

VÝVOJ METODY PRO TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI SANITAČNÍCH ROZTOKŮ PROTI BIOFILMŮM

Irena Němečková, Šárka Trešlová, Eliška Lešková

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Development of method for the efficiency testing of sanitation solutions against biofilms

Souhrn

Výběr účinných sanitačních roztoků je jedním z nástrojů eliminace technologicky či zdravotně rizikových mikroorganismů a jejich biofilmů z mlékárenských provozů. Dostupná jsou data o účinnosti jednoduchých roztoků obsahujících nejběžněji používané aktivní látky. Reálné sanitační roztoky však často obsahují také přídavek povrchově aktivních látek, které při detekci a kvantifikaci biofilmu mohou poskytovat falešně pozitivní výsledky. Proto byla navržena odpovídající metoda. Principem metody je formování a kvantifikace biofilmu na nerezových nebo skleněných destičkách, které jsou následně podrobeny působení sanitačních roztoků a zbytky biofilmu jsou poté setřeny a kultivačním rozbořem kvantifikovány. Jednotlivé kroky byly optimalizovány. S ohledem na opakovatelnost metody a variabilitu mikroorganismů byla také navržena kritéria pro interpretaci dat.

Klíčová slova: detekce a kvantifikace biofilmu; modelování sanitačních režimů; účinnost sanitačních roztoků; stěr

Summary

The selection of efficient sanitation solutions is a tool for the elimination of technologically or health hazardous microorganisms and their biofilms from dairy processing. Data on the efficiency of simple solutions containing the most common active substances are available. However, real sanitation solutions often contain the addition of surfactants that can cause false positive results on biofilm detection and quantification. Therefore, a suitable method was developed. Its principle is to form and quantify biofilm on stainless steel or glass plates, to subject the plates to the action of sanitation solutions, to swab the remaining biofilm and to quantify it using cultivation methods. Particular steps were optimized. Regarding the repeatability of method and the variability of microorganisms, criteria for the interpretation of results were suggested as well.

Keywords: detection and quantification of biofilms; modelling of sanitation regimes; efficiency of sanitation solutions; swab

Úvod

Mléko, resp. meziprodukty a produkty z mléka jsou zdrojem celé řady živin. To s sebou při jeho zpracování, a zejména při procesech probíhajících za zvýšené teploty, přináší také zvýšené riziko tvorby usazenin na povrchích technologických zařízení a pomůcek. Problém v tomto ohledu představují jak minerální látky (tzv. mléčný kámen), tak látky organické – bílkoviny, tuky i cukry (vázané v produktech Maillardovo reakcí) (Guerrero-Navarro a kol., 2020). Významné jsou zejména denaturované frakce bílkovin s nižší termostabilitou (Hanus a kol., 2017). Takto vzniklé usazeniny se následně mohou stát podkladem, na kterém se kontaminující mikroorganismy snadno uchycují a vytvářejí biofilmy (Kunová a kol., 2009). Biofilmy jsou v současnosti považovány za hlavní zdroj mikrobiální kontaminace v mlékárenství. Dostatečně účinná sanitace mlékárenských pomůcek a zařízení proto patří mezi základní předpoklady pro zajištění výroby kvalitních, mikrobiologicky bezpečných a sensoricky vyhovujících mléčných výrobků (Flint a kol., 2020).

Posuzování účinnosti používaných sanitačních roztoků a režimů sanitace v provozních podmínkách spočívá v pravidelné kontrole čistoty technologických zařízení a pomůcek po sanitaci a stanovení hygienických indikátorů v meziproduktech a finálních výrobcích (Kunová a kol., 2011). Vzorkování přímo na provozu sice umožňuje odhalit existenci případného problému, avšak neumožňuje z nabízených možností vybrat optimální řešení. Potřeba je k tomu provést *in vitro* experimenty.

