

ENTEROCOCCI AND THEIR ABILITY TO FORM A BIOFILM

Margita Čanigová, Viera Ducková, Miroslav Kročko, Jana Račková, Jana Bezeková

ABSTRACT

Number of enterococci determined in raw milk cistern samples was in range of 2.95 to 4.18 log CFU.ml⁻¹ and raw milk samples obtained from storage tanks contained enterococci count in the range of 3.04 to 4.51 log CFU.ml⁻¹. Results of microbiological quality evaluation showed, that count of enterococci increased during cold storage of raw milk. Portion of enterococci from the total microflora of raw milk taken from cistern samples was 0.44 %, otherwise in raw milk samples taken from storage tanks portion of enterococci decreased to 0.38 %. Among enterococci isolates *E. faecalis* was the predominant species in tested samples of raw milk from both cistern – 58.1 % and storage tank – 71.7 %. The following species were identified *E. faecium*, *E. group III.*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus*. It was found that 38 % *E. faecalis* isolates were able to form a biofilm.

Keywords: enterococci, identification, biofilm

ÚVOD

Enterokoky sa prirodzene vyskytujú v potravinách živočíšneho i rastlinného pôvodu. Vysoký obsah enterokokov v mlieku a mliečnych výrobkoch v súčasnosti indikuje predovšetkým nedodržanie hygienických podmienok buď pri získavaní mlieka alebo pri výrobe mliečnych výrobkov. Enterokokom sa pripisujú mnohé pozitívne vlastnosti, ktoré ich radia medzi užitočnú mikroflóru. Tvoria významnú časť mikroflóry používanej pri výrobe niektorých druhov syrov, uplatňujú sa predovšetkým na tvorbe arómy pri ich zrení (Foulquie Moreno et al., 2006; Tuncer, 2009; Serio et al., 2010). Ducková et al. (2009) uvádzajú napr. v bryndzi priemerné počty enterokokov 6,12 log KTJ.g⁻¹. Enterokoky patria tiež medzi uznávané probiotické mikroorganizmy schopné produkovať bakteriocíny. Nes et al. (2007) zisťovali produkciu bakteriocínov enterokokmi, pričom u druhov *E. faecalis*, *E. faecium* a *E. mundtii* dokázali produkciu viacerých bakteriocínov. Na druhej strane sú enterokoky fakultatívne patogénnymi mikroorganizmami (Biendo et al., 2010) a sú tiež schopné produkovať biogénne amíny (Standarová et al., 2009). V posledných rokoch sa sleduje aj ich rezistencia na antibiotiká a schopnosť tvoriť biofilm (Tendolkar et al., 2004; Cítak et al., 2006).

Rozšírenie a stupeň tvorby biofilmu enterokokmi je rôzny. Mohamed et al. (2004) vo svojej štúdiu zistili tvorbu biofilmu u 93 % klinických a fekálnych izolátov enterokokov. Metzger (2008) sledoval schopnosť tvorby biofilmu u enterokokov pochádzajúcich z maštalného prostredia. Celkovo odobral 177 izolátov, pričom schopnosť tvorby biofilmu sa sledovala u druhov *E. faecium*, *E. casseliflavus* a u *E. faecalis*. Všetky tieto druhy vykazovali schopnosť tvorby biofilmu. Produkcia biofilmu bola odlišná medzi jednotlivými druhmi enterokokov, ale bola podobná v závislosti od ich pôvodu. *E. faecalis* tvoril biofilm vo väčšej miere ako *E. faecium* alebo *E. casseliflavus*. Tieto výsledky korešpondujú aj s výsledkami iných autorov (Tendolkar et al., 2004; Di Rosa et al., 2006), ktorí tvorbu biofilmu druhom

E. faecalis porovnávali s inými druhmi enterokokov. Necedová et al. (2009) izolovali enterokoky z bazénových a cisternových vzoriek mlieka, zo sterov odobratých na farme a mliekarni a tiež z finálnych mliečnych výrobkov. Z odobratých izolátov *E. faecalis* bolo 85 kmeňov (28 %) pozitívnych – tvoriacich biofilm a 218 (72 %) kmeňov bolo negatívnych – netvoriacich biofilm. Z celkového počtu izolátov *E. faecium* bolo 7 (33 %) kmeňov pozitívnych a 14 (67 %) kmeňov negatívnych na tvorbu biofilmu.

