



QK1910121-CM1
METODIKA POSUZOVÁNÍ REZISTENCE
BAKTERIÍ VŮČI ZÁHŘEVŮM NA
(SUB)PASTERAČNÍ TEPLoty

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

Zpracovali:

IRENA NĚMEČKOVÁ, ŠÁRKA TREŠLOVÁ, ELIŠKA LEŠKOVÁ

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

ISBN 978-80-88390-02-2

Vydání červenec 2021

Vydavatel:

Pro: Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o. vydal MILCOM a.s.,
Ke Dvoru 12a, Praha 6, 16000

Forma vydání:

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF.

Zveřejněno na webové stránce:

https://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/QK1910121_CM1.pdf

1. Vydání 2021

ISBN 978-80-88390-02-2

Podíl autorů na tvorbě certifikované metodiky:

IRENA NĚMEČKOVÁ – podíl 55 %

ŠÁRKA TREŠLOVÁ – podíl 22,5 %

ELIŠKA LEŠKOVÁ – podíl 22,5 %

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:

1) Odborník z daného oboru: Prof. Ing. František Buňka, Ph.D., Univerzita obrany v Brně

2) Pracovník státní správy: MVDr. Kateřina Březinová, Ph.D., Státní veterinární správa

Dedikace na projekt:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QK1910121 s názvem:
„Perzistence vybraných původců alimentárních onemocnění, hygienických
indikátorů a možnosti jejich eliminace z prostředí potravinářských podniků“
s finanční podporou NAZV Ministerstva zemědělství ČR.

Cíl metodiky

Cílem metodiky je posoudit, jak záhřevy na subpasterační a pasterační teploty ovlivňují inaktivaci nebo naopak přežívání bakterií, a získané výsledky interpretovat způsobem využitelným v praxi. Metodika je primárně koncipována pro využití v mlékárenství, avšak použitelná je i v dalších oblastech potravinářské výroby za podmínky, že bude respektován rozsah použitelnosti metodiky.

Touto metodikou lze posuzovat technologicky žádoucí (zákysové i nezákysové), technologicky nežádoucí i patogenní bakterie, a to jak Gram-negativní, tak Gram-pozitivní, s výjimkou sporotvorných bakterií (rody *Bacillus*, *Clostridium* a další). Bakteriální spory totiž vykazují značnou rezistenci a za podmínek metody na záhřev prakticky nereagují. Měření by proto mělo smysl pouze u vegetativních buněk sporotvorných bakterií, avšak spolehlivé získání jejich suspenze bez přítomnosti spor je náročné a mimo rámec této metodiky. Využitelnost metodiky je rovněž omezená v případě kvasinek a zejména plísní, jejichž hydrofobní povrchové struktury brání přímému kontaktu buněk s vytemperovaným médiem, čímž může být jejich rezistence vůči záhřevu chybně nadhodnocena.

Další proměnnou je volba média, ve kterém je měření prováděno, neboť rezistence bakterií je ovlivňována koloidní strukturou konkrétních médií, zejména obsahem tukových kuliček, emulgovaného tuku, vzduchových bublin, apod. struktur s tepelně izolačními vlastnostmi. Výhodou metodiky je, že může být rezistence bakterií posuzována nejen v syntetických tekutých médiích, ale i v modelových a reálných médiích. Jediným požadavkem na média je, aby byla tekutá a za podmínek metody dobře míchatelná. V mlékárenství se může jednat např. o mléko, smetanu, syrovátku, tekuté neochucené a ochucené výrobky, prací vodu, tzv. bílou vodu, a další.

Rezistence bakterií může být podle této metodiky posuzována při záhřevech na teploty nižší než 100 °C – experimentálně při subpasteračních teplotách v intervalu od 45-50 °C do 60-65 °C (dle vlastností konkrétního kmene), při vyšších teplotách výpočtem. Posuzován tak může být vliv záhřevu na bakterie nejen při pasteračním nebo termizačním ošetření, ale také při dalších úkonech za zvýšené teploty, jako jsou např. odstředování mléka, dohřívání sýřeniny, páření sýrů, sanitace technologických zařízení, praní sýrařských plachetek, a další.

Vlastní popis metodiky

Příprava mikroorganismů

Pro vlastní měření je nutné připravit si dostatečně koncentrovanou suspenzi čerstvě nakultivovaných bakterií. Bakterie kultivujeme s využitím vhodným neselektivních kultivačních médií (např. Brain Heart Infusion, Glucose Trypton Yeast Extract, apod.) při vhodné teplotě, ve vhodné atmosféře a po dobu potřebnou k tomu, aby daný bakteriální kmen narostl.

Nejprve bakterie oživíme v bujónu, následně z této čerstvé kultury vyočkujeme roztěrem 0,1 ml na povrch agarové půdy na Petriho misce o průměru 90 mm a vykultivujeme. Poté celý povrch Petriho misky sterilní kličkou setřeme do 9 ml fyziologického roztoku, čímž vznikne výchozí suspenze bakterií. Ze suspenze odebereme 1 ml vzorku pro stanovení počáteční denzity mikroorganismů (předpokládaná denzita 8-11 log KTJ/ml) a zbývající suspenzi bezprostředně použijeme pro vlastní posouzení rezistence.

Suspenzi lze použít k proměření tolika teplot, kolik je k dispozici kusů experimentálních sestav. K proměření dalších teplot je nutno bezprostředně před měřením připravit čerstvou suspenzi z další Petriho misky.

Experimentální sestava

Pro měření je potřeba vyhřívaná plotýnka s magnetickým mícháním a s regulací teploty, tzn. aby bylo možné nastavit nejen teplotu plotýnky, ale také přesně regulovat teplotu uvnitř míchaného média. V ČR je k dispozici např. zařízení RCT Basic Safety Control a k němu kontaktní teplotní čidlo ETS-D5 (obojí IKA, Německo).

Na plotýnku umístíme přiměřeně velkou kádinku s vodou a s vloženým magnetickým míchadlem. Do vody ponoříme teplotní čidlo regulátoru. Na regulátoru nastavíme experimentální teplotu, na plotýnce nastavíme teplotu cca o 35 °C vyšší. Je to teplota dostatečně vysoká na to, aby účinně probíhal tok tepla z plotýnky do vody a zároveň dostatečně nízká na to, aby regulace teploty fungovala bez výkyvů v důsledku přehřívání. Míchání nastavíme na hodnotu mírně nižší, než při jaké se ve vodě objeví výrazný vír. Systém necháme ustálit.

Sterilní experimentální médium si připravíme do vhodných sterilních nádobek. Nádobky mají být uzavíratelné, s úzkým hrdlem, za které je lze uchytit, a zároveň dostatečně objemné, aby umožňovaly míchání média. Mohou to být např. centrifugační zkumavky typu Falcon o objemu 50 ml, do kterých se nadávkuje 20 ml média, nebo skleničky o objemu 200 ml, do kterých se nadávkuje 100 ml média. Do média asepticky vložíme vysterilované magnetické míchadlo. Nádobku s médiem uchytíme do držáku a ponoříme do vody v kádince tak, aby se nádobka nedotýkala stěn ani dna kádinky a hladina média byla alespoň 1 cm pod hladinou vody. Dle potřeby upravíme intenzitu míchání. Systém necháme ustálit. Příklad sestavy je na obr. 1.

