

**ENTEROCOCCI AND THEIR ABILITY LIVE OUT ACTIVITY OF SANITATION DETERGENTS***Monika Lavová, Viera Ducková, Margita Čanigová, Miroslav Kročko***ABSTRACT**

We evaluated the effect of temperature decrease of sanitation solutions (35 °C) in condition of organic load (1% reconstituted powdered milk) and varying hardness of the water used for solution preparation (0 °, 15 °, 30 ° and 45 °) on the ability to randomly selected strains of enterococci survive exposure to acidic and alkaline sanitation solution (0.5% concentration, contact time 15 minutes) in model experiments. Increasing water hardness also increases the number surviving enterococci. Presence of organic loads and lower temperatures decreased the sanitation effect of the test solutions. The tested strains showed different tolerances to applied sanitation solutions. We found a weaker powerful of acid sanitation solution on base phosphoric acid after its application.

**Keywords:** *Enterococcus, contamination, resistance, sanitation detergent, primary production of milk*

---

**ÚVOD**

Zlé hygienické podmienky praxe pri výrobe mlieka môžu mať za následok nebezpečné výrobky. Prítomnosť mikroorganizmov, ako sú pôvodcovia zoonóz v mlieku, by mohla predstavovať riziko pre verejné zdravie (Vilar et al., 2011). Mnohokrát bolo zistené, že mlieko je zdrojom chorôb, ktoré sú prenášané potravinami, hoci bolo pasterizované (Gran et al., 2002).

Vzhľadom na svoje zloženie a vlastnosti je mlieko ideálnym substrátom pre široké spektrum mikroorganizmov. Sekundárna kontaminácia mlieka, ktorá nastáva po jeho vydojení z vemena, môže mať rôzne zdroje - fekálie, podstielku, krmivo, prach, ale aj nedostatočne sanitované stroje a zariadenia, s ktorými mlieko prichádza do kontaktu (Laktičová et al., 2006), voda, ruky a odev dojičov (Fabianová et al., 2010). Použitie účinných čistiacich a dezinfekčných prostriedkov voči mikroorganizmom minimalizuje kontamináciu produktu, zvyšuje trvanlivosť a znižuje riziko alimentárnych ochorení (Wirtanen a Salo, 2003). Efektívna sanitácia sa skladá zo sérií oplachovaní, umývaní, aplikácie sanitačných prostriedkov s účinnou koncentráciou pri vhodných teplotách a záverečnej fázy sušenia (Wirtanen et al., 2002).

Účinnosť sanitácie v mliekarenskom podniku môže byť negatívne ovplyvnená okrem iného aj prítomnosťou enterokokov, keďže jednou z ich charakteristických schopností je ich schopnosť tvoriť biofilm (Tendolkar et al., 2004). Enterokoky sú časť dominantnej mikroflóry niektorých mliečnych produktov (Manu et al., 2003). Svojou proteolytickou, peptidolytickou, lipolytickou, esterázovou, oksylujúcou aktivitou a citrátovým a pyruvátovým metabolizmom sa podieľajú na tvorbe charakteristických chuťových zložiek týchto potravín (Foulquié Moreno et al., 2006). Sú to mikroorganizmy, ktoré prirodzene kontaminujú mlieko po jeho schladení a dokážu prežiť aj záchrev (Giraffa, 2003). Používajú sa ako indikátory fekálnej kontaminácie (Jurkovič et al., 2007) a ako indikátory hygieny výrobných liniek mliečnych výrobkov, pretože dokážu prežiť nepriaznivé podmienky prostredia (O'Briena et al., 2004). Do surového mlieka sa môžu dostať z viacerých zdrojov

primárnej alebo sekundárnej kontaminácie. Pravidelne sa nachádzajú v dojacích strojoch alebo na inom náradí a zariadení (Fabianová et al., 2010). Enterokoky sú považované za závažné nozokomiálne patogény spôsobujúce bakterémiu, endokarditídy, infekcie močových ciest (Hadji-Sfaxi et al., 2011), krvného obehu, brucha, žlčových ciest a popálenín (Domig et al., 2003) a majú schopnosť produkovať biogénne amíny (Foulquié Moreno et al., 2006). To kladie vysoké nároky na proces sanitácie technologických zariadení ako v prvovýrobe, tak aj pri jeho mliekarenskom ošetrovaní a spracovaní (Krebs-Artimová et al., 2010).

