



IDF Factsheets 22/2022

Uwaga: Niniejsze tłumaczenie na język polski zostało sfinansowane ze środków FUNDUSZU PROMOCJI MLEKA

Oznaczanie liczby clostridiów powodujących powstawanie kwasu masłowego (wady sera - “psucie”) – rozważania metodologiczne

Niniejszy dokument został opracowany przez Grupę Zadaniową H 26 Stałego Komitetu ds. Harmonizacji Metod Mikrobiologicznych (SCHMM) - Rozważania metod liczenia przetrwalników clostridii powodujących powstawanie kwasu masłowego (wady sera “psucie sera “)

Pomysł: Stworzenie podstaw

Odbiorca: Odpowiedni eksperci

Późne wzdęcia sera są istotnym problem, szczególnie w produkcji serów twardych lub pół-twardych. Powstawanie wady sera, nawet dyskwalifikacja produktu przyczyniają się do marnotrawstwa żywności w łańcuchu spożywczym, obniżanie wydajności i powodowanie licznych problemów i straty ekonomiczne w produkcji serów twardych. Koszty ponoszonych szkód związane z clostridiami psującymi jakość serów zostały uznane jako istotne przez wiele Komitetów Narodowych IDF w połączonej ankiecie przeglądowej na temat nowego

zaproponowanego zadania mającego na celu opublikowanie Biuletynu IDF dotyczącego dostępnych metod określania liczby przetrwalników clostridii produkujących kwas masłowy.

Wprowadzenie

Najpoważniejsza wada “psucia” serów twardych i pół-twardych, tak zwane późne wzdęcia sera, jest spowodowana przez niepożądaną aktywność clostridiów produkujących kwas masłowy podczas dojrzewania sera. Wspomniane beztlenowe bakterie tworzące przetrwalniki, a najbardziej gatunek *Clostridium tyrobutyricum*, produkują nadmierne ilości gazów i kwasów organicznych, które powodują wzdęcia, niepożądane oczkowanie, szczeliny i pęknięcia jak również wyraźne niepożądane posmaki w serze (1).

Występowanie późnego wzdęcia jest do pewnego stopnia spowodowane parametrami technologicznymi takimi jak stężenie soli, pH i warunki dojrzewania sera. Jednakże, najważniejszy wpływ na jakość serów twardych i pół-twardych ma jakość surowego mleka. Przetrwalniki clostridii pochodzą głównie z paszy przedostającej się do surowego mleka ze środowiska obory podczas doju i nie są one wrażliwe na obróbkę cieplną podczas pasteryzacji mleka z powodu ich ciepłoopornego charakteru. Dlatego też, w przypadku serów twardych i pół-twardych, sprawą najwyższego znaczenia jest znajomość poziomu zanieczyszczenia mleka przetrwalnikami do produkcji sera. Wobec tego, w wielu krajach wykrywanie i określanie liczby przetrwalników clostridii w mleku są rutynową oceną jakości surowego mleka. Jednakże, z powodu braku międzynarodowych znormalizowanych metod oznaczania i określania liczby powyższych drobnoustrojów, stosuje się obecnie w praktyce nadmierną liczbę różnych metod oznaczania przetrwalników. Niniejszy dokument ilustruje charakterystyczne cechy najważniejszych z tych metod.

Inne stosowane techniki określania liczby przetrwalników i metody molekularne

Jedną z technik określania liczby przetrwalników w oparciu o liczbę tworzonych kolonii jest filtracja membranowa, głównie stosowana w Szwajcarii (7). Przetrwalniki *Clostridium tyrobutyricum* są określane ilościowo po filtracji ciśnieniowej spasteryzowanej próbki mleka surowego na membranie filtracyjnej oraz inkubacji tej membrany w warunkach beztlenowych przez 3 dni w temperaturze 37°C we wzbogaconej pożywce dla clostridii z dodatkiem cykloseryny i fuksyny kwasowej (8-11). Jednakże omawiana metoda filtracyjna nie może być „zautomatyzowana” i nie nadaje się do zastosowania wobec mleka bawolic, owiec lub kóz, ani do analizy próbek, które zostały zamrożone (8).

