

ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE ENTEROKOKŮ IZOLOVANÝCH ZE SÝRŮ

Horáčková Šárka, Vrchotová Blanka, Pločková Milada
Ústav mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT Praha

Antibiotic resistance of enterococci of cheese origin

Abstrakt

V práci byl proveden mikrobiologický rozbor devíti sýrů z nepasterovaného, termizovaného a pasterovaného mléka z tržní sítě za použití Kanamycin Esculin Azide agaru na přítomnost zástupců rodu *Enterococcus*. Enterokoky byly zjištěny pouze u sýrů z nepasterovaného mléka v koncentraci $10^3 - 10^7$ KTJ/g. Většina izolátů byla identifikována metodou MALDI-TOF-MS jako *Enterococcus faecalis*. Izoláty nevykazovaly rezistenci vůči vankomycinu. Četnější výskyt rezistence u izolátů i sbírkových kmenů enterokoků byl zjištěn u klindamycinu (MIC > 4 µg/ml) a gentamicinu (MIC > 32 µg/ml). Byl potvrzen možný přenos antibiotické rezistence pro tetracyklin pomocí plasmidu mezi donorovým kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* LMG 21684 a recipientem *E. faecalis* LMG 19456 metodou filter mating.

Klíčová slova: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, minimální inhibiční koncentrace, filter mating

Abstract

In this work, a microbiological analysis of nine cheeses from unpasteurized, thermized and pasteurized milk from the market for the presence of representatives of the genus *Enterococcus* was performed using Kanamycin Esculin Azide agar. *Enterococci* were found only in unpasteurized milk cheeses at a concentration of $10^3 - 10^7$ KTJ/g. Most isolates were identified as *Enterococcus faecalis* by MALDI-TOF-MS method. Isolates did not show resistance to vancomycin. A more frequent

occurrence of resistance in both isolates and collection strains of enterococci was found for clindamycin (MIC > 4 µg/ml) and gentamicin (MIC > 32 µg/ml). The possible transfer of antibiotic resistance to tetracycline using a plasmid between the donor strain *Lactiplantibacillus plantarum* LMG 21684 and the recipient strain *E. faecalis* LMG 19456 was confirmed by the filter mating method.

Key words: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, minimal inhibition concentration, filter mating

Úvod

Rod *Enterococcus* je s více než 50 druhů a poddruhů jedním z hlavních rodů skupiny bakterií mléčného kvašení. Jsou to grampozitivní, kataláza a oxidáza negativní, nesporotvorné koky s homofermentativním metabolismem. Jejich robustní růst, odolnost (většina z nich má schopnost růst při teplotách od 10 do 45 °C, v 6,5 % NaCl, 40 % žluči a pH od 4 do 9,6, navíc mohou přežít zahřívání na 60 °C po dobu 30 min) a variabilní plastický genom způsobují, že se přirozeně vyskytují v různých prostředích, jako je gastrointestinální trakt lidí a zvířat, vyskytují se na rostlinách, ve vodě či v potravinách živočišného původu (Zhong a kol. 2019; Lebreton a kol., 2014).

V zemích jižní Evropy jsou enterokoky často součástí méně definovaných zákysových kultur používaných při výrobě sýrů, kde se uplatňují svojí proteolytickou a lipolytickou aktivitou a rozkladem citrátů na rozvoji senzoryckých vlastností sýrů. V tomto smyslu jsou rovněž považovány za významnou část tzv. nezákysových bakterií mléčného kvašení, které se mohou podílet na zrání sýrů jak z pasterovaného, tak nepasterovaného mléka. Výskyt je dobře dokumentován zvláště u tzv. řemeslných sýrů, kde byla až jedna třetina izolovaných BMK identifikována jako enterokoky, nejčastěji druhy *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, méně často pak *E. saccharominimus* a *E. italicus* (Terzic-Vidojevic a kol., 2021; Ruiz a kol., 2016). Do sýřeniny se mohou dostávat z mléka nebo přímo z prostředí výroby. Kromě podílu na zrání sýrů mají některé enterokoky navíc schopnost produkovat bakteriociny působící proti mikroorganismům způsobujícím kažení nebo mikroorganismům patogenním jako je např.