Rychlejšímu ustálení systému napomůže, když si vodu v kádince i experimentální médium v příslušné nádobce předem vytemperujeme ve vodní lázni nastavené na experimentální teplotu.



Obr. 1: Příklad provedení experimentální sestavy

Vlastní měření

Po ustálení teploty v experimentální sestavě médium zaočkujeme 1 ml čerstvě připravené bakteriální suspenze, čímž dojde k mžikovému ohřátí bakterií na experimentální teplotu. Ve zvolených časových intervalech postupně odebíráme z média vzorky o objemu 1 ml. Ty bezprostředně podrobujeme desítkovému ředění ve fyziologickém roztoku (a tím zároveň i rychlému chlazení) a mikrobiologickému stanovení přeživších bakterií na vhodné agarové půdě. Denzitu bakterií v čase 0 vypočteme z denzity výchozí suspenze a objemu experimentálního média.

Volba experimentálních podmínek

V ideálním případě experimentální teploty i časy reflektují podmínky sledovaného technologického kroku, ne vždy je to však možné. V tom případě vlastní měření probíhá za experimentálně přístupných podmínek a získané výsledky je potřeba na podmínky technologie extrapolovat.

Základním požadavkem na experimentální podmínky je, aby při nich bylo dosaženo měřitelných počtů přeživších bakterií. Je-li teplota příliš vysoká, rychle se počty přeživších bakterií dostanou pod mez detekce (méně než 1,0 log KTJ/ml). Je-li teplota příliš nízká, inaktivační účinek záhřevu na bakterie nemusí být vůbec zpozorován. Podobně to platí pro experimentální časy.

Obecně lze doporučit, aby teplotní interval měření začínal přibližně na 45-50 °C a končil přibližně na 60-65 °C a proměřeno bylo alespoň 6 teplot. Měření při dané teplotě by mělo probíhat po celkovou dobu 20 až 180 minut, přičemž během této doby by mělo být získáno alespoň 6 kvantifikovatelných výsledků pro log-lineární část inaktivační křivky. Vhodné kombinace teplot a časů závisí na vlastnostech konkrétního testovaného kmene. Je proto účelné si podmínky experimentu nastavit na základě výsledků screeningu provedeného s konkrétním kmenem. Pokud je to pro daný kmen relevantní, rovněž by mělo být zařazeno naměření alespoň 3 hodnot v oblastech popsanych v kapitole Zvláštní případy jako lag-fáze a fáze sníženého inaktivačního účinku. Jakkoliv se tím může zkomplikovat popis postupu práce, vypovídací schopnost získaných výsledků by měla být nadřazena uniformitě designu experimentu a pro každý testovaný kmen by kombinace měřených teplot a časů měly být nastaveny individuálně. I v rámci jednoho druhu totiž mezi jednotlivými kmeny mohou existovat značné rozdíly.

Screening a následné naměření odpovídajícího počtu bodů, jak je popsáno v předchozím odstavci, jsou schopny poskytnout dostatečně spolehlivé výsledky relevantní pro praktické využití. Nicméně je možno postup práce dále precizovat, a to zopakováním měření. V tom případě se postupuje obdobně, jako by byla zařazena další experimentální teplota, tzn. znovu se připraví čerstvá bakteriální suspenze a ve zvolených časových intervalech se stanoví přeživší bakterie.

Výpočet D-hodnoty a z-hodnoty

Vliv záhřevu na mikroorganismy lze popsat pomocí D- a z-hodnot. D-hodnota je čas, který je při dané teplotě potřeba ke snížení počtu mikroorganismů o jeden řád. A z-hodnota udává, o kolik stupňů je potřeba zvýšit teplotu, aby se D-hodnota snížila desetkrát, tzn. aby se desetkrát zkrátil čas potřebný ke snížení denzity mikroorganismů o jeden řád.

Pro jednotlivé experimentální teploty vytvoříme grafy, kde na ose x bude doba záhřevu uvedená v minutách a na ose y denzita přeživších bakterií vyjádřená jako log KTJ/ml. Pomocí funkce lineární regrese naměřené body proložíme přímkou, přičemž D-hodnotu určíme jako absolutní hodnotu z převrácené hodnoty směrnice regresní funkce. Takto získaná D-hodnota vychází v minutách a uvádí se pro příslušnou experimentální teplotu. Čím je D-hodnota vyšší, tím je mikroorganismus vůči dané teplotě rezistentnější.

Pokud bylo měření při dané teplotě opakováno, lineární regresi provedeme pro každé jednotlivé opakování zvlášť. Pomocí Testu směrnice a úseku přímky na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ ověříme, zda se naměřené přímky shodují. Pokud ano, do výpočtu D-hodnoty zařadíme všechny naměřené body společně. Pokud ne, měření znovu zopakujeme a pro výpočet použijeme výsledky pouze těch opakování, která se shodují.

Následně vytvoříme jeden graf, kde na ose x bude experimentální teplota ve stupních Celsia a na ose y logaritmus D-hodnoty při dané teplotě. Pomocí funkce lineární regrese body proložíme přímkou, přičemž z-hodnotu určíme jako absolutní hodnotu z převrácené hodnoty směrnice regresní funkce. Takto získaná z-hodnota vychází ve °C. Čím je z-hodnota vyšší, tím mikroorganismus lépe snáší zvyšování teploty.

V rámci daného bakteriálního druhu se jako potenciálně nejrizikovější jeví kmeny, které mají jak D-hodnoty, tak z-hodnotu relativně vysoké, avšak v mlékárenské praxi jsou více běžné kmeny s vysokými D-hodnotami a nízkou z-hodnotou, anebo naopak.

Stanovení D- a z-hodnot vychází z dat získaných klasickou kultivační analýzou, která je obvykle zatížena relativně vysokou chybou (typicky 30 %). Přesto po zohlednění zvláštních případů popsanych v samostatné kapitole níže je experimentální procedura jako celek natolik spolehlivá, že se koeficient determinace R^2 u lineární regrese typicky pohybuje nad hodnotou 0,8, běžně i nad 0,9. Nicméně ve zcela ojedinělých případech se v souboru dat může objevit

odlehlý bod. Zjevně odlehlý bod ze souboru dat vyloučíme vizuálně, popř. v případě pochybností můžeme použít Q-Q grafy.

Uvedený postup stanovení D- a z-hodnot je ve většině případů vyhovující, neboť naměřená data obvykle mají log-lineární charakter. Přesto tomu tak nemusí být vždy, jak je popsáno v kapitole Zvláštní případy. Pokud tato možnost nastane, D- a z-hodnoty by měly být doplněny relevantní poznámkou (o době trvání lag fáze, o době do začátku fáze sníženého inaktivačního účinku nebo o nedostatečném inaktivačním účinku záhřevu). Stanovení D- a z-hodnot je ilustrováno v kapitole Příklady.

Zvláštní případy

Lag-fáze

Některé kmeny mohou při relativně nižších experimentálních teplotách vykazovat lag-fázi, během které nejsou záhřevem účinně inaktivovány. Pokud výsledky screeningu naznačují, že je lag-fáze pro daný kmen a teplotu významná, mělo by toto podezření být ověřeno proměřením více časů v relevantní oblasti (viz kapitola Volba experimentálních podmínek). Za významnou a hodnou zřetele lze lag-fázi považovat, pokud nastane některý z těchto případů:

- Doba trvání lag-fáze je souměřitelná s D-hodnotou odhadnutou na základě screeningu.
- Doba trvání lag-fáze je významná vzhledem k době trvání řešené technologické operace.

