

WPROWADZENIE

W ostatnich latach rosnącym zainteresowaniem konsumentów cieszą się sery wytwarzane metodami rzemieślniczymi. Ich przykładem są sery górskie takie jak: bundz, bryndza, gołka, redykołka czy oscypek. Sery te są wytwarzane z niepasteryzowanego mleka, najczęściej owczego lub mieszanego (owczo-krowiego). Ich produkcja bazuje na spontanicznych fermentacji, w których biorą udział mikroorganizmy obecne zarówno w surowym mleku, jak i całym otoczeniu produkcyjnym. Z powyższych względów mikrobiota serów rzemieślniczych cechuje się większą różnorodnością i zmiennością od mikrobioty serów wytwarzanych w warunkach przemysłowych. Dodatkowo ze względu na sposób produkcji, sery rzemieślnicze są narażone na zakażenia drobnoustrojami chorobotwórczymi. Dlatego też postanowiono określić jakość mikrobiologiczną serów wytwarzanych metodami chałupniczymi w okręgu tatrzańskim oraz zidentyfikować drobnoustroje uczestniczące w procesie ich produkcji.

CEL BADAŃ

Celem badań jest określenie stanu mikrobiologicznego serów podpuszczkowych wytwarzanych metodami rzemieślniczymi z mleka niepasteryzowanego takich jak: bundz, bryndza, gołka i oscypek. Wymienione sery poddano także analizie metagenomowej oraz zidentyfikowano dominujące w nich bakterie.

MATERIAŁY I METODY

Sery regionalne

Przedmiotem badań były świeże (1-3 dniowe) sery podpuszczkowe z mleka owczego, krowiego i mieszanego, takie jak: bundz (n=10), bryndza (n=10), gołka wędzona krowia (n=15), gołka mieszana (n=15), gołka owcza (n=10) i oscypek (n=10) wytworzone w okolicach Nowego Targu.

Oznaczenie jakości mikrobiologicznej serów

Liczebność wybranych grup drobnoustrojów w badanych serach oznaczano metodą posiewów ilościowych w sposób zgodny z normami i wyrażano w jtk/g. Kierunki posiewów ilościowych, wykorzystywane w nich pożywki oraz warunki inkubacji podano w tabeli 1.

W posiewach ilościowych jako rozcieńczalnik stosowano zbuforowaną wodę peptonową. Próbkę serów o masie 10 g zawieszano w 90 ml 2% (w/v) cytrynianu trisodowego, a następnie homogenizowano za pomocą wibracyjnego homogenizatora mikrobiologicznego Pulsifier. Obecność bakterii *Listeria* spp., *L. monocytogenes* oraz *Salmonella* spp. potwierdzano metodą enzymoimmunofluorescencyjną (ELFA) z użyciem testów VIDAS® *L. monocytogenes* II (LMO2, BioMerieux), VIDAS® *Listeria* Duo (LDUO, BioMerieux) oraz VIDAS® *Salmonella* (SLM, BioMerieux). Wszystkie oznaczenia wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach.

Analiza metagenomowa

Amplifikacje meta-DNA wyizolowanego z całej puli mikroorganizmów badanych serów prowadzono w próbkach o całkowitej objętości 25 µl zawierających 100 ng genomowego DNA oraz 50 µl mieszaniny reakcyjnej (skład: 1 x PCR mieszanina reakcji, 0,25 µM każdego ze starterów i 5U Taq polimerazy DNA). Produkty reakcji oczyszczono w kolumnach Clean-Up (A&A Biotechnology). Normalizację biblioteki prowadzono stosując zestaw Quant-iT HS ds.-DNA assay (Invitrogen) na fluorymetrze Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific), a reakcję sekwencjonowania instrumentalnie MiSeq Illumina i chemicznie V2 (2x250bp). Otrzymane dane analizowano za pomocą oprogramowania GreenGenes v13_5.