Cieľom práce bolo v modelových pokusoch otestovať účinnosť alkalického a kyslého sanitačného prostriedku bežne používaných v prvovýrobe za rôznych podmienok na prežívanie náhodne vybraných kmeňov enterokokov. Tieto boli izolované z oplachových vôd po sanitácii dojacích zariadení vo vybraných poľnohospodárskych podnikoch. Sledoval sa vplyv rôznej tvrdosti vody pri zníženej teplote sanitačných roztokov a v prítomnosti organickej záťaže na uvedenú skupinu mikroorganizmov

**MATERIÁL A METÓDY***Príprava bakteriálnej suspenzie*

Pre modelové pokusy sa použilo 8 náhodne vybraných identifikovaných kmeňov enterokokov, ktoré sa izolovali z posledného oplachu dojacieho okruhu po sanitácii v dvoch vybraných poľnohospodárskych podnikoch. Z 24 hodinových bakteriálnych kultúr vyrastených na glukózo-tryptónovom agare (HiMedia Laboratories, India) pri

37 ± 1 °C sa vo fyziologickom roztoku pripravila suspenzia zodpovedajúca 0,5° McFarlandovej zákalovej stupnice. Intenzita zákalu sa hodnotila prístrojom Densi-la-meter. Mikrobiálna suspenzia sa následne zriedila a získala sa pracovná suspenzia baktérií obsahujúca rádovo 10<sup>6</sup> KTJ.ml<sup>-1</sup>, ktorá sa použila pre modelové pokusy. Presný počet enterokokov sa stanovil zriedňovacou kultivačnou metódou na žlč-eskulín azidovom agare (Biokar Diagnostic, Francúzsko) pri 37 ± 1 °C po 24 hodinách (BioMérieux, Francúzsko).

Príprava sanitačných roztokov

Sanitačné roztoky sa pripravovali rozpustením prostriedkov v destilovanej vode (tvrdosť vody 0°) a v destilovanej vode, do ktorej sa pridalo 15 mg, 30 mg a 45 mg CaCO<sub>3</sub> na 100 ml vody (tvrdosť vody 15°, 30° a 45°). Testovali sa sanitačné roztoky s koncentráciou 0,75 % pri teplote 35 °C a dobou pôsobenia 15 minút.

Testovanie účinnosti roztokov

K čerstvo pripraveným a vytemperovaným sanitačným roztokom pripraveným z vody s rôznou tvrdosťou a s organickou záťažou (1 % obnoveného sušeného mlieka) sa pridala pripravená pracovná suspenzia enterokokov. Po premiešaní sa nechali skúmavky vo vodnom kúpeli pri príslušnej teplote stanovenú dobu 15 minút, následne sa vyočkovali na Petriho misky a zaliali žlč-eskulín azidovým agarom (*Biokar Diagnostic*, Francúzsko). Kultivácia prebiehala pri 37 ± 1 °C po dobu 24 hodín.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Súčasťou alkalického sanitačného prostriedku bol chlórnan sodný. Mechanizmus antimikrobiálneho účinku organických i anorganických zlúčenín s aktívnym chlórrom je založený na chemickej reakcii s biomolekulami, a to na chlorácii peptidickej väzby bielkovín alebo na oxidácii enzýmov. Účinok na bunkové a nebunkové mikroorganizmy je nezvratný, na tieto prípravky nevzniká rezistencia a k usmrteniu mikroorganizmov dochádza v priebehu niekoľkých minút. Tým možno vysvetliť vyššiu účinnosť alkalického sanitačného prostriedku v porovnaní s kyslým prostriedkom, ktorý bol na báze kyseliny fosforečnej, ktorá spôsobuje deštrukciu biomolekúl v dôsledku vysokej koncentrácie H<sup>+</sup> iónov (Volná, 1999).