Listeria monocytogenes (Martínez a kol., 2003). I když jsou některé kmeny enterokoků používány také jako probiotika, panuje stále nejistota ohledně jejich bezpečnosti. Nemají proto v EU status QPS (Qualified Presumption of Safety) a nejsou obecně považovány za bezpečné (GRAS) v USA (Graham a kol., 2020). Důvodem je, že byly také identifikovány jako oportunní patogeny, které mohou způsobit různá lidská onemocnění, jako je bakteriémie, infekce močových cest a endokarditida. Vykazují vysoký stupeň virulence, produkci biogenních aminů a možnost přenosu genů antibiotické rezistence, zejména genů kódujících rezistenci k vankomycinu (Hashem a kol., 2021). V odborné veřejnosti tudíž nepanuje shoda ohledně jejich cíleného použití v potravinářství. Testování každého jednotlivého enterokokového kmene je před jeho potenciálním použitím v potravinářském průmyslu proto nezbytné.

Cílem této studie bylo zjistit výskyt enterokoků v různých typech sýrů z tržní sítě, vybrané izoláty identifikovat a otestovat jejich antibiotickou rezistenci.

Materiál a metody

Odběr vzorků

Odběr vzorků ze sýrů z tržní sítě (Tab. 1) byl proveden vzorkovačem (ČSN EN ISO 707), 10 g sýra bylo zhomogenizováno s 90 ml roztoku citranu sodného dihydrátu (20 g/l, pH 7,5 ± 0,2 po sterilaci) (ČSN EN ISO 6887-5), po příslušném desetinasobném ředění fyziologickým roztokem byly vzorky kultivovány na Kanamycin Esculin Azide agaru (Merck, Darmstadt, Německo) při 37 °C po dobu 48 h, aerobně. Z každého sýra byly odebrány dva vzorky.

Identifikace izolátů a jejich kultivace

Vybrané izoláty byly charakterizovány barvením dle Grama a katalasovým testem. Gram pozitivní, katalasa negativní koky byly dále identifikovány pomocí metody MALDI-TOF-MS na Ústavu biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha. V práci byly pro stanovení antibiotické rezistence rovněž použity kmeny ze sbírky Laktoflora[®], Milcom a.s., Tábor, a to *Enterococcus faecium* CCDM 945, *E. faecium* CCDM 922 a *E. faecium* CCDM 106. Všechny kmeny enterokoků byly kultivovány v BHI bujónu (HiMedia Laboratories, Indie) (2 % obj. inokulum) při 37 °C, 18 h, aerobně.

Kmeny pro metodu filter mating

Pro konjugační přenos byly použity kmeny *Lactiplantibacillus plantarum* LMG 21684 a kmen *E. faecalis* LMG 19456 ze sbírky Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms, Gent, Belgie; kultivace probíhala v BHI bujónu při 37 °C, 18 h, aerobně.

Molekulární typizace enterokoků

Ze všech enterokoků získaných ze sýrů byla izolována genomová DNA dle návodu výrobce (Presto[™] Mini gDNA

Bacteria Kit, Geneaid, Tchajwan) a následně provedena repetitivní PCR za využití primerů (GTG)₅ v reakčním objemu 25 µl (5 µl 5x FIREPol[®], 10 µl (GTG)₅ primer (1:20), 10 µl templátu DNA (20 ng/10 µl)). Podmínky amplifikace byly následující: 94 °C, 5 min; 30 cyklů: denaturace 94 °C, 30 s, nasedání primerů 33 °C, 30 s, syntéza řetězce 72 °C, 2 min a konečná extenze při 72 °C, 10 min.