Výsledky testování účinnosti základních roztoků obsahujících nejběžněji používané aktivní látky jsou v literatuře dostupné (např. Bremer a kol., 2006, de Silva Fernandes a kol., 2017, Belessi a kol., 2011). To ale nereflexuje reálnou situaci na provozech. Sanitační roztoky se totiž často obohacují o povrchově aktivní látky mj. se smáčecím, antiredepozičním, pěnotvorným nebo antimikrobiálním účinkem. Povrchově aktivní látky obecně mají schopnost hromadit se na fázových rozhraních. Pokud se nahromadí na modelově sanitovaných površích, mohou při detekci a kvantifikaci biofilmu některými metodami (zejména s využitím různých barvicích činidel) způsobovat falešně pozitivní výsledky (Němečková a kol., 2017).

Byla proto navržena metoda pro testování účinnosti sanitačních roztoků proti biofilmům, která by umožňovala pracovat i s roztoky, které povrchově aktivní látky obsahují. Cílem práce je na vybraných datech tuto metodu prezentovat.

Materiál a metody

Mikroorganismy

Při práci byly použity bakteriální kmeny, které byly v minulosti izolovány ve VÚM z mlékárenských vzorků. Pro experimenty byly kmeny oživeny v BHI bujónu kul-

tivací při vhodné teplotě (25, 30 nebo 37 °C) po dobu 24–48 h. Pro interpretaci výsledků kvantifikace množství biofilmu měřením optické denzity bylo použito celkem 108 kmenů náležejících k rodům *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Kocuria*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus* a dalším. Kmeny použité i v dalších níže popsáných experimentech jsou specifikovány v tab. 1.

Tab. 1 Přehled kmenů uvedených v této práci

Označení kmene	Druh mikroorganismu	Původ	Použitá teplota kultivace (°C)	Tvorba biofilmu
S24-AB-1B	<i>Acinetobacter schindleri</i>	syrové mléko	30	silná
70-LA	<i>Escherichia coli</i>	syrové mléko	37	střední
72-LA	<i>Escherichia coli</i>	syrové mléko	37	slabá
185-LA	<i>Neisseria subflava</i>	syrové mléko	37	nedetekována
S91-AB-F	<i>Bacillus licheniformis</i>	sanitační roztok	30	silná
S708-CHR-2	<i>Aeromonas bestiarum</i>	voda	30	střední

Sanitační roztoky

Sanitační roztoky použité v níže popsáných experimentech jsou specifikovány v tab. 2. Roztok B byl použit ve formě pěny vytvořené pomocí elektrického šlehače.

Tab. 2 Přehled sanitačních roztoků uvedených v této práci

Označení roztoku	Složení koncentráту (dle údajů výrobce)	Použitá koncentrace (% obj.)	Teplota působení (°C)	Doba působení (min)
A	NaOH 49 %	2	65	15
B	Kys. fosforečná 30–50 %, alkylamin oxidy 1–2,5 %	3	20	15
C	N-(3-aminopropyl)-N-dodecylpropan-1,3-diamin 1–2,5 %, N-(2-ethylhexyl)-isonan-1-amid 0,25–0,5 %, etanol 0,1–0,25 %	3	20	15

Mikrobiologický rozbor

Denzita testovaných kmenů v kultivačních médiích i ve stěrech byla stanovena jako celkový počet mikroorganismů podle ČSN EN ISO 4833-1 (2014).

Detekce a kvantifikace biofilmu na mikrotitračních destičkách

Biofilmy byly na mikrotitračních destičkách nakultivovány v BHI bujónu při vhodné teplotě (25, 30 nebo 37 °C) po zvolené době 3 dny a vizualizovány barvením krystalovou violetí podle postupu, který publikovali Djordjevic a kol. (2002). Od každého vzorku byly připraveny čtyři paralelní jamky, přičemž biofilm byl kvantifikován modifikovanými postupy jako:

- součet hodnot přiřazených jednotlivým jamkám na základě vizuálního hodnocení intenzity fialového zbarvení jamek po nabarvení biofilmu a vypláchnutí přebytku krystalové violeti vodou (0 biofilm se netvoří, 1 slabá tvorba biofilmu, 2 střední tvorba biofilmu, 3 silná tvorba biofilmu, 4 extrémně silná tvorba biofilmu) (Němečková a kol., 2017),
- průměrná absorbance při 560 nm po odečtení absorbance kontroly (nezaočkovaný BHI bujón), jak bylo naměřeno v jamkách s etanolem, ve kterém byla rozpuštěna část krystalové violeti uvolněné z obarveného biofilmu (Djordjevic a kol. (2002) měřili při 595 nm, avšak vlnová délka 560 nm byla zvolena, protože při ní naměřená absorbance byla častěji v požadovaném rozmezí pod 1,00).

Kvantifikace a sanitace buněk biofilmu na nerezových destičkách nebo podložních sklíčkách

Připraveny byly GL lahve se šroubovacím uzávěrem o objemu 250 ml, do kterých byly vloženy testované destičky vysterilované při 180 °C/2 h. Jednalo se o hladké nerezové destičky o rozměrech 110 x 25 x 1 mm nebo skleněná podložní sklíčka o rozměrech 76,2 x 25,4 x 1 mm. Nerezové destičky byly zhotoveny na zakázku (MILCOM a.s., závod servisních služeb, Dvůr Králové), jejich rozměr byl zvolen s ohledem na snadnou manipulaci během experimentu. V lahvích s destičkami bylo vysterilováno po 200 ml testovaného média:

- nezahuštěná sladká syrovátka (upraveno pH na hodnotu $4,4 \pm 0,2$, poté sterilace při 110 °C/20 min, aseptické odstředění vysrážených bílkovin 15 min. při 6000 ot./min.), 100% anebo naředěná sterilní destilovanou vodou v poměru 1:1,
- sušené odstředěné mléko obnovené na koncentraci 0,1; 0,5; 5,0 nebo 10,0 g/100 ml (sterilace při 110 °C/20 min),
- BHI bujón (sterilace při 121 °C/20 min).

Média s vloženými destičkami byla v potřebném počtu lahví naočkována 1 % obj. čerstvě připravených kultur testovaných kmenů v BHI bujónu a stanovena byla počáteční denzita mikroorganismů v médiích. Kultivace probíhala po dobu 3 dnů, a to buď na třepačce (130 ot./min.) při laboratorní teplotě, anebo staticky v termostatu nastaveném na vhodnou teplotu (viz tab. 1). Poté byla stanovena denzita v médiích po kultivaci a destičky byly sterilní pinzetou vyjmuty, umístěny do kádinek a opláchnuty z každé strany 25 ml sterilní destilované vody. Opláchnuté destičky s biofilmem byly opatrně odkládány do stojánku na podložní sklíčka, přičemž k manipulaci s nerezovými destičkami byla využita jejich okrajová plocha přesahující výšku stojánku odpovídající výšce podložních sklíček. Kvantifikováno bylo množství vytvořeného biofilmu, a to těmito postupy:

- Stojánek s destičkami byl naplněn 0,1% roztokem krystalové violeti, barvení trvalo 45 minut. Pak bylo barvivo slito a destičky byly v kádince pětkrát pro-

myty 10 ml destilované vody a ponechány volně oschnout. Krystalová violet z obarvených biofilmů byla postupně rozpuštěna v 10 ml 95% etanolu. Etanolové roztoky byly poté nadávkovány po čtyřech jamkách na mikrotitrační destičky a změřena byla absorbance při 560 nm oproti samotnému etanolu jako kontrole.

- Povrchy destiček byly setřeny, a to z obou stran (bez hran), v ploše, která byla ponořena, s výjimkou cca centimetrového pásu, kam dosahovala hladina média. Štěrovky byly vytřepány a stanovena byla denzita mikroorganismů.