Percentá enterokokov prežívajúcich pôsobenie alkalického sanitačného roztoku sú uvedené v tabuľke 1 a kyslého sanitačného roztoku v tabuľke 2. Z tabuliek vyplýva, že jednotlivé kmene enterokokov prejavili rôznu toleranciu k sanitačným roztokom. Prežívanie enterokokov podporila rastúca tvrdosť vody. Nedodržanie niektorého z faktorov sanitácie podporuje vo všeobecnosti prežívanie mikroorganizmov. K týmto faktorom možno zaradiť nedodržanie odporúčanej teploty sanitačného roztoku. **Salo et al. (2006)** uvádzajú, že zhoršenie úrovne čistenia v mliekarniach súvisí zväčša s poklesom teploty čistiacej vody pod 50 °C a podobne aj **Feldmann et al. (2006)** zaznamenali, že pokles teploty oplachovej vody pod 42 °C viedol k zvýšeniu kontaminácie dojacieho zariadenia koliformnými baktériami a rodom *Pseudomonas* spp. Okrem spomínaného nedodržania teploty sanitačného roztoku, ďalšími rizikovými faktormi, ako to vidieť i z našich výsledkov, je prítomnosť organickej záťaže v sanitovanom prostredí a používanie tvrdej vody na prípravu sanitačných roztokov. **Fabianová et al. (2011)** testovali účinnosť vybraných kmeňov enterokokov voči sanitačným roztokom. Zistili, že roztoky boli účinné aj pri 40 °C a 30 °C a v prostredí organickej a anorganickej záťaže. Výnimku však predstavoval kmeň *Enterococcus faecalis* 53, ktorý prežil podmienky sanitácie. **Čanigová et al. (2004)** vo svojom výskume zistili, že znižovanie teploty sanitačných roztokov na 40 °C vedie k znižovaniu mikrobiálneho účinku kyslých prostriedkov. Účinok kyslých a zásaditých roztokov sa pri tejto teplote znižuje so zvyšujúcou sa koncentráciou organickej záťaže.

Tab. 1 Počet enterokokov, ktoré preživali pôsobenie alkalického sanitačného roztoku (koncentrácia 0,75 %, doba pôsobenia 15 minút, teplota 35 °C), v prítomnosti organickej záťaže (1 % mlieka) a rôznej tvrdosti vody, vyjadrený v %

Kmene enterokokov	Tvrdosť vody / Prežívanie mikroorganizmov [%]			
	0°	15°	30°	45°
<i>Enterococcus faecalis</i> A	62,22	80,89	100	100
<i>Enterococcus faecalis</i> B	1,78	14,54	22,00	100
<i>Enterococcus mundii</i>	1,00	7,023	18,53	35,00
<i>Enterococcus faecium</i> A	3,52	28,31	28,70	37,01
<i>Enterococcus faecium</i> B	7,71	20,86	37,43	40,29
<i>Enterococcus faecalis</i> C	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> D	66,35	100	100	100
<i>Enterococcus faecalis</i> E	22,85	23,49	44,61	52,37

Tab. 2 Počet enterokokov, ktoré preživali pôsobenie kyslého sanitačného roztoku (koncentrácia 0,75 %, doba pôsobenia 15 minút, teplota 35 °C), v prítomnosti organickej záťaže (1 % mlieka) a rôznej tvrdosti vody, vyjadrený v %