Elektroforéza produktů (2 µl + 0,5 µl GelPilot[®] DNA Loading Dye (Qiagen, Německo)) byla provedena v 1 % hm. agarosovém gelu (Sigma-Aldrich, USA) s GelRed[®] Nucleic Acid Gel Stain (4 µl) (Biotum, USA) (100 V). Jako marker byl použit GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, ČR). Výsledný Rep-PCR profil byl vizualizován při 312 nm a pomocí programu GelAnalyzer 19.1 a programu Past 4.03 sestaven dendrogram.

Testování antibiotické rezistence

Sbírkové kmeny a vybrané kmeny enterokoků izolované ze sýrů byly testovány na zjištění minimální inhibiční koncentrace (MIC) antibiotik pomocí mikrodilučního testu MIKROLATEST[®] MIC G⁺ (Erba Lachema, ČR).

Filter mating

Možnost konjugačního přenosu antibiotické rezistence byla ověřována metodou filter mating. Podrobný popis metody je uveden v pracích Gevers a kol. (2003) a Zarzecka a kol. (2022). Kultivace donorového kmene (*L. plantarum* LMG 21684) probíhala 6 h, kultivace recipientního kmene (*E. faecalis* LMG 19456) 4 h pro dosažení exponenciální fáze růstu. K filtrování byl použit membránový filtr 0,45 µm, kultivace probíhala na BHI agaru (37 °C, 18 h); následně byly buňky kultivovány na dvojité selektivním médiu – na BHI agaru s přídavkem tetracyklinu (10 µg/ml) a rifampicinu (50 µg/ml) po dobu 48 h.

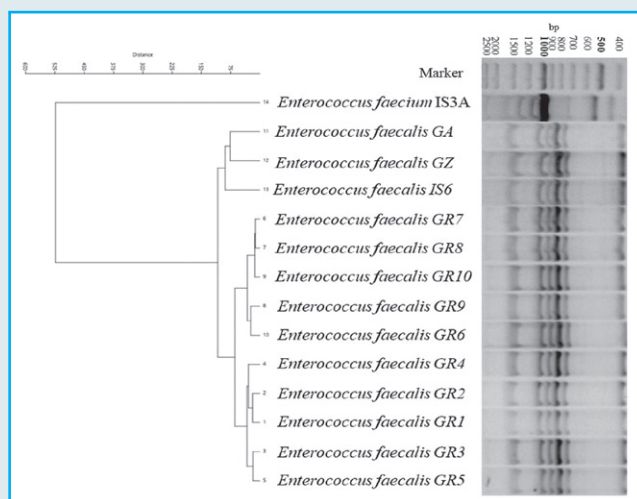
Plasmidová DNA byla vyzolována s využitím komerční soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Německo). Plasmidová DNA byla vizualizována po elektroforéze na 0,7 % hm. agarosovém gelu (60 V), jako marker byl použit Large DNA Ladder (Central European Biosystems, ČR).

Výsledky a diskuse

V první části práce byly provedeny mikrobiální rozbory sýrů z tržní sítě z České republiky i ze zahraničí s cílem získat informace o zastoupení enterokoků. Testovány byly polotvrdé, tvrdé a plíšňové sýry ze syrového, termizovaného a pasterovaného mléka. Výsledky spolu s charakteristikou sýrů jsou uvedeny v Tab. 1. Je patrné, že v sýrech vyrobených z tepelně ošetřeného mléka byl výskyt enterokoků zjištěn zvolenou kultivační metodou minimální, na rozdíl od sýrů vyrobených ze syrového mléka, kde se jejich počet pohyboval od 10³ až 10⁷ KTIJ/g. Obecně mohou ve zralých sýrech počty enterokoků dosahovat 10⁷ KTIJ/g, někteří autoři uvádějí až 10⁸ KTIJ/g