V úvahu by mělo být rovněž vzato, zda je technicky možno dobu trvání lag-fáze za daných experimentálních podmínek naměřit. Nicméně na rozdíl od mžikových záhřevů, které se používají např. při UHT ošetření, jsou při záhřevech na subpasterační teploty typicky doby trvání technologické operace i lag-fáze měřitelné.

Porovnání koeficientů determinace R^2 získaných lineární regrese a regresemi vyšších řádů se pro detekci nelinearity způsobené přítomností lag-fáze jeví jako nevhodné. To proto, že i koeficient determinace lineární regrese provedené na kompletním souboru získaných dat, včetně lag-fáze, může dosahovat žadoucích hodnot 0,8 a výše.

Doba trvání lag-fáze se stanoví jako čas, v němž se protnou přímkami proložené body odpovídajícími lag-fázi a body odpovídajícími účinně probíhající inaktivaci bakterií, tzn. určí se bod, který mají obě tyto přímkami společný. Naměřený bod, který leží nejbližší konci lag fáze a zároveň nejbližší začátku účinné inaktivace se použije při lineární regresi účinně probíhající inaktivace.

Výpočty jsou podrobně ilustrovány v kapitole Příklady.

Pokud po lag-fázi v průběhu experimentu dojde k účinné inaktivaci bakterií, přímkami proložené body odpovídajícími lag-fázi bude víceméně horizontální a absolutní hodnota její směrnice bude typicky nižší než 0,005, zatímco přímkami proložené body odpovídajícími účinné inaktivaci bude klesající a absolutní hodnota její směrnice bude typicky vyšší než 0,01.

Dobu trvání lag-fáze je nutné zahrnout do interpretace výsledků v návaznosti na sledovanou technologickou operaci. Po dobu trvání lag-fáze je inaktivační účinek záhřevu na bakterie zanedbatelný, a tak je vhodné změny v bakteriální populaci na základě stanovených D- a z-hodnot modelovat až po jejím uplynutí.

Fáze sníženého inaktivačního účinku

Fáze sníženého inaktivačního účinku může být pozorována pro některé kmeny a relativně nižší experimentální teploty. Zatímco lag-fáze odráží schopnost daného kmene po určitou dobu *a priori* odolávat denaturačnímu působení záhřevu na danou teplotu, fáze sníženého inaktivačního účinku reflektuje výskyt subpopulací, kterým se až během působení záhřevu podařilo zaktivovat ochranné mechanismy.

Část populace bakterií tedy může být záhřevem inaktivována a část může záhřev přežívat, anebo dokonce růst. Výsledný tvar inaktivační křivky je pak dán součtem kolonietvorných jednotek těchto subpopulací v daných časech. To se projeví zmírněním klesající tendence inaktivační křivky, popř. až obrácením v mírný nárůst. Jedná se o tzv. „tailing“.

Pokud screening poukáže na možný „tailing“, mělo by být při vlastním experimentu zařazeno proměření dostatečného počtu bodů i v „ocásku“. Doba, po jejímž uplynutí se inaktivační účinek záhřevu sníží, se stanoví jako průsečík přímky proložené body odpovídajícími účinně probíhající inaktivaci a přímky proložené body odpovídajícími „ocásku“ se sníženým inaktivačním účinkem. Naměřený bod, který leží nejbližší konci účinné inaktivace a zároveň nejbližší začátku „ocásku“ se použije při lineární regresi účinně probíhající inaktivace.

Při interpretaci naměřených D- a z-hodnot pro sledovanou technologickou operaci je nutné počítat s tím, že po uplynutí doby účinně probíhající inaktivace se chování populace daného kmene může stát obtížněji predikovatelným (bude záviset na skutečných poměrech jednotlivých subpopulací) a denzita mikroorganismů se v průběhu tepelného procesu po předchozím poklesu může případně i zvýšit.

Nedostatečný inaktivační účinek záhřevu

Při relativně nižších experimentálních teplotách může nastat situace, že daný kmen sice neroste, ale ani není dostatečně účinně inaktivován. Působení záhřevu je tak na pomezí bakteriostatického a baktericidního a denzita přeživších bakterií klesá jen velmi mírně až nevýznamně. V kontextu řešení mikrobiologické problematiky mlékárenských technologií se v tom případě jeví jako účelné měření při dané teplotě po uplynutí zvolené doby (180 minut nebo dle doby trvání sledované technologické operace) ukončit.

Získané výsledky je sice možno pro odhad D-hodnoty při dané teplotě použít, avšak je nutno zdůraznit, že tento odhad bude zatížen relativně vyšší chybou, která navíc nemusí korelovat s vyšší koeficientu determinace. I velmi malá změna jednoho z bodů použitých pro výpočet totiž může vést k tomu, že bude vypočtena rovnice jiné přímky s odlišným koeficientem determinace. A protože tato přímka bude víceméně horizontální, absolutní hodnota její směrnice bude velmi nízká, tzn. její převrácená hodnota bude vysoká. D-hodnota v tom případě bude dosahovat řádově stovek minut. Jako problematické se jeví zejména případy, kdy D-hodnota přesáhne proměřovanou dobu záhřevu, tzn. během experimentu poklesne denzita mikroorganismů o méně než jeden řád.

Přesto lze v popisu vlastností daného kmene záhřev s nedostatečným inaktivačním účinkem ponechat, a to např. pro účely porovnání různě odolných kmenů při dané teplotě. V tom případě však stačí uvádět D-hodnoty pouze pro nejvyšší teplotu, při které byl nedostatečný inaktivační účinek pozorován, a pro teploty vyšší. Tyto D-hodnoty lze rovněž použít pro výpočet z-hodnoty. Díky tomu, že jsou pro tento výpočet D-hodnoty logaritmovány a že bude použita nejvýše jedna D-hodnota zatížená vysokou chybou, lze získanou z-hodnotu považovat za dostatečně spolehlivou.

Interpretace výsledků v návaznosti na sledovanou technologickou operaci

D- a z-hodnoty a další výše popsané parametry obecným způsobem popisují míru rezistence daného kmene bakterií vůči záhřevu, přičemž aplikovat je lze při řešení konkrétních technologických otázek v reálných provozech.

Vliv záhřevu na celkový počet mikroorganismů lze sice snadno, ale nespecificky vysledovat mikrobiologickým rozbořením fázových vzorků. Nicméně v dané populaci mikroorganismů se mohou vyskytovat kmeny zdravotně a/nebo technologicky rizikové, které by měly být záhřevem dostatečně účinně inaktivovány, avšak u některých se to ne vždy a zcela

úspěšně daří. V tom případě je potřeba problematický kmen izolovat a jeho rezistenci vůči záhřevu kvantifikovat.