Z pohľadu rozšírenia biofilm-tvoriacich enterokokov možno na základe ich výsledkov konštatovať, že najviac boli enterokoky tvoriace biofilm rozšírené na farmách a pochádzali predovšetkým z bazénových a cisternových vzoriek mlieka. Poznatkov o tvorbe biofilmov enterokokmi izolovanými z prostredia mliekarenských závodov je pomerne málo. Väčšina štúdií tvorby biofilmov bola doposiaľ zameraná na klinické izoláty enterokokov.

Cieľom našej štúdie bolo zistiť prítomnosť enterokokov v cisternových vzorkách mlieka a vo vzorkách mlieka zo zásobných tankov. Získané izoláty enterokokov identifikovať a zistiť u náhodne vybraných izolátov schopnosť produkovať biofilm.

MATERIÁL A METÓDY

Počet enterokokov (CPE) sa stanovoval vo vzorkách mlieka (n = 50). Enterokoky sa stanovili pri teplote 37 ± 1 °C na živnom médiu Slanetz-Bartley (HiMedia, India) po dobu kultivácie 48 ± 2 hod (STN 56 0100, 1970).

Suspektné kolónie enterokokov izolované zo vzoriek mlieka sa preočkovali čiarovaním na selektívne médium so žľou a eskulínom (BEA agar) (HiMedia, India) a inkubovali sa pri teplote 37 ± 1 °C po dobu 24 ± 2 hod. Po potvrdení izolátov k rodu *Enterococcus* na základe morfológických znakov (makroskopické a mikroskopické) a biochemických skúšok (produkcia katalázy a PYRA test) sa vykonala druhová identifikácia komerčným EN-COCCUS testom (Pliva-Lachema, Česká republika).

Na simuláciu tvorby biofilmov u náhodne vybraných kmeňov enterokokov sa použila metóda, ktorú modifikovala **Koreňová et al. (2008)**. Enterokoky sa naočkovali do tryptón-sójového bujónu (TSB), živného bujónu (ŽB) a MRS bujónu (keďže jedným zo základných faktorov pre tvorbu biofilmu je substrát) a inkubovali sa pri teplote 37 ± 1 °C po dobu 20 – 24 hod. Táto kultúra (NK) sa odstredila pri 4000 ot.min⁻¹ počas 20 min. Supernatant sa zliat a bunky v skúmavke sa doplnili čerstvým bujónom v množstve 1 – 3 ml tak, aby optická densita dosiahla hodnotu 0,4 – 0,5 (čo zodpovedá asi 10⁸ KTJ.ml⁻¹). Z taktó získanej kultúry (ČK) sa naočkovalo 100 µl do mikrotitračnej doštičky. Kultúra sa zabezpečila proti odpareniu a kultivovala pri teplote 37 ± 1 °C počas 18 – 20 hod. Po kultivácii sa zmerala optická densita pri vlnovej dĺžke 630 nm. Na kvantifikáciu tvorby biofilmu sa použila metóda farbenia s kryštálovou violetou modifikovaná podľa **Koreňovej et al. (2008)**.

Princípom tejto metódy je zafarbenie buniek po premytí na tuhom povrchu kryštálovou violetou. Sledované druhy enterokokov sú schopné tvorby biofilmu, ak optická densita zostávajúcích buniek dosiahne po odčítaní hodnoty

VÝSLEDKY A DISKUSIA

O priemerných počtoch enterokokov v mlieku z cisternových vzoriek a zo zásobných tankov informuje tabuľka 1.

Počty enterokokov počas uskladnenia mlieka pred jeho základným ošetrením stúpli ($P > 0,05$), avšak ich podiel na

celkovej mikroflóre klesol z pôvodných 0,44 % na 0,38 % v dôsledku zvýšeného nárastu počtov psychrotrofných mikroorganizmov na celkovej mikroflóre.

K vysvetleniu týchto zmien by mohlo prispieť zistenie **Panfilí et al. (2008)**. Z výsledkov týchto autorov vyplýva, že počty enterokokov v mlieku počas skladovania pri teplote do 10 °C sú pomerne konštantné.