Použity byly tyto štěrovky:

- polyuretanové houbičkové štěrovky napuštěné 10 ml pufrované peptonové vody EZ-Reach™ (World Bioproducts) – po setření vytřepány do 90 ml fyziologického roztoku,
- transportní štěrovky z umělého hedvábí, bez aktivního uhlí, podle Amiese (Copan) – po setření vytřepány do 9 ml fyziologického roztoku,
- vatové štěrovky v 10 ml pufrované peptonové vody (World Bioproducts) – po setření vytřepány do přiložené pufrované peptonové vody.

Tím bylo stanoveno množství biofilmu před sanitací. Paralelně nakultivované a opláchnuté destičky s biofilmem byly podrobeny působení sanitálních roztoků. Vloženy byly do čistých GL lahví s 250 ml testovaného sanitálního roztoku vytemperovaného na testovanou teplotu odpovídající podmínkám použití na provoz. Po uplynutí testovaného času působení byly destičky sterilní pinzetou vyjmuty, opláchnuty z každé strany 25 ml sterilní destilované vody a odloženy do stojánku na podložní sklíčka. Poté byly zbytky biofilmu z destiček setřeny a stanovena byla denzita mikroorganismů.

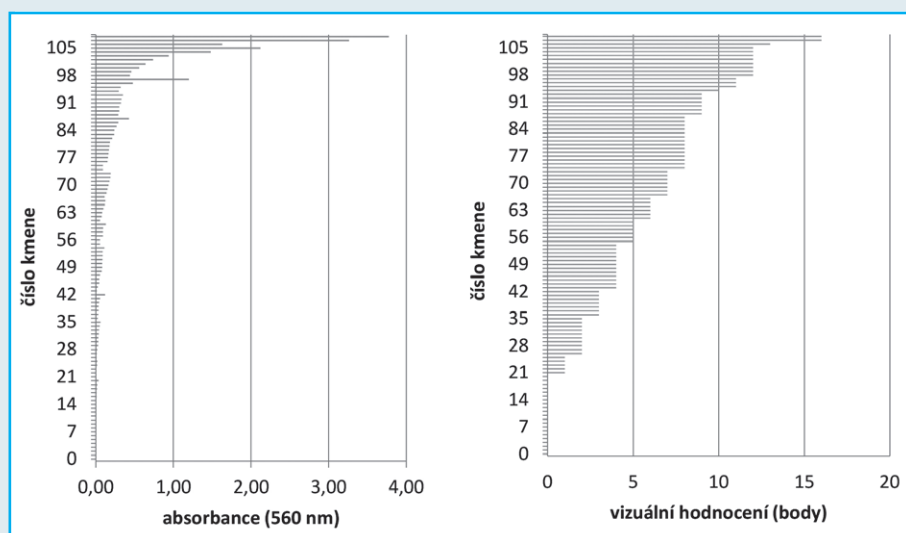
Výsledky a diskuze

V přípravné fázi byl navržen přístup k interpretaci výsledků kvantifikace množství biofilmu měřením absorbance. Na souboru