Denzita daného bakteriálního kmene na počátku tepelného procesu pravděpodobně nebude dosahovat hodnot tak vysokých, jako v bakteriální suspenzi připravené pro *in vitro* testování. Na druhou stranu ale je objem zpracovávaného média v provozních podmínkách o několik řádů vyšší než v podmínkách *in vitro*. V absolutních počtech životaschopných buněk tedy lze reálné chování navrženým experimentálním uspořádáním vhodně namodelovat. Pomocí přepočtů mezi objemy média a densitami bakterií na začátku a na konci tepelného procesu lze zodpovědět mj. tyto otázky:

- Jaká bude denzita daných bakterií ve finálním výrobku, resp. s jakou frekvencí budou výrobky daného objemu pozitivní na výskyt daných bakterií?
- Jaká je míra rizika, že dané bakterie procházejí sledovaným tepelným procesem do dalších technologických kroků, resp. je nalezený zdroj kontaminace za tepelným procesem pravděpodobně jen zdrojem sekundárním?

Neméně důležitými jsou i přepočty mezi modelovými a reálnými podmínkami (teplotami a časy) záhřevů. Jak je uvedeno výše, experimentální měření *in vitro* probíhá pouze v rozsahu teplot a časů, při kterých jsou za podmínek metody získávány experimentálně kvantifikovatelné výsledky. V závislosti na rezistenci konkrétního kmene to znamená, že mezi experimentálně přístupnými teplotami mohou být např. teploty používané při odstředování mléka, homogenizaci smetany, dohřívání sýřeniny, praní plachetek při nízké teplotě, aj. Naopak je pravděpodobné, že např. účinek pasterace nebo sanitace v CIP okruzích budou muset být na relevantní teploty přepočítány s využitím z-hodnot. D-hodnoty se využijí např., pokud v experimentálním systému poklesne denzita bakterií pod mez detekce v čase kratším, než je doba trvání reálného tepelného procesu. Pokles denzity pod mez detekce totiž neznamená dosažení sterility, ale pouze posun na logaritmické stupnici k nižším hodnotám, což v reálných podmínkách odráží pozitivitu ve větším objemu média. V úvahu je rovněž nutno vzít dobu trvání případné lag-fáze – inaktivační účinek záhřevu na bakterie se začne významně projevovat až po jejím uplynutí. To v praxi může znamenat, že po významnou část z celkové doby trvání tepelného procesu nemusejí být některé kmeny prakticky vůbec ovlivněny.

Na druhou stranu denzita bakterií v době po dosažení fáze sníženého inaktivačního účinku se při výpočtech nezohledňuje, neboť nelze spolehlivě stanovit, jak velká subpopulace daného kmene bude v reálných podmínkách konkrétního výrobního dne rezistentní. Nicméně pokud je „tailing“ pro daný kmen a teplotu zjištěn, znamená to zvýšené riziko přežívání a průchodu dotčených bakterií tepelným procesem a lze doporučit, aby byla zvažována možnost zvýšení teploty na hodnoty, při kterých už k „tailingu“ nedochází. Obdobné doporučení platí také v případě, že se inaktivační účinek záhřevu ukázal jako nedostatečný, a to pokud je určitý inaktivační účinek u daného tepelného procesu požadován.

V následující kapitole jsou uvedeny konkrétní příklady.

Příklady

Příklad 1 – Základní výpočet D- a z-hodnoty

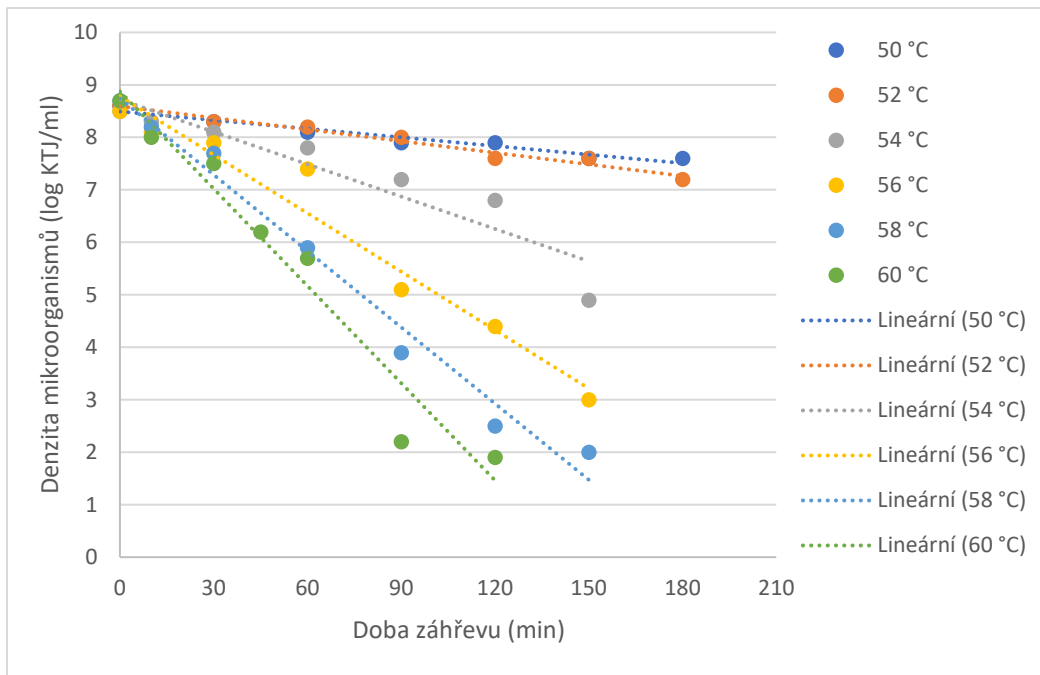
Naměřena byla primární data uvedená v tab. I. Data byla zanesena do X-Y bodového grafu (obr. 2) a pomocí funkce lineární regrese byla proložena inaktivačními přímkami. Z rovnic přímek byly vypočteny D-hodnoty, které jsou rovněž uvedeny v tab. I. Následně byly D-hodnoty logaritmovány, zaneseny do X-Y bodového grafu (obr. 3) a pomocí funkce lineární regrese proloženy přímkou:

$y = -0,1136x + 7,922$, $R^2 = 0,9461$, ze které plyne, že

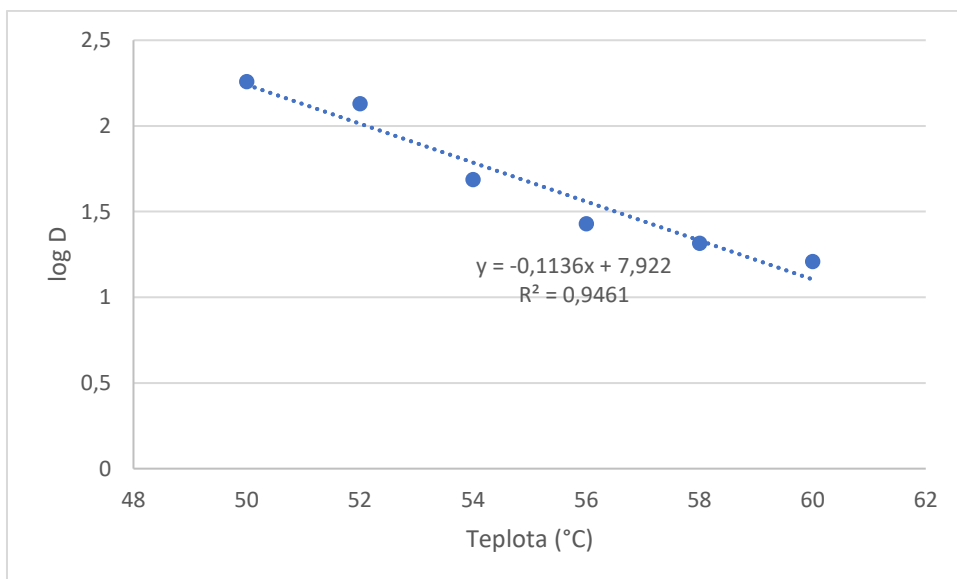
$z = 1/0,1136 = 8,8$ °C

Tab. I: Primární data a postup výpočtu D-hodnot k příkladu 1

Teplota (°C)	Doba záhřevu (min)	Denzita mikroorganismů (log KTJ/ml)	Výpočet
50	0	8,6	lineární regrese: $y = -0,0055x + 8,4929$ $R^2 = 0,9446$ $D(50) = 1/0,0055 = 182 \text{ min}$
	30	8,3	
	60	8,1	
	90	7,9	
	120	7,9	
	150	7,6	
	180	7,6	
52	0	8,6	lineární regrese: $y = -0,0074x + 8,5929$ $R^2 = 0,9707$ $D(52) = 1/0,0074 = 135 \text{ min}$
	30	8,3	
	60	8,2	
	90	8,0	
	120	7,6	
	150	7,6	
	180	7,2	
54	0	8,5	lineární regrese: $y = -0,0205x + 8,7211$ $R^2 = 0,8773$ $D(54) = 1/0,0205 = 49 \text{ min}$
	10	8,3	
	30	8,1	
	60	7,8	
	90	7,2	
	120	6,8	
	150	4,9	
56	0	8,5	lineární regrese: $y = -0,0371x + 8,781$ $R^2 = 0,9600$ $D(56) = 1/0,0371 = 27 \text{ min}$
	10	8,1	
	30	7,9	
	60	7,4	
	90	5,1	
	120	4,4	
	150	3,0	
58	0	8,7	lineární regrese: $y = -0,0484x + 8,7401$ $R^2 = 0,9812$ $D(58) = 1/0,0484 = 21 \text{ min}$
	10	8,2	
	30	7,7	
	60	5,9	
	90	3,9	
	120	2,5	
	150	2,0	
60	0	8,7	lineární regrese: $y = -0,0617x + 8,8743$ $R^2 = 0,9538$ $D(60) = 1/0,0617 = 16 \text{ min}$
	10	8,0	
	30	7,5	
	45	6,2	
	60	5,7	
	90	2,2	
	120	1,9	



Obr. 2: Data pro určení D-hodnot k příkladu 1



Obr. 3: Data pro určení z-hodnoty k příkladu 1

Příklad 2 – Určení doby trvání lag-fáze

Pro teplotu 56 °C byla naměřena primární data uvedená v tab. II. Pokud by všechna naměřená data byla použita pro výpočet D-hodnoty, byla by lineární regresí získána rovnice:

$$y = -0,0189x + 7,7948, R^2 = 0,8692$$

a z ní plynoucí $D(56) = 53$ min.

Z dat je ale vizuálně patrná existence lag-fáze po dobu cca 1 hodiny. Jak znázorňuje obr. 4, byly proto body v časech 0 až 45 minut proloženy přímkou:

$$y = -0,0027x + 6,91, R^2 = 0,8000$$

a body v časech 60 až 180 minut přímkou:

$$y = -0,028x + 8,6667, R^2 = 0,9802, \text{ ze které plyne}$$

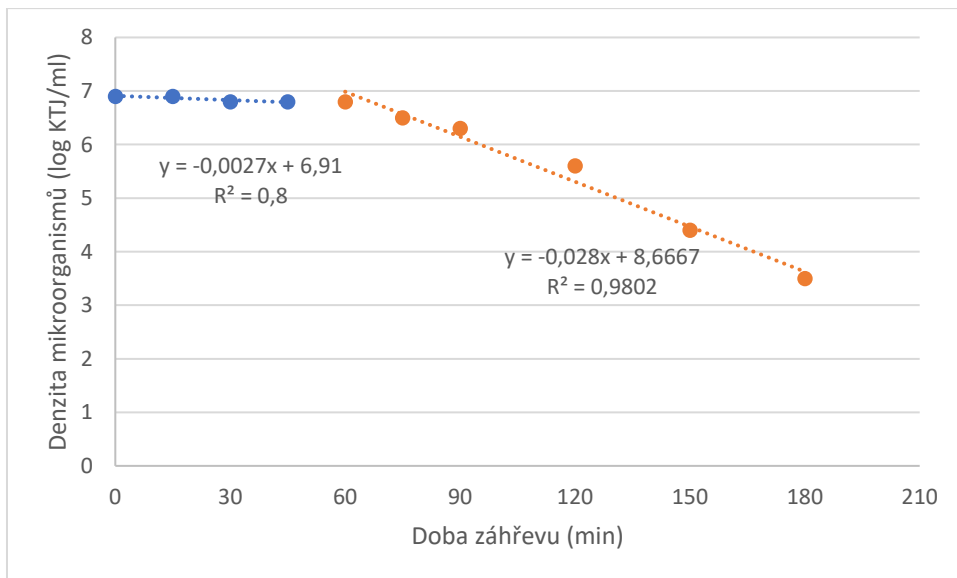
D(56) = 36 min.

Doba trvání lag-fáze se určí jako průsečík obou přímek, tedy:
 $-0,0027x + 6,91 = -0,028x + 8,6667$
 $0,0253x = 1,7567$
 $x = 69 \text{ min}$

Z výsledků vyplývá, že pro tepelné procesy trvající při 56 °C přibližně hodinu ke snížení denzity daného kmene prakticky nedojde. O řád se jeho denzita sníží až po $69 + 36 = 105 \text{ min}$, tedy za dvojnásobnou dobu, než by se mylně mohlo zdát při opomenutí existence lag-fáze. Naopak při dlouhodobějším působení této teploty by mikroorganismy byly inaktivovány rychleji, a to se snížením denzity o jeden řád přibližně každou půlhodinu.

Tab. II: Primární data k příkladu 2

Doba záhřevu (min)	Denzita mikroorganismů (log KTJ/ml)
0	6,9
15	6,9
30	6,8
45	6,8
60	6,8
75	6,5
90	6,3
120	5,6
150	4,4
180	3,5



Obr. 4: Data pro určení D-hodnoty k příkladu 2

Příklad 3 – Určení doby do začátku fáze sníženého inaktivačního účinku

Pro teplotu 54 °C byla naměřena primární data uvedená v tab. III, ze které je patrné, že po určité době trvání záhřevu se denzita mikroorganismů začala opět zvyšovat. Jak znázorňuje obr. 5, body v časech 0 až 90 minut byly proloženy přímkou:
 $y = -0,0498x + 8,0229$, $R^2 = 0,9615$, ze které plyne