Z pôvodne vytypovaných 182 kolónii vyrastených na Slanetz-Bartley agare vyrástlo po preočkovaní čiarovaním na BEA agare a vytvorilo typické kolónie len 96 izolátov, čo predstavuje 52,7 %. Toto zistenie len potvrdzuje závery iných autorov, že médium Slanetz-Bartley umožňuje okrem enterokokov sledovaných v mlieku a mliečnych výrobkoch rast aj iným rodom príbuzných mikroorganizmov (**Weiss et al., 2005; Kročko et al., 2007**).

Ako vyplýva z tabuľky 2, najčastejšie izolovaným druhom enterokokov z mlieka bol druh *E. faecalis*. Tento druh enterokoka sa podľa viacerých autorov (**Teixeira et al., 2007; Gomes et al., 2008; Necidová et al., 2009; Trivedi et al., 2011**) najčastejšie izoluje z mlieka a mliekarenských zariadení.

Tvorba biofilmu v mliekarenských závodoch je spájaná predovšetkým s vlhkými povrchmi, na ktorých sa hromadia mikroorganizmy. Účinnosť sanitácie v mliekarenskom podniku môže byť negatívne ovplyvnená prítomnosťou enterokokov, keďže jedným z hlavných virulentných faktorov enterokokov je ich schopnosť tvorby biofilmu (**Tendolkar et al., 2004**). Príklad hodnotenia

Tab. 1 Počty enterokokov (CPE) v cisternových vzorkách surového kravského mlieka (n = 25) a vo vzorkách mlieka zo zásobných tankov (n = 25)

| Ukazovateľ | CPE [KTJ.ml ⁻¹] | CPE [KTJ.ml ⁻¹] |
|------------|-----------------------------|-----------------------------|
| \bar{x} | 8,25.10 ³ | 9,16.10 ³ |
| x_g | 6,71.10 ³ | 7,33.10 ³ |
| min | 9,00.10 ² | 1,10.10 ³ |
| max | 1,50.10 ⁴ | 3,20.10 ⁴ |
| s_x | 4,37.10 ³ | 6,49.10 ³ |

Tab. 2 Druhové zastúpenie enterokokov v surovom mlieku z cisternových vzoriek a vzoriek zo zásobných tankov

| Druh rodu <i>Enterococcus</i> | Cisternové vzorky | | % z celkového počtu izolátov (n = 96) | Vzorky zo zásob. tankov | | % z celkového počtu izolátov (n = 96) |
|----------------------------------|-------------------|------|---------------------------------------|-------------------------|------|---------------------------------------|
| | počet | % | | počet | % | |
| <i>E. faecalis</i> | 25 | 58,1 | 26,0 | 38 | 71,7 | 39,6 |
| <i>E. faecium</i> | 7 | 16,3 | 7,3 | 0 | 0 | 0 |
| <i>E. group III.</i> | 5 | 11,6 | 5,2 | 15 | 28,3 | 15,6 |
| <i>E. mundtii</i> | 4 | 9,3 | 4,2 | 0 | 0 | 0 |
| <i>E. casseliflavus</i> | 2 | 4,7 | 2,1 | 0 | 0 | 0 |
| SPOLU | 43 | 100 | 44,8 | 53 | 100 | 55,2 |

Tab. 3 Tvorba biofilmu – *E. faecalis* kmeň č. 48

| Typ bujónu | Optická denzita pri $\lambda = 630 \text{ nm}$ | | | | |
|------------|--|---------|----------------------------------|---------|-------------------------------|
| | NK | | NK | | NK |
| | <i>E. faecalis</i> kmeň č. 48 | | <i>E. faecalis</i> kmeň č. 48 | | <i>E. faecalis</i> kmeň č. 48 |
| TSB | 0,408 | TSB | 0,408 | TSB | 0,408 |
| ŽB č. 2 | 0,319 | ŽB č. 2 | 0,319 | ŽB č. 2 | 0,319 |
| MRS | 0,298 | MRS | 0,298 | MRS | 0,298 |

Tab. 4 Schopnosť izolovaných enterokokov tvoriť biofilm

| Druh | Positívne druhy | Negatívne druhy |
|----------------------|-----------------|-----------------|
| <i>E. faecalis</i> | 5 (38 %) | 8 (62 %) |
| <i>E. faecium</i> | 1 (33 %) | 2 (67 %) |
| <i>E. group III.</i> | 0 | 2 (100 %) |

tvorby biofilmu enterokokom izolovaným z mlieka je uvedený v tabuľke 3. Vzhľadom k tomu, že optická denzita buniek tohto kmeňa nedosiahla hodnotu $> 0,1$, bol tento kmeň vyhodnotený ako neschopný tvoriť biofilm.