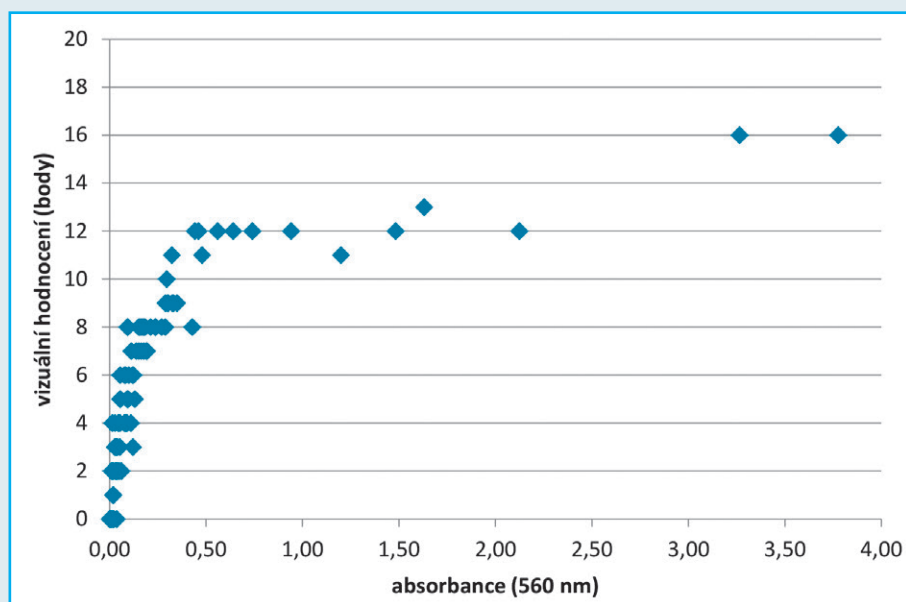
Tab. 3 Kritéria navržená pro interpretaci výsledků kvantifikace množství biofilmu na mikrotitračních destičkách

Intenzita tvorby biofilmu	Vizuální hodnocení (součet 4 jamek s bodovým hodnocením na stupnici 0-4)	Absorbance při 560 nm (průměr ze 4 jamek po odečtení kontrolního vzorku)
Extrémně silná	13-16	>1,00
Silná	10-12	0,45-1,00
Střední	6-9	0,10-0,44
Slabá	2-5	0,02-0,09
Nedetekována	0-1	<0,02

108 kmenů byly porovnány výsledky měření absorbance při 560 nm a vizuálního hodnocení a zároveň tak byla zjištěna intenzita tvorby biofilmu jednotlivých kmenů (viz



Obr. 1 Porovnání vizuálního hodnocení a měření absorbance při 560 nm pro kvantifikaci množství biofilmu (v obou vyhodnoceních je stejný kmen uveden pod stejným pořadovým číslem, kmene seřazeny podle výsledků vizuálního hodnocení)



Obr. 2 Grafické znázornění nelineárního vztahu mezi výsledky měření absorbance a vizuálního hodnocení (jednotlivé body reprezentují výsledky jednotlivých kmenů)

tab. 1). Výsledky jsou znázorněny na obr. 1 a 2, ze kterých je patrné, že vztah mezi výsledky získanými oběma metodami není lineární. Byla tedy navržena kritéria uvedená v tab. 3.

Takto navržené stupnici vyhovělo 80 kmenů (74 %). Nejvíce neshod mezi oběma přístupy nastalo, když se při vizuálním hodnocení rozhodovalo mezi kategoriemi „slabá“ a „střední“ tvorba biofilmu pro danou jamku. Pokud by byly tyto kategorie sloučeny, vyhovělo by 100 kmenů (92 %) a nejvíce neshod by nastalo v rozlišení, zda je biofilm ještě detekován nebo už nedetekován. „Silná“ až „extrémně silná“ tvorba biofilmu je tedy oběma přístupy detekována spolehlivě. Limit pro absorbanční cca 0,45 pro rozlišení mezi „slabou a střední“ a „silnou a extrémně silnou“ tvorbou biofilmu je patrný také z obr. 2 – jedná se o oblast, ve které se prudce mění směrnice.

Aby mohla být účinnost sanitačních roztoků vůči biofilmům spolehlivě otestována, je vhodné s využitím mikrotitračních destiček vybrat kmeny a/nebo optimalizovat podmínky kultivace tak, aby tvorba biofilmu byla pokud možno silná (absorbance 0,45 a vyšší).

Další experimenty se již týkají metodiky kvantifikace biofilmů a testování účinnosti sanitačních roztoků jako takové. Z celkového objemu realizovaných experimentů jsou zde pro přehlednost prezentovány pouze vybrané, ilustrující cestu k optimalizované podobě metodiky.

