou E. Z., Nychas G.-J. E., Sofos J. N.: Types of traditional Greek foods and their safety. *Food Control* 2013, 29, 32-41.
7. Pirisi A., Comunian R., Urgeghe P. P., Scintu M. F.: Sheep's and goat's dairy products in Italy: technological, chemical, microbiological, and sensory aspects. *Small Rum. Res.* 2011, 101, 102-112.
8. PN-EN ISO 6888-1:2001/A1:2004 Mikrobiologia żywności i pasz – Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków) – Część 1: Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej Baird-Parkera.
9. Reis P. J. M., Malcata F. X.: Current state of Portuguese dairy products from ovine and caprine milks. *Small Rum. Res.* 2011, 101, 122-133.
10. Ruaro A., Andrighetto C., Torriani S., Lombardi A.: Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese of North Italy. *Food Control* 2013, 34, 106-111.
11. Valero A., Pérez-Rodríguez F., Carrasco E., Fuentes-Alventosa J. M., García-Gimeno R. M., Zurera G.: Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 133, 186-194.
12. Viridis S., Scarano Ch., Cossu F., Spanu V., Spanu C., de Santis E. P. L.: Antibiotic resistance in *staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from goats with subclinical mastitis. *Vet. Med. Int.* 2010, 2, 1-6.

Adres autora: lek. wet. Elżbieta Bednarko-Młynarczyk, ul. Oczapowskiego 14, 10-718 Olsztyn; e-mail: elabednarko@wp.pl