Tab. 1 Charakteristika testovaných sýrů a počet enterokoků (KTJ/g) po kultivaci na Kanamycin Esculin Azide agaru při 37 °C, 48 h, aerobně

Sýr	KTJ/g	Charakteristika sýra
A	10 ⁷	pařený sýr ze syrového ovčího mléka, salašnická výroba; plnotučný
B	10 ³	tvrdý sýr ze syrového kravského mléka, strouhaný, balen v ochranné atmosféře; polotučný
C	10 ⁵	tvrdý sýr ze syrového ovčího mléka, doba zrání 6 měsíců; polotučný
D	10 ³	polotvrdý sýr typu Gouda ze syrového kravského mléka, 18 měsíců zrání; plnotučný
E	10 ⁷	měkký zrající sýr ze syrového kravského mléka s výraznou povrchovou mikroflórou ze směsi bakterií, kvasinek a plísní; plnotučný
F	<10 ¹	extra tvrdý přírodní zrající sýr z termizovaného kravského mléka; polotučný
G	10 ⁶	sýr s plísní uvnitř hmoty sýra ze syrového kravského mléka; vysokotučný
H	10 ³	tvrdý sýr ze syrového kravského mléka; polotučný
I	<10 ¹	pařený, nezrající sýr z pasterovaného kravského mléka; polotučný



Obr. 1 Gel produktů po Rep-PCR s primerem (GTG)₅ pro kmeny enterokoků izolovaných ze sýrů a dendrogram ukazující jejich genetickou příbuznost

(Fuka a kol., 2017). Výskyt enterokoků je v sýrech z nepasterovaného mléka vždy četnější, jak potvrzují i zahraniční studie – při analýze 126 francouzských sýrů obsahovalo enterokoky 92 % sýrů ze syrového mléka a pouze 44 % sýrů z pasterovaného mléka (Jamet a kol., 2012).

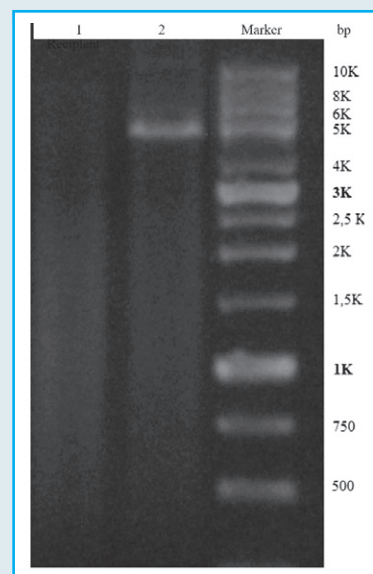
Kolonie, které byly charakterizovány jako grampozitivní, katalasa negativní koky byly metodou MALDI-TOF-MS identifikovány z převážné většiny jako *Enterococcus faecalis*, což je v souladu s literaturou – v rámci evropských sýrů je považován za převažující druh enterokoků (Jamet a kol., 2012). Dalším zjištěným druhem byl pak *E. faecium* z polotvrdého sýra. Gel produktů po Rep-PCR s primerem (GTG)₅ a dendrogram ukazují genetickou příbuznost získaných kmenů (Obr. 1). Na základě dendrogramu i na základě výsledků testování antibiotické rezistence a hodnot minimální inhibiční koncentrace (Tab. 2, všechny výsledky neuvedeny) byl učiněn závěr,

že kmeny *E. faecium* IS3A (izolát ze sýra D), *E. faecalis* GA (sýr B), *E. faecalis* GZ (sýr G) a *E. faecalis* IS6 (sýr D) jsou rozdílné kmeny, oproti tomu izoláty *E. faecalis* GR1 – GR10 vykazovaly identitu.