Výběr kultivačního média

Výhodou kultivace biofilmu v syntetickém médiu je, že jsou živiny v něm obsažené rozpustné, neusazují se na destičce, a tedy ani při spektrofotometrickém stanovení nezpůsobují falešně pozitivní výsledky. Na druhou stranu ale svým složením neodpovídají reálným podmínkám na mlékárenských provozech. V případě mléka (a přirozeně také smetany) tomu je naopak.

Mléko rekonstituované na sušinu 10 g/100 ml se ukázalo jako nevhodné, neboť se jeho nánosy spolu s biofilmem nepodařilo účinně setřít žádnou z testovaných stěrovek. Proto byla do testování zařazena také mléka obnovená na nižší sušinu a simulující tzv. „bílé vody“ na mlékárně. V případě syrovátky bylo riziko tvorby usazenin na destičce ještě více omezeno díky vysrážení bílkovin během sterilace a jejich následnému odstředění.

V tab. 4 jsou porovnány výsledky kvantifikace biofilmu kmene *Acinetobacter schindleri* S24-AB-1B pro různá kultivační média, jak bylo stanoveno kultivačním rozbohem stěrů. Tento konkrétní kmen ve všech testovaných

Tab. 4 Tvorba biofilmu *Acinetobacter schindleri* S24-AB-1B v různých kultivačních médiích (počáteční denzita 7,08 log KTJ/ml, kultivace na třepačce, nerezové destičky, houbičkové stěrovky)

Médium	Denzita v médiu na konci kultivace (log KTJ/ml)	Denzita ve stěru (log KTJ/ml)	Poměr denzit (KTJ/ml) ve stěru a v médiu (%)
Syrovátka	8,41	6,85	2,75
Zředěná syrovátka 1:1	8,28	7,08	6,32
Obnovené mléko 0,1 g/100 ml	7,51	7,08	37,15
Obnovené mléko 0,5 g/100 ml	7,78	7,28	31,56
Obnovené mléko 1,0 g/100 ml	7,79	6,89	12,60
Obnovené mléko 5,0 g/100 ml	7,94	6,51	3,71
BHI	7,98	6,71	5,37

Tab. 5 Porovnání intenzity tvorby biofilmů kultivovaných na třepačce a v termostatu a kvantifikovaných pomocí stěrů a měřením absorbance (BHI bujón, nerezové destičky, houbičkové stěrovky)

Kmen	Druh mikroorganismu	Na třepačce		V termostatu	
		Absorbance (560 nm)	Stěr (log KTJ/ml)	Absorbance (560 nm)	Stěr (log KTJ/ml)
S24-AB-1B	<i>A. schindleri</i>	0,362	7,00	0,183	6,72
70-LA	<i>E. coli</i>	0,194	7,04	0,312	7,15
72-LA	<i>E. coli</i>	0,100	7,15	0,219	6,84
185-LA	<i>N. subflava</i>	0,116	4,26	0,069	3,30
S91-AB-F	<i>B. licheniformis</i>	neděláno	3,95	neděláno	2,98

médiích rostl, nejlépe v syrovátce, nejhůře v mléce obnoveném na sušinu 0,1 g/100 ml. A ve všech testovaných médiích také tvořil biofilm – ve zředěných médiích relativně více než v médiích neředěných. Podobná zjištění popsali také Fathollahi a Coupe (2021). Získané výsledky jsou konzistentní a při jejich získání nebyly shledány žádné problémy. Všechna média uvedená v tab. 4 lze tedy pro potřeby metodiky použít.

Vliv proudění média během kultivace

O kolonizaci povrchů mikroorganismy rozhodují nejen vlastnosti daného kmene, povrchu a média, ale také rychlost proudění média a s ním spojené mechanické namáhání. Proto byla porovnána kultivace biofilmu na třepačce a staticky v termostatu. Výhodou použití třepačky je možnost simulace proudění média, výhodou termostatu možnost regulace teploty kultivace.