Metody molekularne, takie jak ilościowa reakcja polimerazy (PCR) lub półilościowa izotermiczna metoda amplikacji DNA (LAMP) umożliwiają właściwe wykrycie tych bakterii. W metodach tych dolna granica wykrywalności wynosi około 2000 przetrwalników w litrze mleka. Z powodu potrzeby wykrywania poniżej 100 przetrwalników w litrze lub nawet mniej, metody molekularne nie są odpowiednie do monitorowania jakości surowego mleka o niskiej zawartości przetrwalników.

Płatności za jakość mleka

Metody MPN (Most Probable Number) opisane w Tabeli 1 stosowane są w różnych krajach członkowskich IDF jako dodatkowy parametr w celu oceny mleka mającego wpływ na zapłatę za jego jakość. Ponieważ wyniki są uzależnione od stosowanej metody (1, 7, 8) jest ważne, aby wyniki dotyczące oznaczania liczby przetrwalników jak również stosowane limity płatności za jakość mleka były brane pod uwagę w odniesieniu do metody stosowanej w badaniach.

Tabela 1

Nazwa metody	Bryant and Burkey (CNERNA), (3)	Norma Holenderska (NEN 6877), (4)	Mleczan RCM (VDLUFA M7.183.1) (5)	Metoda AMP-6000 (6)
Skrót	BB	NEN	RL	AMP
Pożywka	Pożywka Bryant i Burkey (z resazuryną)	Pożywka mleko-glukoza-mleczan	Wzbogacony zmodyfikowany agar dla clostridii	Chromogeniczna pożywka Ampmedia 666
Stosowany sprzęt	Szklane próbki	Szklane próbki	Szklane próbki	Płytki z mikromianem, mikropróbki
Pasteryzacja	75°C, 10 min	80°C, 10 minut, potem 44-47°C, 15 min	75°C, 10 min	80°C, 20 min
Warunki beztlenowe	Korek parafinowy	Korek parafinowy	Korek parafinowy lub agarowy	Pojemnik do hodowli beztlenowej
Inkubacja	37°C ±1°C, 7 dni	37°C ±1°C, 96 h±4h	37°C ±1°C, 3 do 5 dni	37°C ±1°C, 48h±4h
Ocena	Produkcja gazu prowadzi do uniesienia korka parafinowego	Produkcja gazu prowadzi do uniesienia korka parafinowego	Produkcja gazu prowadzi do uniesienia korka parafinowego lub rozerwania agaru	Wzrost clostridii wywołuje zmianę barwy pożywki z czerwonej na żółtą
Możliwość automatyzacji	Przygotowanie próbki i posiew	Przygotowanie próbki i posiew	Przygotowanie próbki i posiew	Przygotowanie próbki, posiew i ocena wyniku
Kraje posiadające laboratoria akredytowane dla danej metody	Francja, Szwajcaria	Holandia, Niemcy	Niemcy	Austria, Włochy, Szwajcaria
Uwagi	dostępna pożywka granulowana lub w proszku	*tania pożywka *pH musi być regulowane *inkubacja z	dostępna pożywka granulowana lub w proszku	*dostępna pożywka gotowa do użycia *nie wymagana

	<p>*Nie wymagana regulacja pH</p> <p>*inkubacja z korkiem parafinowym, mała liczba powtórzeń zgodnie z rutynowym postępowaniem</p> <p>*(duże przedziały ufności mimo dużej objętości próbek i pożywek)</p> <p>*specyficzność dla Clostridium spp wynosi 37% (7)</p>	<p>nakładką parafiny</p> <p>*zmienna liczba powtórzeń i objętości badanych</p> <p>protokołem rutynowym</p> <p>*krótka trwałość (24h) pożywki, roztworu mleko-glukoza-mleczan</p> <p>* specyficzność dla Clostridium spp 58% (7)</p>	<p>*pH musi być regulowane</p> <p>*inkubacja z korkiem parafinowym</p> <p>*niska liczba powtórzeń badanych zgodnie z rutynowym postępowaniem</p> <p>*konieczny szybki posiew, aby uniknąć zestalenia pożywki</p> <p>*specyficzność dla Clostridium spp. wynosi 39% (7)</p>	<p>regulacja pH</p> <p>*ściśle beztlenowy posiew w aparatach beztlenowych</p> <p>*ilościowe określanie przetrwalników clostridii w szerokim zakresie obecności</p> <p>*wysoka liczba powtórzeń zgodnie z rutynowym postępowaniem</p> <p>pożywka do jednorazowego stosowania.</p> <p>Wysoka specyficzność dla clostridii spp. wynosi 95% (6)</p>
--	---	---	--	---