Antibiotická rezistence sbírkových kmenů a vybraných neidentických kmenů izolovaných ze sýrů byla zjišťována diluční metodou v mikrotitrační desičce. Výsledky spolu s mezními hodnotami, které uvádí EFSA (EFSA, 2012) pro vyhodnocení, zda je kmen rezistentní nebo senzitivní k danému antibiotiku,

jsou uvedeny v Tab. 2. Bylo zjištěno, že mezní hodnoty pro minimální inhibiční koncentraci byly z celkem devíti testovaných kmenů překročeny u pěti kmenů (z toho 4 sbírkové) pro klindamycin, a u třech kmenů pro gentamicin, dva izolované kmeny vykazovaly vyšší MIC pro tetracyklin. Pro testování bezpečnosti těchto kmenů by mělo být ověřeno, zda se jedná o rezistenci vrozenou nebo zda je či není rezistence vůči těmto antibiotikům kódována na plasmidech nebo transpozonech, a nemůže se tedy jednat o rezistenci horizontálně přenositelnou. Výskyt rezistence k antibiotikům je v izolátech z mléčných výrobků různý, vysoká rezistence byla pozorována k erytromycinu a tetracyklinu (Hejazi a kol., 2019; Mrkonjic Fuka a kol., 2017). Pozitivním zjištěním bylo, že žádný z testovaných kmenů nevykazoval vyšší MIC, než je mezní hodnota u vankomycinu pro *E. faecium* (4 µg/ml). Vankomycin je antibiotikum obecně předepisované k léčbě závažných infekcí způsobených organismy, které jsou odolné vůči jiným antibiotikům, jako jsou peniciliny. Vankomycin rezistentní enterokoky (VRE) jsou považovány za závažné původce nozokomiálních infekcí. Jejich výskyt je ale nejčastěji vázán na vzorky z nemocničního prostředí, výskyt VRE v mléčných výrobcích je zcela ojedinělý (Lawpidet a kol., 2021).

V souvislosti se schopností enterokoků předávat nebo přijímat plasmidy horizontálním přenosem s jinými mikroorganismy byl v poslední fázi práce otestován konjugační přenos mezi donorovým kmenem *Lactiplantibacillus plantarum* LMG 21684, který nese gen tet(M)



Obr. 2 Elektroforéza plasmidové DNA recipientního kmene *Enterococcus faecalis* LMG 19456 před přenosem (1) a po přenosu (2-transkonjugant) plasmidu z donorového kmene *Lactiplantibacillus plantarum* LMG 21684 metodou filter mating

Tab. 2 Hodnocení rezistence a senzitivity sbírkových a izolovaných kmenů enterokoků v porovnání s mezními hodnotami minimální inhibiční koncentrace ($\mu\text{g/ml}$) (EFSA, 2012)

Antibiotikum/ Kmen	Mezní hodnota	<i>E. faecium</i> CCDM 945	<i>E. faecium</i> CCDM 922	<i>E. faecium</i> CCDM 106	<i>E. faecalis</i> LMG 19456	<i>E. faecium</i> IS3A	<i>E. faecalis</i> IS6	<i>E. faecalis</i> GA	<i>E. faecalis</i> GZ	<i>E. faecalis</i> GR6
Ampicilin	2	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Erytromycin	4	R	S	S	S	S	S	S	S	S
Gentamicin	32	S	S	S	R	S	S	S	R	R
Chloramfenikol	16	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kanamycin	1024	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Klindamycin	4	R	S	R	R	R	S	S	S	R
Streptomycin	128	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Tetracyklin	4	S	S	S	S	S	R	S	S	R
Vankomycin	4	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S (senzitivní): MIC \leq mezní hodnota; R (rezistentní) MIC > mezní hodnota

kódující rezistenci k tetracyklinu, a bezplazmidovým recipientním kmenem *Enterococcus faecalis* LMG 19456 metodou filter mating. MIC pro tetracyklin u donorového kmene byla zjištěna vyšší než 256 $\mu\text{g/ml}$. Recipientní kmen *E. faecalis* LMG 19456 vykazoval před přenosem MIC 0,19 $\mu\text{g/ml}$, po úspěšném přenosu plasmidu (viz Obr. 2) pak MIC = 32 $\mu\text{g/ml}$. Transkonjugant měl tedy nižší MIC u tetracyklinu než původní donorový kmen, což bylo pozorováno i v jiných studiích. Gevers a kol. (2003) zaznamenali u transkonjuganta 3x nižší MIC než u donorového kmene. Přenos mezi stejnými kmeny, které byly použity v této studii, byl potvrzen i v prostředí *in vivo* (Jacobsen a kol., 2007).