Izolacja i identyfikacja hodowlanych szczepów bakterii fermentacji mlekowej (LAB)

Szczepy LAB izolowano z agarowych podłoży MRS i M17 i namnażano w pożywkach płynnych (30°C, 20h, warunki beztlonowe). Z każdej próbki sera izolowano ok. 20 czystych kultur. Ich genomowe DNA stosowano jako matrycę do reakcji PCR, w której amplifikowano sekwencje 16S rDNA. Amplifikacje prowadzono przy użyciu starterów: S-D-Bact-0008-a-S-20 (krótka nazwa 27F), S-Univ-1492-b-A-21 (krótka nazwa 1492R). Produkty PCR oczyszczano za pomocą zestawu Clean-Up (A&A BIOTECHNOLOGY). Oczyszczone amplikony 16S rDNA wysyłano do pracowni sekwencjonowania (Genomed, Warszawa). Wyniki sekwencjonowania analizowano za pomocą programu VectorNTI (Invitrogen) oraz serwisu BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov).

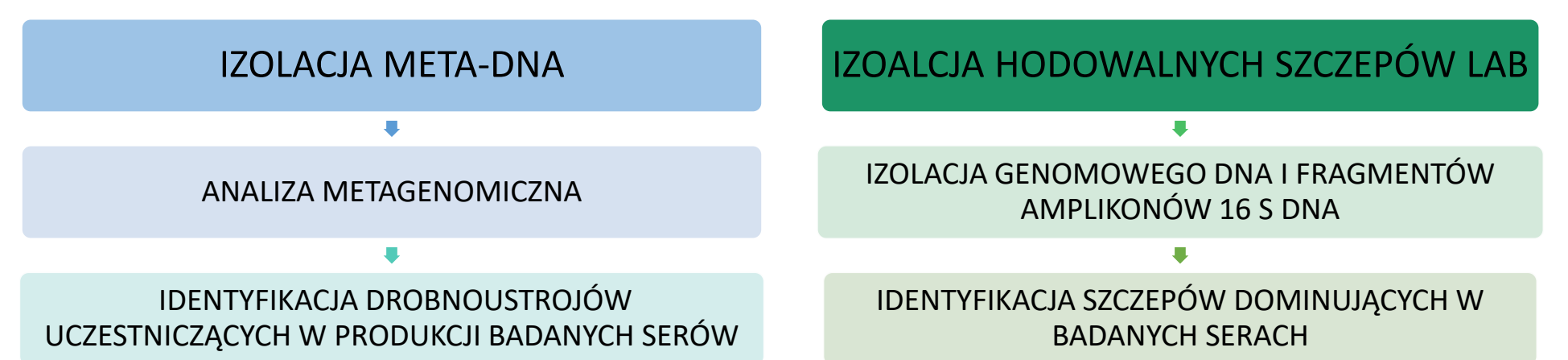


Tabela 1. Oznaczone grupy drobnoustrojów i warunki ich hodowli

Grupa mikroorganizmów	Norma	Pożywki agarowe ^b	Temp. [°C]	Czas [h]	Środowisko
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych (OLDT)	PN-EN ISO 4833-1:2013-12	PCA (Graso)	30	48-72	tlenowe
<i>Enterobacteriaceae</i>	PN-EN ISO 21528-2:2017-08	VRBG (Oxoid)	37	24	tlenowe
<i>E. coli</i>	PN-ISO 16649-2:2004	Chromocult® TBX (Merck)	44	18-24	tlenowe
<i>S. aureus</i>	PN-EN ISO 6888-2:2001/A1:2004	Baird Parker z RPF (Oxoid)	37	24-48	tlenowe
<i>Salmonella</i>	PN-EN ISO 6579-1:2017-04	XLD (Oxoid) BGA (Oxoid) Palcam Agar (Oxoid)	37	24-48	tlenowe
<i>Listeria</i>	PN-EN ISO 11290-1:2017-07	ALOA (Graso) ALOA (Graso) MRS (Graso)	37	24	tlenowe
<i>L. monocytogenes</i>	PN-EN ISO 11290-1:2017-07	MRS (Graso)	37	24	tlenowe
LAB	PN-ISO 15214:2002	M17 (Graso)	30	48-72	beztlenowe ^a
Drożdże	PN-ISO 21527-1:2009	YGC (Graso)	20	72-96	tlenowe