V našej štúdií sa tvorba biofilmu hodnotila u 18 náhodne vybraných a identifikovaných kmeňov enterokokov – tabuľka 4. Ako najvhodnejšie médium pre tvorbu biofilmu sa zistil TSB (tabuľka 3), ktorý sa však svojím zložením líši od zloženia mlieka.

Ako vyplýva z tabuľky 4 izolované enterokoky mali pomerne slabú schopnosť vytvárať biofilmy na povrchu plastu, z ktorého sú vyrobené mikrotitračné doštičky použité pri testovaní biofilmov. To ale nevylučuje schopnosť enterokokov tvoriť biofilmy, aj vzhľadom na médium použité v pokusoch, napr. na iných povrchoch. Vyššia schopnosť sa zaznamenala u kmeňov druhu *E. faecalis*. Veľmi podobnú schopnosť enterokokov tvoriť biofilmy dokázali napr. aj **Necidová et al. (2009)**, **Barbosa et al. (2010)**. Samozrejme tvorba biofilmov je ovplyvňovaná mnohými faktormi ako napr. povrch, substrát, podmienky, za ktorých sa mikroorganizmy rozmnožia jú a pod. Zanedbanie sanitácie povrchov mliekarenských strojov môže významne prispieť k tvorbe biofilmov, čím sa vytvárajú zdroje pre kontamináciu mlieka a mliečnych výrobkov mikroorganizmami.

ZÁVER

Enterokoky patria k bežnej mikroflóre surového mlieka a ich počty sa pred tepelným ošetrením mlieka štatisticky nevýznamne zvyšovali. Dominantným druhom enterokokov, ktorý sa v mlieku vyskytoval je *E. faecalis*. Výsledky náhodne testovaných kmeňov enterokokov na schopnosť tvoriť biofilm jasne dokazujú, že enterokoky takúto schopnosť majú. Predchádzať tvorbe biofilmov je možné dôsledným dodržiavaním pravidiel sanitácie a hygieny, či už v podmienkach fariem alebo v mliekarenských podnikoch.

LITERATÚRA

BARBOSA, J., GIBBS, P. A., TEIXEIRA, P. 2010. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. In *Food Control.*, vol. 21, 2010, no. 5, p. 651-656.

BIENDO, M., ADJIDE, C., CASTELAIN, S., BELMEKKI, M., ROUSSEAU, F., SLAMA, M., GANRY, O., SCHMIT, J. L., EB, F. 2010. Molecular Characterization of Glycopeptide-Resistant Enterococci from Hospitals of the Picardy Region (France). In *International Journal of Microbiology.* vol. 2010, no. 1, p. 1-8.

CITAK, S., GUNDOGAN, N., MEND, A. 2006. Occurrence, isolation and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from raw milk samples in Turkey. In *Milchwissenschaft.*, vol. 61, 2006, no. 2, p. 150-152.

DI ROSA, R., CRET, R., VENDITTI, M., D'AMELIO, R., ARCIOLA, C., MONTANARO, L., BALDASSARRI, L. 2006. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. In *FEMS Microbiology Letters.* vol. 256, 2006, no. 1, p. 145-150.

DUCKOVÁ, V., ČANIGOVÁ, M., KROČKO, M. 2009. *Enterococcus* species isolated from sheep milk and Slovak Bryndza cheese and their antibiotic susceptibility. In *Milchwissenschaft.*, vol. 64, 2009, no. 1, p. 70-74.

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

GOMES, B. C., ESTEVES, C. T., PALAZZO, I. C. V., FELIS, G. E., SECHI, L. A., FRANCO, B. D. G. M., DE MARTINIS, E. C. P. 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. In *Food Microbiology.*, vol 25, 2008, no. 5, p. 668-675.

KOREŇOVÁ, J., LOPAŠOVSKÁ, J., KUČHTA, T. 2008. Comparison of three microtitre plate-based methods for quantification of biofilm formation ability of bacteria contaminating food technologies. In *Journal of Food and Nutrition Research.*, vol. 47, 2008, no. 2, p. 100-104.