Závěr

Na základě mikrobiologických rozborů sýrů z tržní sítě lze konstatovat, že zástupci rodu *Enterococcus* se vyskytovaly pouze u sýrů z nepasterovaného mléka v koncentraci až 10^7 KTJ/g. Ve vyšších koncentracích byly přítomny v sýrech měkkých a plísňových. S vysokou frekvencí se mezi identifikovanými kmeny vyskytoval druh *Enterococcus faecalis*. Žádný z testovaných kmenů včetně kmenů sbírkových nevykazoval vyšší MIC, než je mezní hodnota určená EFSA pro vankomycin. Z tohoto hlediska byla u většiny kmenů detekována rezistence vůči klindamycinu, která je pro enterokoky přirozená. Byla rovněž potvrzena schopnost enterokoků (kmen LMG 19456) přijímat plasmidovou DNA od donorového kmene *L. plantarum* LMG 21684, a tím získat vyšší antibiotickou rezistenci. Konjugační přenos mezi bakteriemi mléčného kvašení může být v prostředí významný.

Poděkování

Tato práce byla podpořena grantem Národní agentury pro zemědělský výzkum Ministerstva zemědělství ČR, grant č. QL24010251.

Literatura

ČSN EN ISO 6887-5 Mikrobiologie potravin a krmiv – Úprava analytických vzorků, příprava výchozí suspenze a desetinasobných ředění – Část 5: Specifické pokyny pro vzorky mléka a mléčných výrobků.

ČSN EN ISO 707 Mléko a mléčné výrobky – Návod pro odběr vzorků.

FUKA M.M., MAKSIMOVIC A.Z., TANUWIDJAJA I., HULAK N., SCHLOTER M. (2017): Characterization of enterococcal community isolated from an artisan Istrian raw milk cheese: Biotechnological and safety aspects. *Food Technol. Biotechnol.*, 55 (3), s. 368–380.

GEVERS D., HUYS G., SWINGS J. (2003): *In vitro* conjugal transfer of tetracycline resistance from *Lactobacillus* isolates to other Gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.*, 225, s. 125–130.

GRAHAM, K., STACK, H., REA, R. (2020): Safety, beneficial and technological properties of enterococci for use in functional food applications – a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 60, s. 3836–3861.

HASHEM Y.A., ABDELRAHMAN K.A., AZIZ R.K. (2021): Phenotype–genotype correlations and distribution of key virulence factors in *Enterococcus faecalis* isolated from patients with urinary tract infections. *Infect Drug Resist.*, 14, s. 1713–1723.

HEJAZI M.A., GHAFOURI-FARD S., ESLAMI S., AFSHAR D., BARZEGARI A., KHORSHIDIAN N. (2019): Polyphasic characterization of *Enterococcus* strains isolated from traditional Moghan cheese in Iran. *J. Food Safety*, 39, s. 1–9.

JACOBSEN L., WILCKS A., HAMMER K., HUYS G., GEVERS D., ANDERSEN S.R. (2007): Horizontal transfer of tet(M) and erm(B) resistance plasmids from food strains of *Lactobacillus plantarum* to *Enterococcus faecalis* JH2-2 in the gastrointestinal tract of gnotobiotic rats. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 59, s. 158–166.

JAMET E., AKARY E., POISSON M.A., CHAMBA J.F., SERROR P. (2012): Prevalence and characterization of antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* in French cheeses. *Food Microbiol.* 31, s. 191–198.