^a wszystkie podłoża do oznaczeń liczebności bakterii w serach suplementowano 50 mg/l natamycyny (Devocid®, Gist-brocades); a warunki beztlonowe (85% N₂, 15%CO₂) wytwarzano za pomocą systemu do hodowli beztlonowych (Anaxomat)

^b PCA: standardowy agar do liczenia drobnoustrojów; VRBG: pożywka z fioletem, czerwienią, solami żółciowymi i glukozą; Chromocult® TBX: agar z tryptonem, żółcią i X-glukuronianem; Baird Parker z RPF: pożywka Baird-Parkera z plazmą krwi króliczej i fibrynogenem; XLD: pożywka z ksylózą, lizyną i deoksycholaniem sodu; BGA: pożywka z zielenią brylantową; Palcam agar: pożywka Palcam wg. van Nettena i wsp.; ALOA: Agosti i Ottaviani *Listeria* Agar; MRS: pożywka MRS; M17: pożywka M17; YGC: podłoże z chloramfenikolem.

Tabela 2. Liczebność (x± SD) wybranych grup mikroorganizmów w badanych serach rzemieślniczych

Grupa mikroorganizmów	Log [jtk/g]					
	Bundz	Bryndza	Gołka krowia	Gołka mieszana	Gołka owcza	Oscypek
Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych	7,10±0,93	9,32±0,81	8,94±1,21	8,89±1,31	8,82±1,28	8,74±1,33
<i>Enterobacteriaceae</i>	2,48±0,70	2,94±0,91	1,61±0,67	1,53±1,56	1,23±0,57	1,31±0,49
<i>E. coli</i>	2,44±0,67	2,83±0,59	1,58±0,61	1,32±0,51	1,22±0,52	1,27±0,38
<i>S. aureus</i>	1,87±0,56	2,31±0,61	<DL	<DL	<DL	<DL
<i>Listeria</i>	1,12±0,72	3,12±0,65	<DL	<DL	<DL	<DL
<i>L. monocytogenes</i>	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
LAB (MRS)	6,61±0,63	8,78±0,68	8,65±0,53	8,86±0,43	8,82±0,22	8,75±0,49
LAB (M17)	7,04±0,67	9,30±0,54	7,46±0,48	7,65±0,59	7,68±0,41	7,72±0,46
Drożdże	3,41±0,26	6,89±0,25	4,76±0,13	4,78±0,39	4,81±0,39	4,67±0,34