D(54) = 20 min

a body v časech 120 až 160 min přímkou:

$$y = 0,0193x + 1,525, R^2 = 0,9423$$

Doba do začátku fáze sníženého inaktivačního účinku se stanoví jako průsečík obou přímek, tedy:

$$- 0,0498x + 8,0229 = 0,0193x + 1,525$$

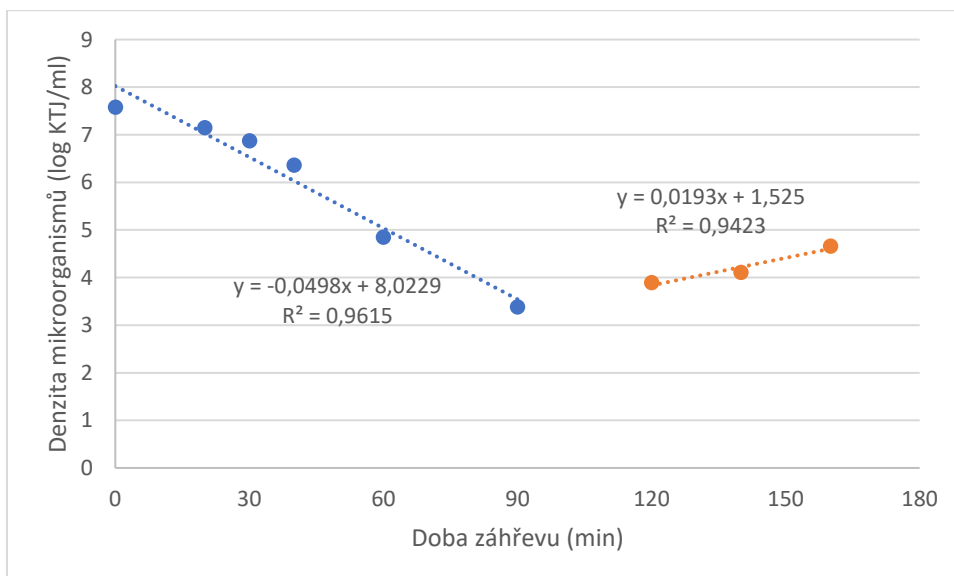
$$0,0691x = 6,4979$$

$$x = 94 \text{ min}$$

Vypočtená D-hodnota je tedy aplikovatelná na procesy trvající nanejvýš 1,5 hodiny, poté se již účinnost inaktivace daného kmene začíná snižovat. Subpopulace daného kmene se na zvýšenou teplotu postupně adaptují a začínají růst. Pokud tedy má tepelný proces trvat déle a zároveň je žádoucí denzitu mikroorganismů snižovat, měla by být zvážena možnost teplotu procesu zvýšit.

Tab. III: Primární data k příkladu 3

Doba záhřevu (min)	Denzita mikroorganismů (log KTJ/ml)
0	7,58
20	7,15
30	6,87
40	6,36
60	4,85
90	3,38
120	3,92
140	4,11
160	4,43



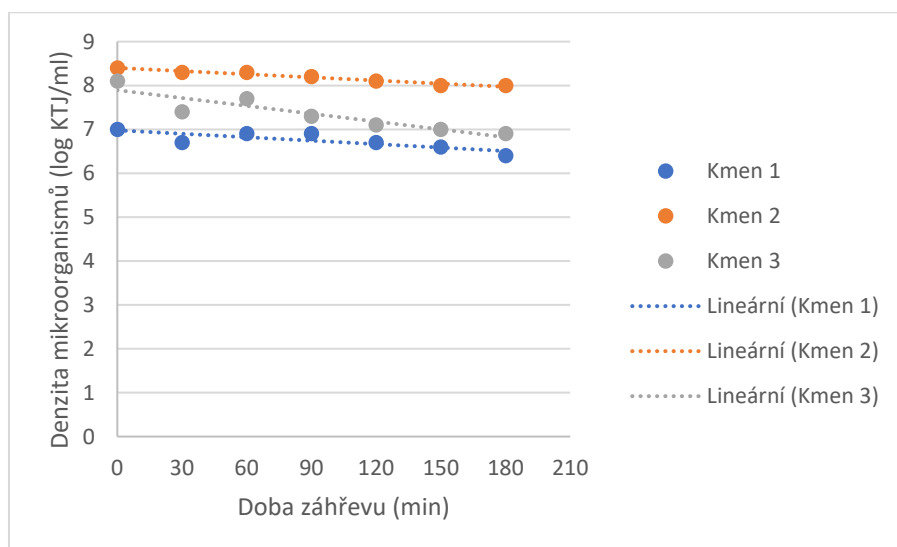
Obr. 5: Data pro určení D-hodnoty k příkladu 3

Příklad 4 – Nedostatečný inaktivační účinek záhřevu

Pro tři rezistentní kmeny byla při 50 °C naměřena primární data uvedená v tab. IV a znázorněná na obr. 6. Densita všech tří kmenů byla při této teplotě téměř konstantní, vykazující jen velmi mírně klesající tendenci. Za pozornost stojí velké rozdíly mezi vypočtenými koeficienty determinace, a to přesto, že žádný z bodů nevykazuje přílišnou odchylku od regresních přímek a jednotlivé body se na ose y mezi sebou liší pouze o několik desetín. Pro D-hodnoty srovnatelné nebo vyšší než proměřená doba záhřevu v takovém případě nízký koeficient determinace neznačí chybu a není důvodem pro opakování pokusu.

Tab. IV: Primární data, lineární regrese a D-hodnoty k příkladu 4

Kmen	Doba záhřevu (min)	Denzita mikroorganismů (log KTJ/ml)	Výpočet
1	0	7,0	lineární regrese: $y = -0,0026x + 6,9786$ $R^2 = 0,6722$ D(50) = 384 min
	30	6,7	
	60	6,9	
	90	6,9	
	120	6,7	
	150	6,6	
	180	6,4	
2	0	8,4	lineární regrese: $y = -0,0024x + 8,4$ $R^2 = 0,9615$ D(50) = 417 min
	30	8,3	
	60	8,3	
	90	8,2	
	120	8,1	
	150	8,0	
	180	8,0	
3	0	8,1	lineární regrese: $y = -0,006x + 7,8929$ $R^2 = 0,8289$ D(50) = 167 min
	30	7,4	
	60	7,7	
	90	7,3	
	120	7,1	
	150	7,0	
	180	6,9	



Obr. 6: Data pro určení D-hodnot k příkladu 4

Příklad 5a – Řešení technologických otázek

Meziprodukt obsahuje 500 KTJ/ml nežádoucího kmene mikroorganismů, pro nějž byla stanovena $D(60) = 5$ minut. Meziprodukt je podrobován tepelnému procesu, který probíhá při 60 °C po dobu 30 minut. Jaká bude frekvence výskytu nežádoucího kmene ve výrobcích balených po 100 ml?

Protože je $D(60) = 5$ min a proces trvá 30 minut, poklesne během něj denzita mikroorganismů o $30/5 = 6$ řádů.

Denzita mikrobiální kontaminace před tepelným procesem je 500 KTJ/ml = 2,7 log KTJ/ml. Pokles denzity o 6 řádů znamená pokles na hodnotu $2,7 - 6 = -3,3$ log KTJ/ml = 0,0005 KTJ/ml.

Daná šarže finálního výrobku bude obsahovat kontaminaci nežádoucím kmenem ve výši 0,0005 KTJ/ml. Při velikosti balení 100 ml to obnáší $0,0005 * 100 = 0,05$ KTJ/výrobek. Desetinné číslo vyjádříme pomocí zlomku, tedy $5/100 = 1/20$ KTJ/výrobek.

Přirozeně nemusí být distribuce daného kmene ve výrobcích rovnoměrná, nicméně lze konstatovat, že pozitivní výskyt lze očekávat nanejvýš v 1 z 20 výrobků.