LAWPIDET P., TENGJAROENKUL B., SAKSANGAWONG C., SUKON P. (2021): Global prevalence of vancomycin-resistant enterococci in food of animal origin: A meta-analysis. *Foodborne Pathog. Dis.*, 18 (6), s. 405–412

LEBRETON F., WILLEMS R. J. L., GILMORE M. S. (2014): *Enterococcus* Diversity, Origins in Nature and Gut Colonization. In: *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Gilmore M. S., Clewell D. B., Ike Y., Shankar N. Eds. Boston. PMID: 24649513. Bookshelf ID NBK 190427.

MARTÍNEZ S., LÓPEZ, M., BERNARDO A. (2003): Thermal inactivation of *Enterococcus faecium*: Effect of growth temperature and physiological state of microbial cells. *Lett. Appl. Microbiol.*, 37, s. 475–481.

MRKONJIC FUKA M., ZGOMBA M.A., TANUWIDJAJA I., HULAK N., SCHLOTER M. (2017): Characterization of enterococcal community isolated from an artisanal Istrian raw milk cheese: Biotechnological and safety aspects. *Food Technol. Biotechnol.*, 55, s. 368–380.

RUIZ, P., PÉREZ-MARTÍN, F., SESEÑA, S., PALOP, M.L. (2016): Seasonal diversity and safety evaluation of enterococci population from goat milk in a farm. *Dairy Sci. Technol.*, 96, s. 359–375.

TERZIĆ-VIDOJEVIĆ A., VELJOVIĆ K., POPOVIĆ N., TOLINAČKI M., GOLIĆ N. (2021): Enterococci from Raw-Milk Cheeses: Current Knowledge on Safety, Technological, and Probiotic Concerns. *Foods*, 10(11):2753.

ZARZECKA U., CHAJECKA-WIERZCHOWSKA W., ZADERNOWSKA A. (2022): Microorganisms from starter and protective cultures – occurrence of antibiotic resistance and conjugal transfer of tet genes *in vitro* and during food fermentation. *LWT – Food Sci. Technol.*, 153, s. 1–9.

ZHONG Z., KWOK L.-Y., HOU Q., SUN Y., LI W., ZHANG L., SUN Z. (2019): Comparative genomic analysis revealed great plasticity and environmental adaptation of the genomes of *Enterococcus faecium*. *BMC Genom.*, 20, 60.

Korespondenční autor: Šárka Horáčková,
VŠCHT, ústav 322, Technická 3, 166 28, Praha 6;
sarka.horackova@vscht.cz

Přijato do tisku: 27. 8. 2024
Lektorováno: 29. 9. 2024

POUŽITÍ LYOFILIZACE PRO DLOUHODOBOU DEPONACI KVASINEK

Ladislav Bár, Andrea Tůmová,
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Tábor

Use of lyophilization for long-term deposition of yeast

Abstrakt

Tato práce ověřuje možnost využití metody lyofilizace pro dlouhodobou deponaci kvasinek. Na šesti modelových kmenech zastupujících hlavní skupiny kvasinkového genofondu Sbírký mlékárenských mikroorganismů *Saccharomyces cerevisiae* CCDM 281, *Kluyveromyces marxianus* CCDM 259, *Debaryomyces hansenii* CCDM 262, *Pichia jadinii* CCDM 1064, *Geotrichum candidum* CCDM 870 a *Kazachstania humilis* CCDM 3305 byla testována míra přežití lyofilizace a následné skladování v chladícím boxu po dobu 12 měsíců. Každý kmen byl zlyofilizován v šesti variantách ochranných médií: OMK1 – 100% boviní sérum, OMK2 – 50% boviní sérum, OMK3 – 25% boviní sérum s 10 % glukózy, OMK4 – 10% RSM s 5 % glutamanu sodného a 5 % trehalózy, OMK5 – 10 % glutaman sodný a 10 % glukóza, OMK6 – 10 % RSM a 10 % glukóza. S ohledem na finanční stránku, konzistenci lyofilizačních disků a celkovou míru přežití po dvanácti měsících skladování se jako nejlépe použitelná zdají být ochranná média na bázi odstředěného mléka (mléko s glutamanem sodným a trehalózou nebo mléko s glukózou). V případě kmenů *Geotrichum candidum* a *Debaryomyces hansenii* naopak není z hlediska dlouhodobé míry přežití použitelná žádná z testovaných ochranných médií.