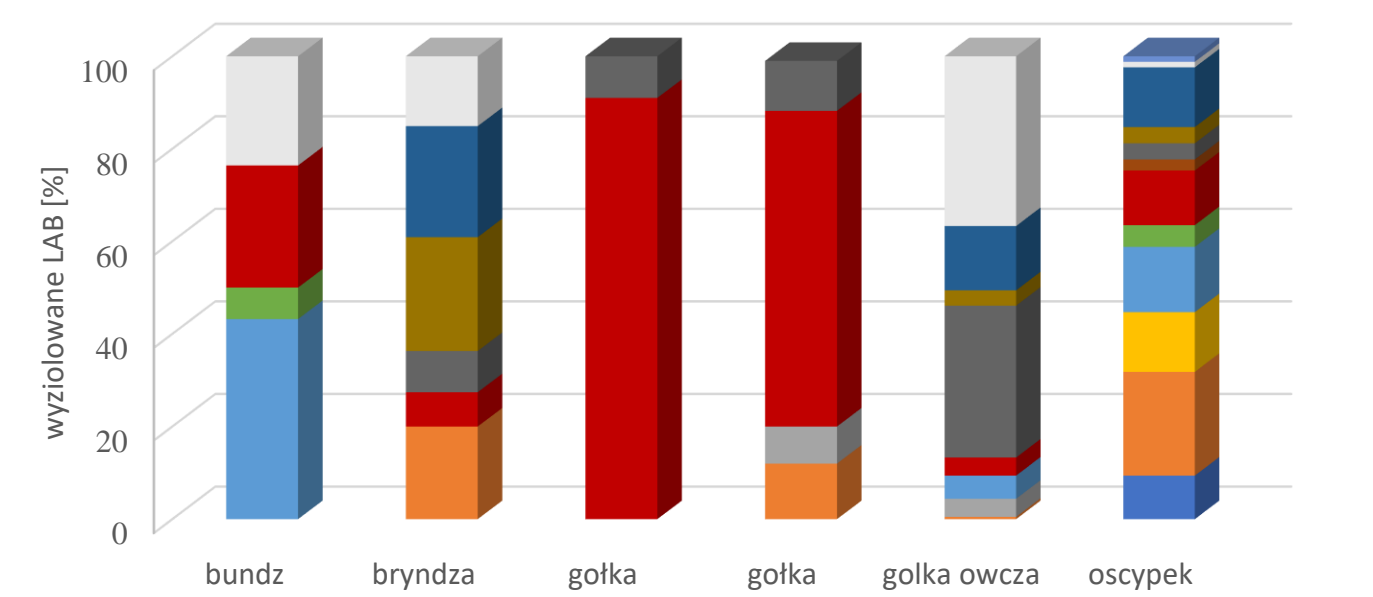
DL: granica wykrywalności – 10 jtk/g; n: liczba badanych próbek
kryteria oceny jakości mikrobiologicznej serów z mleka surowego; jakość zadawalająca: *E. coli* <10⁴ jtk/g, *S. aureus* <10³ jtk/g, *L. monocytogenes* brak w 1g; jakość graniczna: *E. coli* 10⁴-<10⁵ jtk/g, *S. aureus* 10³-<10⁴ jtk/g, *L. monocytogenes* obecna < 10²; jakość niezadawalająca: *E. coli* ≥ 10⁵ jtk/g, *S. aureus* ≥ 10⁴ jtk/g, *L. monocytogenes* ≥ 10² jtk/g