Příklad 5b – Řešení technologických otázek

V technologickém zařízení zařazeném za tepelným procesem byl opakovaně detekován nežádoucí bakteriální kmen s $D(54) = 20$ minut a lag fází, která při 54 °C trvá 15 minut. Tepelný proces probíhá při 54 °C po dobu 1 hodiny. V meziproduktu před tepelným ošetřením byly opakovaně detekovány bakterie obdobných vlastností s průměrnou frekvencí 1 pozitivní záchyt ve 100 ml meziproduktu. Existuje riziko, že daný kmen prochází tepelným procesem a nabohacuje tak ložisko perzistujícího kmene?

Tepelný proces sice trvá 60 min, avšak sledované bakterie vykazují lag-fázi v délce 15 minut, tzn. na účinnou inaktivaci připadá pouze $60 - 15 = 45$ min. Protože je $D(54) = 20$ min, poklesne během tepelného procesu denzita bakterií o $45/20 = 2,25$ řádu.

Počáteční denzita sledovaných mikroorganismů je 1 KTJ/100 ml = 0,01 KTJ/ml = -2 log KTJ/ml. Pokles denzity o 2,25 řádu znamená pokles na hodnotu $-2 - 2,25 = -4,25$ log KTJ/ml = 0,00006 KTJ/ml. Desetinné číslo vyjádříme pomocí zlomku, tedy 6 KTJ/100.000 ml = 6 KTJ/100 litrů.

Je nepravděpodobné, že by se bakterie vyskytující se v takto nízké denzitě dostaly do přímého kontaktu s technologickým zařízením za tepelným ošetřením a že by ho následně kolonizovaly. Nicméně teoreticky to možné je. Zdroj kontaminace by ještě před tepelným procesem měl být hledán, pokud by zpracovávaný objem meziproduktu byl velký, popř. meziprodukt byl naformován do částí menších rozměrů, a tedy s velkým povrchem (např. menší sýry), meziprodukt byl na výskyt sledovaných bakterií opakovaně pozitivní a pokud by podmínky za tepelným procesem v místě výskytu perzistujícího kmene byly pro jeho dlouhodobé přežívání a růst nepříznivé. V opačném případě se jeví jako více pravděpodobné, že výskyt perzistujícího kmene za tepelným procesem na jeho pravidelném přísunu prostřednictvím meziproduktu nezávisí.

Příklad 5c – Řešení technologických otázek

Pro sledovaný kmen byly naměřeny D-hodnoty a z-hodnota uvedené v příkladu 1. Jaké je riziko průchodu tohoto kmene tepelným procesem probíhajícím při 65 °C po dobu 30 minut? Velikost zpracovávané šarže je 1.000 litrů a denzita kmene před tepelným procesem 1.000 KTJ/ml.

Při řešení tohoto problému je možné použít dva přístupy. První přístup vychází ze z-hodnoty, která byla stanovena na 8,8 °C, po zokrouhlení 9 °C. Protože je teplota tepelného procesu 65 °C, k odhadu jeho inaktivačního účinku lze nejspíše použít D-hodnotu stanovenou při teplotě $65 - 9 = 56$ °C.

Jak bylo stanoveno, $D(56) = 27$ min. Při zvýšení teploty o hodnotu odpovídající z-hodnotě se desetkrát zkrátí doba potřebná ke snížení denzity mikroorganismů o jeden řád, tedy desetkrát se sníží D-hodnota. Proto $D(65) = 27/10 = 2,7$ min.

Za 30 minut trvání tepelného procesu se denzita mikroorganismů sníží o $30/2,7 = 11$ řádů. Tento inaktivační účinek se jeví jako dostatečný, protože ke snížení denzity daného kmene z 1.000 KTJ/ml na negativní hodnotu při rozboru 1 ml je potřeba pokles o 3 řády a k dosažení negativní hodnoty v celém objemu šarže 1.000 litrů = 1.000.000 ml je potřeba pokles o dalších 6 řádů, tedy celkem minimálně o 9 řádů.

Druhý přístup je přesnější, neboť nevychází z jediné regresní přímky pro určení $D(56)$ -hodnoty, ale z celého souboru naměřených dat a z nich plynoucí regresní přímky použité pro stanovení z-hodnoty, tedy:

$$y = -0,1136x + 7,922.$$

Po dosažení teploty procesu 65 °C vychází, že:

$$\log D(65) = -0,1136 * 65 + 7,922$$

$$\log D(65) = 0,538$$

$$D(65) = 3,45 \text{ min}$$

Za 30 minut trvání tepelného procesu se denzita mikroorganismů sníží o $30/3,45 = 8,7$ řádu, avšak potřebný pokles denzity je minimálně o 9 řádů. Z toho plyne riziko, že $9 - 8,7 = 0,3 \log$ KTJ/šarži = 2 KTJ/šarži projde tepelným procesem. Pro vyšší technologickou jistotu lze doporučit prodloužení tepelného procesu na 35 minut, což povede ke snížení denzity mikroorganismů o dostatečných $35/3,45 = 10,1$ řádu.

Srovnání novosti postupů

Pro posuzování rezistence bakterií vůči záhřevu na (sub)pasterační teploty existuje řada experimentálních uspořádání, která více nebo méně ovlivňují získané výsledky. Někdy je měření prováděno v syntetických tekutých médiích, jindy v mléce, smetaně a dalších reálných tekutých médiích. Výhodou použití reálných médií je možnost modelovat protektivní účinek složek média, zejména pak tuku, který se uplatňuje jako tepelná izolace bakterií. Médium je společně s bakteriemi vystavováno experimentální teplotě prostřednictvím různě uspořádaných experimentálních sestav. Například Blackburn a kol. (1997) použili ponorný ohřivač, Murano a Pierson (1992) zkumavky předehřáté ve vodní lázni, Lehotová a kol. (2021) skleněné kapiláry temperované ve vodní lázni, Li a kol. (2017) hliníkovou celu ponořenou do vodní lázně, Peng a kol. (2013) deskový tepelný výměník.

Předložená metodika vychází z experimentálního uspořádání, které popsali Nazarowec-White a Farber (1997) a adaptuje ho na laboratorní vybavení běžně komerčně dostupné v ČR. Toto uspořádání bylo vybráno, protože v sobě kumuluje tyto výhody:

- snadná dostupnost a nízká pořizovací cena experimentálního zařízení,
- možnost měření v reálných tekutých médiích (např. kapiláry pro tučnější média vhodné nejsou),
- mžikový ohřev mikroorganismů na experimentální teplotu díky inokulaci malého objemu do média (bez nutnosti společného ohřevu mikroorganismů, média a

experimentální nádoby, resp. bez nutnosti vytemperovanou nádobu s médiem při inokulaci a odběru vzorků vyjímat z vodní lázně a narušovat tak ustálený stav),

- homogenní ohřev bez lokálního přehřívání díky míchadlu uvnitř média,
- přesné měření doby záhřevu a rychlé chlazení díky odběru vzorků z média přímo do fyziologického roztoku pro desítkové ředění.

Z naměřených dat jsou kalkulovány D- a z-hodnoty, jak ve svém modelu zavedli Bigelow a Esty (1920). Výhodami tohoto modelu je, že:

- je používán dlouhodobě a nejčastěji, a tedy získané výsledky lze snadno porovnat s pracemi jiných autorů a např. sledovat variabilitu jednotlivých kmenů v rámci druhu nebo vývoj rezistence druhu v průběhu několika desetiletí,
- dává výsledky, které nejsou jen matematickým modelem, ale navíc také přímo odrážejí chování daného mikroorganismu v reálných podmínkách, a to jak vzhledem k době, tak teplotě záhřevu.