V tab. 5 jsou uvedeny výsledky pro vybrané kmeny – tři aerobní (S24-AB-1B, 185-LA, S91-AB-F), dva fakultativně anaerobní (70-LA, 72-LA). Z výsledků se jeví, že by kultivace na třepačce mohla tvorbu biofilmu mírně stimulovat u kmenů s vyššími požadavky na kyslík, nicméně v rámci metodiky přínos kultivace biofilmu na třepačce jednoznačně prokázán nebyl.

Porovnání výsledků stěrů a měření absorbance

Výhodou měření absorbance je rychlost získání výsledků, nevýhodou interference s abiotickými usazeninami (z kultivačního média nebo ze sanitačního roztoku) na destičce. Vizuální hodnocení obarveného biofilmu zařazeno nebylo, protože má tytéž nevýhody jako měření absorbance. Rozbor stěrů je časově náročnější, avšak setření destiček je díky mechanickému působení stěrovek

Tab. 6 Opakovatelnost kvantifikace biofilmu testovanými metodami (BHI bujón, kultivace v termostatu, houbičkové stěrky)

Metoda	Absorbance (560 nm) (nerezové destičky)	Stěry z nerezových destiček (log KTJ/ml)	Stěry z podložních sklíčků (log KTJ/ml)
Kmen	72-LA	S91-AB-F	S24-AB-1B
Druh mikroorganismu	<i>E. coli</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>A. schindleri</i>
Počet opakování	6	9	10
Minimální hodnota	0,149	2,83	4,48
Maximální hodnota	0,305	4,76	5,46
Průměr	0,250	3,50	5,11
Směrodatná odchylka	0,055	0,72	0,33

Tab. 7 Porovnání různých stěrvek pro kvantifikaci biofilmu *A. schindleri* S24-AB-1B pomocí stěrů (počáteční denzita 6,08 log KTJ/ml, BHI bujón, kultivace v termostatu, nerezové destičky)

Opakování	Houbičková stěrka (log KTJ/ml)	Transportní stěrka (log KTJ/ml)	Valová stěrka (log KTJ/ml)
1	6,79	5,86	5,57
2	6,57	6,18	6,48
3	6,68	5,90	6,32
4	6,75	6,20	6,26
5	7,32	5,79	6,11
Průměr	6,82	5,99	6,15
Směrodatná odchylka	0,29	0,19	0,35
Denzita v BHI (opakování 1) po kultivaci	8,34	7,94	8,15

účinnější a kvantifikovány jsou pouze mikroorganismy, resp. jejich kolonietvorné jednotky.

Z tab. 5 je patrné, že mezi výsledky získanými oběma metodami existuje pouze slabá korelace. Zčásti to může být dáno rozdílnou strukturou biofilmu jednotlivých kmenů, s různým poměrem kultivovatelných buněk a extracelulární matrice biofilmu. Zčásti je nutno vzít v úvahu opakovatelnost obou metod, viz dále. Nejvýznamnějším důvodem však pravděpodobně je, že použité metody kvantifikují každá něco jiného. Barvení krystalovou violetí a následné měření absorbance kvantifikuje biofilm jako takový, tj. jak buňky biofilmu, tak přítomnou extracelulární matici. Pomocí stěrů se kvantifikují pouze životaschopné a kultivovatelné buňky. Při uvážení výhod a nevýhod obou metod je v této práci preferováno biofilmy kvantifikovat pomocí stěrů.

Porovnání nerezových destiček a podložních sklíčků, opakovatelnost testovaných metod

Nejen k vizuálnímu hodnocení tvorby biofilmu na mikrotitračních destičkách, ale také ke kvantifikaci biofilmu podle navrhované metodiky je potřeba přistupovat semikvantitativně. Z tab. 6 je patrné, že při opakovaném hodnocení vzorků připravených za stejných podmínek stejným pracovníkem ve stejném čase může rozdíl mezi výsledky stěrů činit až 2 řády, respektive rozdíl v naměřených hodnotách absorbance až 0,15. V kontextu tohoto zjištění opravdu rozdíl mezi kultivací na třepače a v termostatu (tab. 5) prokázán nebyl.