Zasada Najbardziej Prawdopodobnej Liczby (NPL) wykrywania i określania liczby przetrwalników clostridii w mleku.

Tylko kilka lub nawet pojedyncze przetrwalniki clostridii obecne w mleku surowym mogą spowodować poważne wady sera twardego. Aby uzyskać tak niski próg wykrywalności i limity ilościowego określania liczby przetrwalników, najbardziej odpowiednia jest metoda Określania Najbardziej Prawdopodobnej Liczby (NPL) (ISO 7218:2014) (1, 2). Ogólnie biorąc, układ w NPL może być przystosowany do wymagań określonych przepisów i dla celów praktycznych. Jednym z najważniejszych parametrów w metodzie NPL jest liczba próbek wziętych do oznaczania lub ilość mleka pobranego do pomiaru, gdyż niepewność pomiaru maleje wraz ze zwiększoną liczbą próbek do analizy.

Literatura

1. Brändle, J., Domig, K.J., & Kneifel, W. (2016) Relevance and analysis of butyric acid producing clostridia in milk and cheese. Food Control, 67, 96-113, <https://doi.org/10.1016/j.food-cnt.2016.02.038>

2. ISO 7218:2014, Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations (ISO 7218:2007+Amd1:2013)
3. CNERNA, 1986. Recommandations pour l'estimation de la contamination du lait en spores de Clostridia par la méthode de culture en milieu liquide. Revue Laitière Française, 451, 39-45
4. NEN 6877 (202) Milk and milk products – Detection of spores of butyric acid bacteria and enumeration of spores of butyric acid bacteria by MPN technique, <https://www.nen.nl/en/nen-6877-2020-nl-276199>
5. VDLUFA (Verband Deutscher landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten e.V.), M718.3.1 (1996) Bestimmung von Käseerschädlichen Clostridien, Verfahren mit pH-modifiziertem RCM agar, info@vdlufa.eu
6. Brändle, J., Heinzle, L., Franerger, V., Berta, J., Zitz, U., Schinkinger, M., Stocker, W., Kneifel, W. & Domig, K.J. (2018). Novel approach to enumerate clostridial endospores in milk, Food Control, 85, 318-326, <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.017>
7. Brändle, J., Fraberger, V., Schuller, K., Zits, U., Kneifel, W & Domig K.J. (2017). A critical assessment of four most probable number procedures for routine enumeration of cheese-damaging clostridia in milk. International Dairy Journal 73, 109-115, <https://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.05.011>
8. Jakob, E & Glauser, D (2019). Comparaison de méthodes de quantification des bactéries butyriques dans le lait. Recherche Agronomique Suisse 10(10) :338-395, https://www.agraforschungschweiz.ch/wpcontent/uploads/pdf_archive/2019_10_f_25_03.pdf
9. Bourgeois, C.M., Le Parc, O., Abgrall, B., Cleret, J.-J. (1984) Membrane Filtration of milk for counting spores of *Clostridium tyrobutyricum*. Journal of Dairy Science, 67, 2493-2499
10. Jakob, E. (2011) Analytik rund um die Buttersäuregärung. ALP Forum Nr 85
11. ALP-Methodenvorgabe (2011)“Quantitative Bestimmung käseschädlicher anaerober Sporen in Milch und Wasser – Membranfiltertechnik mit Selektivmedium“ vom 14.12.2011
12. Arnaboldi, S., Benevenia, R., Bertasi, B., Mangeri, L., Tilola, M., Bassi, D., Coconcelli, P.S., Stroppa A. & Varisco, G. (2021). Validation of a real-time PCR method on pta gene for Clostridium tyrobutyricum quantification in milk, Food Control, 130 (2021) 108250, <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108250>
13. Cecere, P., Gatto, F., Cortimiglia, C., Bassi, D., Lucchini, F., Coconcelli, P.S., &Pompa, P.P. (2021). Colorimetric Point-of-Care Detection of Clostridium tyrobutyricum Spores in Milk Samples. Biosensors 2021, 11, 293, <https://doi.org/10.3390/biob11090293>