Klíčová slova: lyofilizace, kvasinky, protektivní média

Abstract

This work verifies the possibility of using the lyophilization method for long-term yeast storage. Lyophilization

and subsequent storage in a cooling box for twelve months were tested on the six model strains representing the main groups of the yeast collection of dairy microorganism *Saccharomyces cerevisiae* CCDM 281, *Kluyveromyces marxianus* CCDM 259, *Debaryomyces hansenii* CCDM 262, *Pichia jadinii* CCDM 1064, *Geotrichum candidum* CCDM 870 and *Kazachstania humilis* CCDM 3305. Each strain was lyophilized using six variants of protective media: OMK1 – 100% bovine serum, OMK2 – 50% bovine serum, OMK3 – 25% bovine serum with 10 % of glucose, OMK4 – 10% RSM with 5 % sodium glutamate and 5 % trehalose, OMK5 – 10% sodium glutamate and 10 % glucose, OMK6 – 10% RSM and 10% glucose. Considering the financial aspect, the consistency of the lyophilization discs and the overall survival after twelve months of storage, skimmed milk-based protective media (milk with monosodium glutamate and trehalose or milk with glucose) seem to be the best to use. In the case of *Geotrichum candidum* and *Debaryomyces hansenii* strains, on the other hand, none of the tested protective media is usable in terms of long-term survival.

Key words: lyophilization, yeast, lyoprotective media

Úvod

Pro potřeby sbírek mikroorganismů je pro deponované kmeny důležité volit takové způsoby úchovy, které, kromě životaschopnosti kultury, zachovávají v co nejvyšší možné míře zároveň morfoloogické, genetické a klíčové funkční vlastnosti. Kvasinky je obecně možné, až po dobu jednoho roku, uchovávat na živných agarových médiích. S každoročním pasážováním je však spojena jistá časová náročnost, zvýšené riziko vzniku genetických mutací a kontaminace. Metoda uchování pomocí lyofilizace, která má potenciál udržet kvasinkové kmeny životné po řadu let, tyto nevýhody ve velké míře eliminuje a kultury jsou navíc snadno distribuovatelné (Smith a kol., 1983). Míra přežití závisí na mnoha faktorech, na odolnosti jednotlivých kmenů, jejich výchozí koncentraci, na podmínkách kultivace a lyoprotektivním médiu (Carvalho a kol., 2002).

Jako lyoprotektivní média lze v případě kmenů kvasinek použít látky na bázi odstředěného mléka, boviního séra, sacharidů a aminokyselin. Lyoprotektanty poskytují ochranu před namáháním, které vzniká při sušení ve vakuu, zatímco kryoprotektivní látky chrání proteiny před poškozením během zmrazování. Účinek lyoprotektivního média je obecně možné zvýšit pomocí kombinovaného účinku jednotlivých složek, kdy lze najednou využít více ochranných mechanismů (Guowei a kol., 2019). Odstředěné mléko je samo o sobě komplexní ochranné médium složené z laktózy (52 %), bílkovin (38 %) a stopových prvků. Často tak může mít lepší protektivní účinek než jiné samostatně působící látky (Karam a kol., 2017). Použití odstředěného mléka spolu s trehalózou, medem a glutamanem sodným zvyšuje lyofilizační míru přežití kmene *Saccharomyces cerevisiae* (Berny a kol., 1991),