KROČKO, M., ČANIGOVÁ, M., DUCKOVÁ, V. 2007. Porovnanie selektívnych kultivačných médií pre stanovenie počtu enterokokov. In *Laboralim 2007: zborník prednáškových a posterových príspevkov zo XVI. Medzinárodnej konferencie o analytických metódach v potravinárstve v súlade s harmonizáciou legislatívy EÚ v dňoch 7. a 8. februára 2007 v Banskej Bystrici.* Bratislava: Slovenská technická univerzita. 2007, ISBN 80-227-2222-7, p. 295-299.

- METZGER, S. 2008. Biofilm formation by *Enterococcus* species of bovine mammary gland and environmental origins. In: *The Knowledge bank at OSU*, The Ohio State University: Department of Animal Sciences Honors Theses, 2008, p 11.
- MOHAMED, J. A., HUANG, W., NALLAPAREDDY, S. R., TENG, F., MURRAY, B. E. 2004. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. In *Infection and Immunity.*, vol. 72, 2004, no. 6, p. 3658-3663.
- NECIDOVÁ, L., JANŠTOVÁ, B., KARPIŠKOVÁ, S., CUPÁKOVÁ, S., DUŠKOVÁ, M., KARPIŠKOVÁ, R. 2009. Importance of *Enterococcus* spp. for forming a biofilm. In *Czech Journal of Food Science*, vol. 27, 2009, no. 2, p. 354-356.
- NES, I. F., DIEP, D. B., HOLO, H. 2007. Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. In *Journal of Bacteriology.*, vol. 189, 2007, no. 4, p. 1189-1198.
- PANFILI, G., FRATIANNI, A., DI CRISCIO, T., GAMMARIELLO, D., SORRENTINO, E. 2008. Influence of microorganisms on retinol isomerization in milk. In *Journal of Dairy Research.*, vol. 75, 2008, no. 1, p. 37-43.
- SERIO, A., CHAVES-LÓPEZ, C., PAPARELLA, A. SUZZI, G. 2010. Evaluation of metabolic activities of enterococci isolated from Pecorino Abruzzese cheese. In *International Dairy Journal.*, vol. 20, 2010, no. 7, p. 459-464.
- STN 56 0100: 1970. Mikrobiologické skúšanie potravín, predmetov bežnej spotreby a prostredia potravinárskych prevádzok. Bratislava: ÚNMS, 1970. 239 s.*
- STANDAROVÁ, E., BORKOVCOVÁ, I., DUŠKOVÁ, M., PRIDALOVÁ, H., DRAČKOVÁ, M., VORLOVÁ, L. 2009. Effect of Some Factors on the Biogenic Amines and Polyamines Content in Blue-Veined Cheese Niva. In *Czech Journal of Food Science* vol. 27, 2009, special issue, p. 410-413.
- TENDOLKAR, P. M., BAGHDAYAN, A. S., GILMORE, M. S., SHANKAR, N. 2004. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. In *Infection and Immunity.*, vol. 72, 2004, no. 10, p. 6032-6039.
- TEIXEIRA, L. M., CARVALHO, M. S., FACKLAM, R. R. 2007. *Enterococcus*. In *Manual of Clinical Microbiology*, 9th ed., Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Landry, M. L., Tenover, M. C. (eds), ASM Press: Washington D.C. 2007, chap. 30. p. 698-715.
- TRIVEDI, K., CUPÁKOVÁ, S., KARPIŠKOVÁ, R. 2011. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. In *Veterinarni Medicina.*, vol. 56, 2011, no. 7, p. 352-357.
- TUNCER, Y. 2009. Some technological properties of phenotypically identified enterococci strains isolated from Turkish tulum cheese. In *African Journal of Biotechnology.*, vol. 8, 2009, no. 24, p. 7008-7016.
- WEISS, A., DOMIG, K. J., KNEIFEL, W. 2005. Selective media for enumeration of probiotic enterococci. In *Food technology and biotechnology*, vol. 43, 2005, no. 2, p. 147-155.

Acknowledgments:

This work was supported by grant VEGA 1/0410/09.

Contact address:

doc. Ing. Margita Čanigová, CSc., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: Margita.Canigova@uniag.sk

Ing. Viera Ducková, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: viera.duckova@uniag.sk

Ing. Miroslav Kročko, PhD., Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: mirokrocko@yahoo.com

Ing. Jana Račková, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: rackova@levmilk.sk

Ing. Jana Bezeková, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Department of Evaluation and Processing of Animal Products, Trieda A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, E-mail: j.bezekova@gmail.com