Tabela 3. Rodzaje LAB wykryte w badanych serach

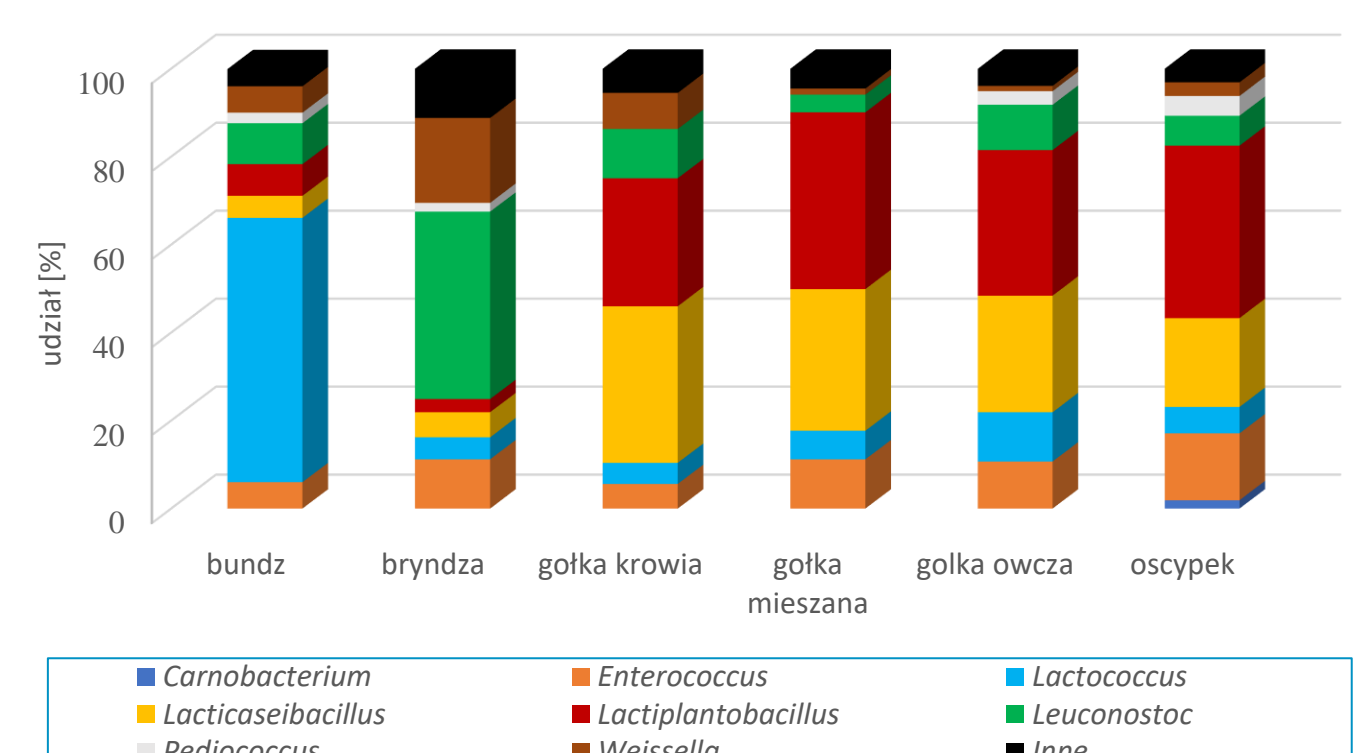
Rodzaj	Liczba próbek pozytywnych					
	Bundz n=10	Bryndza n=10	Gołka krowia n=10	Gołka mieszana n=15	Gołka owcza n=15	Oscypek n=10
<i>Carnobacterium</i>	0	0	0	0	0	3
<i>Enterococcus</i>	2	10	10	10	11	10
<i>Lactococcus</i>	10	10	10	12	13	8
<i>Lactocaseibacillus</i>	5	6	10	15	15	10
<i>Lactiplantibacillus</i>	5	6	10	15	15	10
<i>Leuconostoc</i>	10	10	8	13	15	10
<i>Pediococcus</i>	10	10	0	0	10	10
<i>Weissella</i>	2	10	3	2	1	5

n: liczba badanych próbek

WYNIKI IDENTYFIKACJI LAB WYIZOLOWANYCH Z BADANYCH SERÓW



WYNIKI ANALIZY METAGENOMICZNEJ



WNIOSKI

- Mikrobiota serów wytwarzanych w tym samym regionie przez różnych producentów była zróżnicowana zarówno pod względem składu ilościowego, jak i jakościowego.
- Mimo zaobserwowanych różnic żaden z badanych serów nie budził zastrzeżeń pod względem stanu higieny oraz bezpieczeństwa mikrobiologicznego.
- Najbardziej liczną grupą drobnoustrojów w serach z masy parzonej (gołkach i oscypkach) były bakterie *Lactobacillus*.
- W świeżych serach miękkich (bundz) dominowały natomiast bakterie *Lactococcus*, a w miękkich serach dojrzewających (bryndza), bakterie *Leuconostoc*, *Weissella* i *Enterococcus*.
- Obecność bakterii *Pediococcus* była charakterystyczna jedynie dla serów z mleka owczego.
- Najbardziej złożonym składem mikrobiologicznym cechowały się oscypki. Z produktów tych wyizolowano takie gatunki LAB jak: *L. casei*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *Leu. mesenteroides*, *Leu. citreum*, *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *E. durans*, *E. faecium*, *Lc. Lactis* i *Lc. garvieae*.
- Większość gatunków charakterystycznych dla oscypków występowało także w gołkach owczych. Z pozostałych serów wyizolowano jedynie 2-5 gatunków LAB, wśród których wspólny dla wszystkich serów był gatunek *L. casei*.
- Wyniki analizy metagenomicznej świadczą jednak o tym, że w procesie produkcji badanych serów, zwłaszcza miękkich oraz gołek zawierających mleko krowie, uczestniczy znacznie więcej grup drobnoustrojów od tych, które z nich wyizolowywano.