Kmene enterokokov	Tvrdosť vody / Prežívanie mikroorganizmov [%]			
	0°	15°	30°	45°
<i>Enterococcus faecalis</i> A	97,78	100	100	100
<i>Enterococcus faecalis</i> B	1,35	46,60	68,00	88,00
<i>Enterococcus mundii</i>	26,18	30,88	31,47	46,77
<i>Enterococcus faecium</i> A	28,31	98,74	80,52	80,52
<i>Enterococcus faecium</i> B	42,29	44,29	52,29	75,14
<i>Enterococcus faecalis</i> C	3,22	52,36	53,64	100
<i>Enterococcus faecalis</i> D	100	100	100	100
<i>Enterococcus faecalis</i> E	35,78	64,64	64,66	75,43

Vplyv týchto faktorov na účinnosť 6 rôznych dezinfekčných prostriedkov potvrdili v rámci laboratórných pokusov aj **Wirtanen et al. (1997)**. Vyššia

koncentrácia organickej záťaže redukovala účinok väčšiny testovaných dezinfekčných prostriedkov, ale v rôznom stupni. Medzi testovanými mikroorganizmami bol i *Enterococcus faecium*, ktorý bol z daných mikroorganizmov najcitlivejší. Naopak relatívne nízky vplyv organického materiálu na aktivitu dezinfekčného prostriedku Umonium 38 na testované baktérie (vrátane *Enterococcus hirae*) uvádzajú Raffo et al. (2007).

## ZÁVER

Na základe výsledkov modelových pokusov môžeme konštatovať, že účinnosť kyslého sanitačného roztoku na báze kyseliny fosforečnej bola v porovnaní s alkalickým sanitačným roztokom na báze chlóru nižšia. Tiež možno konštatovať, že nedodržanie odporúčanej teploty roztokov pri sanitácii, prítomnosť organickej záťaže a rovnako aj tvrdosť používanej vody sú faktory, ktoré znižujú účinnosť sanitačných roztokov a umožňujú v rôznej intenzite prežívanie enterokokov.

## LITERATÚRA

ČANIGOVÁ, M., HEGEDŮSOVÁ, A., DUCKOVÁ, V. 2004. Testing the effect of sanitary detergents on psychrophilic bacteria isolated from milk. In *Hungarian Veterinary Journal*, vol. 126, 2004, no. 12, p. 761-764.

DOMIG, K. J., MAYER, H. K., KNEIFEL, W. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 1. Media for isolation and enumeration. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, 2003, no. 2-3, p. 147-164.

FABIANOVÁ, J., DUCKOVÁ, V., ČANIGOVÁ, M., KROČKO, M. 2010. Presence of *Enterococci* in cow milk and their antibiotic resistance. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 2, p. 17-21.

FABIANOVÁ, J., DUCKOVÁ, V., ČANIGOVÁ, M., KROČKO, M., GÁBOR, M. 2011. In vitro testing of sanitary solutions effect for the enterococci survival. In *Potravinárstvo*, vol. 5, special issue, 2010, p. 123-128.

FOULQUIÉ MORENO, M. R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E., DE VUYST, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 106, 2006, no. 1, p. 1-24.

FELDMANN, M., ZIMMERMANN, A., HOEDEMAEKER, M. 2006. Influence of milking technique, milking hygiene and environment on microbial contamination of milking machine. In *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, vol. 113, 2006, no. 7, p. 274-281.

GIRAFFA, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, 2003, p. 215-222.

GRAN, H. N., MUTUKUMIRA, A. N., WETLESEN, A., NARVHUS, J. N. 2002. Smallholder dairy processing in Zimbabwe: hygienic practices during milking and the microbiological quality of the milk at the farm and on delivery. In *Food Control*, vol. 13, 2002, no. 1, p. 41-47.

HADJI-SFAXI, I., EL-GHAISH, S., AHMADOVA, A., BATDORJ, B., LE BLAY-LALIBERTÉ, G., BARBIER, G., HAERTLÉ, T., CHOBERT, J.M. 2011. Antimicrobial activity and safety of use of *Enterococcus faecium* PC4.1 isolated from Mongol yogurt. In *Food Control*, vol. 22, 2011, no. 12, p. 2020-2027.