Na druhou stranu ale tento model má i své nevýhody. Je to dáno tím, že vyžaduje proložení naměřených dat pouze přímkou, avšak ne vždy data přímce odpovídají. To může mít za následek zkreslení výsledků, jak je ilustrováno mj. v příkladu 2. Kromě toho tak může být zastřena existence rezistentních subpopulací nebo přítomnost lag-fáze. To může představovat i významnou logickou chybu, neboť doba trvání lag-fáze může být v některých případech souměřitelná s dobou trvání tepelného procesu.

S uvedenými nedostatky se pokusilo vypořádat několik autorů pomocí různých matematických modelů. Tyto modely jsou popsány v přehledové práci, kterou publikovali Van Impe a kol. (2018). Přestože uvedené modely více či méně úspěšně řeší nedostatky Bigelow-Esty modelu, na druhou stranu však nedosahují s ním srovnatelných výhod. Jako příklad uveďme Weibullův model. Ten namísto D- a z-hodnot definuje parametr δ (h), jakožto čas potřebný pro dosažení první redukce o jeden řád, a abstraktní parametr p , který definuje zakřivení inaktivační křivky ($p < 1$ pro průběh konvexní a $p > 1$ pro průběh konkávní). S podobným modelem pracují také Lehotová a kol. (2021), kteří definují t_{4D} -hodnotu, jakožto čas potřebný pro snížení denzity mikroorganismů o 4 řády.

Předložená metodika je unikátní v tom, že zachovává použití D- a z-hodnot a dle potřeby je doplňuje o nové parametry „doba trvání lag-fáze“ a „doba do začátku fáze sníženého inaktivačního účinku“.

S tím, jak jsou navrhovány nové a složitější modely, postupuje také vývoj nových softwarových nástrojů, které mají zpřístupnit výsledky modelů uživatelům z výrobní praxe. Pro vyhodnocení modelů, které nemají log-lineární průběh, existuje např. freewarový nástroj GInaFiT (Geeraerd a kol., 2005). Pro určení D- a z-hodnot v jednom kroku byl navržen algoritmus IPMP Global Fit (Huang, 2017).

Jak je však výše popsáno a na příkladech ilustrováno, v kontextu řešení technologických problémů se vyplatí ruční zpracování a kritický pohled na naměřená data. Pro vyhodnocení dat podle předložené metodiky plně postačuje lineární regrese, jakožto funkce běžně dostupná v tabulkovém kalkulátoru, jakým je např. MS Excel. Pro zájemce o sofistikovanější statistické zpracování dat jsou na příslušných místech metodiky indikovány doporučené statistické postupy. Ty jsou velmi dobře popsány např. v knize, kterou publikovali Meloun a Militký (2013).

Popis uplatnění metodiky

Uzavřena byla smlouva o uplatnění metodiky s uživatelem Českomoravský svaz mlékárenský z.s. Metodika je určena k realizaci v servisních, poradenských a výzkumných laboratořích činných v oborech mlékárenství a obecně potravinářství a mikrobiologie. Má sloužit jak pro účely získávání nových poznatků na poli mikrobiologie, tak pro potřeby poradenství poskytovaného výrobcům mlékárenských a dalších potravinářských výrobků. Výsledky získané podle této metodiky mají napomoci při zavádění nových výrobků a technologických postupů do výroby a při řešení problémů spojených s výskytem technologicky a/nebo zdravotně rizikových bakterií. Tím přispějí ke zvýšení technologické jistoty a mikrobiologické kvality a bezpečnosti potravin.

Ekonomické aspekty

Metodika je určena k provádění ve standardně vybavené laboratoři klasické kultivační mikrobiologie. Pro její zavedení je navíc potřeba vyhřívaná plotýnka s magnetickým míchadlem a sondou pro regulaci teploty uvnitř míchaného média. Pořizovací cena zařízení je v době vzniku této metodiky pod 35 tis. Kč.

Lze očekávat, že cena za proměření jednoho kmene v externí laboratoři v rozsahu podle této metodiky bude odhadem okolo 15 tis. Kč a zisk se bude pohybovat okolo 3 tis. Kč.

Pro konečného uživatele, tedy výrobce mlékárenských aj. potravinářských výrobků, bude ekonomický přínos záviset na závažnosti mikrobiologického problému, který se díky této metodice podaří vyřešit. Odhadem se zamezení ztrát v důsledku výroby neshodných výrobků může pohybovat ve výši řádově stovek tisíc až milionu korun pro každý vyřešený problém.

Seznam použité související literatury

- Bigelow W.D., Esty J.R. (1920): Thermal death point in relation to the time of typical thermophilic organisms. *The Journal of Infection Diseases*, 27: 602-617.
- Blackburn C.W., Curtis L.M., Humpheson L., Billon C., McClure P.J. (1997): Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factors. *International Journal of Food Microbiology*, 38: 31-44.
- Geeraerd A.H., Valdramidis V.P., Van Impe J.F. (2005): GInaFit, a freeware tool to assess non-log-linear microbial survival curves. *International Journal of Food Microbiology*, 102 (1): 95-105.
- Huang L. (2017): IPMP Global Fit – A one-step direct data analysis tool for predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*, 262: 38-48.
- Lehotová V., Miháliková K., Medved'ová A., Valík L. (2021): Modelling the inactivation of *Staphylococcus aureus* at moderate heating temperatures. *Czech Journal of Food Sciences*, 39: 42-48.
- Li R., Shi Y., Ling B., Cheng T., Huang Z., Wang S. (2017): Thermo-tolerance and heat shock protein of *Escherichia coli* ATCC 25922 under thermal stress using test cell method. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 29: 91-97.
- Meloun M., Militký J. (2013): *Kompendium statistického zpracování dat*. Karolinum. ISBN 978-80-246-2196-8.
- Murano E.A., Pierson M.D. (1992): Effect of heat shock and growth atmosphere on the heat resistance of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 55: 171-175.
- Nazarowec-White M., Farber J.M. (1997): Thermal resistance of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted dried-infant formula. *Letters of Applied Microbiology*, 24: 9-13.

- Peng S., Hummerjohann J., Stephan R., Hammer P. (2013): Heat resistance of *Escherichia coli* strains in raw milk at different subpasteurization conditions. *Journal of Dairy Science*, 96: 3543-3546.
- Van Impe J., Smet C., Tiwari B., Greiner R., Ojha S., Stulić V., Vukušić T., Režek Jambrak A. (2018): State of the art of nonthermal and thermal processing for inactivation of microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 125, 16-35.

Seznam publikací, které předcházely metodice

- Němečková I., Havlíková Š., Gelbíčová T., Pospíšilová L., Hromádková E., Lindauerová J., Baráková A., Karpíšková R. (2020): Heat-resistance of suspect persistent strains of *Escherichia coli* from cheesemaking plants. *Czech Journal of Food Sciences*, 38: 323-329.
- Němečková I., Schmidtová M., Rohacká H., Roubal P., Drbohlav J. (2011): Metody stanovení a charakterizace termorezistentních mikroorganismů v mléce. *Mlékařské listy – Zpravodaj*, 125: I-IV.