Tabela

Nazwa metody	Bryant and Burkey	Norma Holenderska	Mleczan RCM (VDLUFA	Metoda AMP-6000 (6)
--------------	-------------------	-------------------	---------------------	---------------------

	(CNERNA), (3)	(NEN 6877), (4)	M7.183.1) (5)	
Skrót	BB	NEN	RL	AMP
Pożywka	Pożywka Bryant i Burkey (z resazuryną)	Pożywka mleko-glukoza-mleczan	Wzbogacony zmodyfikowany agar dla clostridii	Chromogeniczna pożywka Ampmedia 666
Stosowany sprzęt	Szklane probówki	Szklane probówki	Szklane probówki	Płytki z mikromianem, mikroprobówki
Pasteryzacja	75°C, 10 min	80°C, 10 minut, potem 44-47°C, 15 min	75°C, 10 min	80°C, 20 min
Warunki beztlenowe	Korek parafinowy	Korek parafinowy	Korek parafinowy lub agarowy	Pojemnik do hodowli beztlenowej
Inkubacja	37°C ±1°C, 7 dni	37°C ±1°C, 96 h±4h	37°C ±1°C, 3 do 5 dni	37°C ±1°C, 48h±4h
Ocena	Produkcja gazu prowadzi do uniesienia korka parafinowego	Produkcja gazu prowadzi do uniesienia korka parafinowego	Produkcja gazu prowadzi do uniesienia korka parafinowego lub rozerwania agaru	Wzrost clostridii wywołuje zmianę barwy pożywki z czerwonej na żółtą
Możliwość automatyzacji	Przygotowanie próbki i posiew	Przygotowanie próbki i posiew	Przygotowanie prób i posiew	Przygotowanie próbki, posiew i ocena wyniku
Kraje posiadające laboratoria akredytowane dla danej metody	Francja, Szwajcaria	Holandia, Niemcy	Niemcy	Austria, Włochy, Szwajcaria
Uwagi	dostępna pożywka granulowana lub w proszku *Nie wymagana regulacja pH *inkubacja z korkiem parafinowym, mała liczba powtórzeń zgodnie z rutynowym postępowaniem *(duże przedziały ufności mimo dużej objętości próbek i	*tania pożywka *pH musi być regulowane *inkubacja z nakładką parafiny *zmienna liczba powtórzeń i objętości badanych protokołem rutynowym *krótka trwałość (24h) pożywki, roztworu mleko-glukoza-mleczan *specyficzność dla Clostridium	dostępna pożywka granulowana lub w proszku *pH musi być regulowane *inkubacja z korkiem parafinowym *niska liczba powtórzeń badanych zgodnie z rutynowym postępowaniem *konieczny szybki posiew, aby uniknąć zestalenia	*dostępna pożywka gotowa do użycia *nie wymagana regulacja pH *ściśle beztlenowy posiew w aparatach beztlenowych *ilościowe określanie przetrwalników clostridii w szerokim zakresie obecności *wysoka liczba powtórzeń zgodnie z

	pożywek) *specyficzność dla Clostridium spp wynosi 37% (7)	spp 58% (7)	pożywki *specyficzność dla Clostridium spp.wynosi 39% (7)	rutynowym postępowaniem pożywka do jednorazowego stosowania. Wysoka specyficzność dla clostridii spp.wynosi 95% (6)
--	--	-------------	---	--