JURKOVIČ, D., KRIŽKOVÁ, L., SOJKA, M., TAKÁČOVÁ, M., DUŠINSKÝ, R., KRAJČOVIČ, J., VANDAMME, P., VANCANNEYT, M. 2007. Genetic diversity of *Enterococcus faecium* isolated from Bryndza cheese. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 116, 2007, no. 1, p. 82-87.

KREBS-ARTIMOVÁ, A., KROČKO, M., DUCKOVÁ, V., ČANIGOVÁ, M. 2010. Testovanie účinnosti sanitačných prostriedkov na enterokoky. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 1, p. 35-38.

LAKTIČOVÁ, K., ONDRAŠOVIČ, M., ONDRAŠOVIČOVÁ, O., SASÁKOVÁ, N., VARGOVÁ, M., ŠMIRJÁKOVÁ, S., JURÍŠ, P. 2006. Čistenie a dezinfekcia v potravinárskom priemysle. In *Slovenský veterinársky časopis*, 2006, no. 3, p. 150-152.

MANNU, L., PABA, A., DAGA, E., COMUNIAN, R., ZANETTI, S., DUPRÉ, L., SECHI, L.A. 2003. Comparison of the incidence of virulence determinants and antibiotic resistance between *Enterococcus faecium* strains of dairy, animal and clinical origin. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, 2003, no. 2-3, p. 291-304.

O'BRIENA, S. S., LINDSAY, D., VON HOLY, A. 2004. The presence of *Enterococcus*, coliforms and *E. coli* in a commercial yeast manufacturing process. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94, 2004, no. 1, p. 23-31.

RAFFO, P., SALLIEZ, A. C., COLLIGNON, C. 2007. Antimicrobial activity of formulation for the low temperature disinfection of critical and semi-critical medical equipment and surface. In *New Microbiologica*, vol. 30, 2007, no. 4, p. 274-281.

SALO, S., EHAVALD, H., RAASKA, L., VOKK, R., WIRTANEN, G. 2006. Microbial surveys in Estonian dairies. In *LWT - Food Science and Technology*, vol. 39, 2006, p. 460-471.

TENDOLKAR, P. M., BAGHDAYEAN, A. S., GILMORE, M. S., SHANKAR, N. 2004. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. In *Infection Immunology*, vol. 72, 2004, no. 10, p. 6032-6039.

VOLNÁ, F. 1999. *Dezinfekcia a sterilizácia - teória a prax*. 1. vyd. Žilina: Vrana, s.r.o., 1999, 188 p.

VILAR, M. J., RODRÍGUEZ-OTERO, J. L., SANJUÁN, J. L., DIÉGUEZ, F. J., VARELA, M., YUS, E. 2011. Implementation of HACCP to control the influence of milking equipment and cooling tank on the milk quality. In *Trends in Food Science & Technology*, 2011, In press.

WIRTANEN, G., SALO, S., MANKONEN, J. 1997. *Nordfood. Sanitation in dairies. Espoo Technical Research Center of Finland*, VTT Publications 302, 1997, 47 p.

WIRTANEN, G., SALO, S. 2003. Disinfection in food processing – efficacy testing of disinfectants. In *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology*, 2003 p. 293-306.

WIRTANEN, G., LANGSRUD, S., SALO, S., OLOFSON, U., ALNÅS, H., NEUMAN, M., HOMLEID, J. P., MATTILA-SANDHOLM, T. 2002. *Evaluation of sanitation procedures for use in dairies*. VTT Publications 481, 2002, 96 p.

## Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA no. 1/0410/09

## Contact address:

Ing. Monika Lavová, Department for Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: monika.lavova@gmail.com

Ing. Viera Ducková, PhD., Department for Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: viera.duckova@uniag.sk

doc. Margita Čanigová, CSc., Department for Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: margita.canigova@uniag.sk

Ing. Miroslav Kročko, PhD., Department for Evaluation and Processing of Animal Products, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University in Nitra, Tr. A. Hlinku 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: mirokrocko@yahoo.com