Dále tab. 6 ilustruje, že je pro potřeby navrhované metodiky možno použít jak nerezové destičky, tak podložní

sklíčka. Nerezové destičky lépe modelují reálná nerezová technologická zařízení a pomůcky. Na druhou stranu podložní sklíčka jsou snáze dostupná a z tab. 6 by se mohlo zdát, že pro ně opakovatelnost vychází lépe. Důvodem ale může být jak hladší a lépe stíratelný povrch, tak rozdílné vlastnosti použitých kmenů.

Porovnání stěrvek

Rozdíl mezi výsledky jednotlivých opakování v rozpětí nanejvýš 2 řádů byl zjištěn také v případě, že se opakování mezi sebou lišila použitými stěrkami. V souboru 15 opakování byly porovnány tři typy stěrvek (tab. 7). Nejvyšší výtěžnost biofilmu vykazovaly houbičkové stěrky, avšak mezi jednotlivými opakováními byly nejvyšší rozdíly. Pro transportní stěrky tomu bylo naopak. Nicméně zjištěné rozdíly mezi stěrkami byly nevýznamné. Pokud bude v rámci daného experimentu postupováno jednotně, pro potřeby metodiky lze využít kterýkoliv z testovaných typů stěrvek.

Testování účinnosti sanitačních roztoků

Navrhovaná metodika byla vyzkoušena na třech typech sanitačních roztoků: bez povrchově aktivních látek, s povrchově aktivními látkami jakožto aditivou pro zajištění tvorby pěny a s povrchově aktivními látkami jakožto účinnými látkami roztoku. Pro všechny tyto typy

Tab. 8 Testování účinnosti sanitačních roztoků vůči bakteriálním biofilmům (BHI bujón, kultivace v termostatu, nerezové destičky, houbičkové stěrky)

	<i>A. schindleri</i> S24-AB-1B (log KTJ/ml)	<i>Ae. bestiarum</i> S708-CHR-2 (log KTJ/ml)
Kontrolní vzorky – stav před sanitací		
BHI po naočkování	6,54	6,52
BHI po kultivaci	7,83	8,11
Stěr po kultivaci – průměr (n = 3)	5,94	6,23
Směrodatná odchylka	0,19	0,10
Sanitace roztokem A (NaOH)		
Stěr 1	< 1	< 1
Stěr 2	< 1	< 1
Stěr 3	2,66	< 1
Sanitace roztokem B (kys. fosforečná, povrchově aktivní látky) – pěna		
Stěr 1	< 1	< 1
Stěr 2	1,60	< 1
Stěr 3	2,04	< 1
Sanitace roztokem C (povrchově aktivní látky)		
Stěr 1	< 1	< 1
Stěr 2	< 1	< 1
Stěr 3	< 1	< 1

sanitačních roztoků se metodika ukázala jako vhodná. Výsledky testování jsou shrnuty v tab. 8.

Jestliže pro daný vzorek můžeme získat výsledky v rozpětí dvou řádů, navrhuje se za průkazný dílčí úbytek životaschopného biofilmu považovat snížení alespoň o tři řády. Tomuto kritériu všechny testované varianty vyhověly. Nicméně žádoucím výsledkem je dostat množství biofilmu po sanitaci za podmínek metody pod mez detekce. Tohoto výsledku bylo dosaženo pro všechny testované roztoky u kmene *Ae. bestiarum* S708-CHR-2 a pro roztok C u kmene *A. schindleri* S24-AB-1B, který tvoří odolnější biofilm. Tab. 8 ilustruje, že k tomu, aby bylo možné dostatečně účinné a méně účinné roztoky od sebe spolehlivě rozlišit, je zapotřebí pokus několikrát (minimálně třikrát) zopakovat a před modelovou sanitací mít nakultivováno dostatečné množství biofilmu.

Závěr

Navržena byla metoda pro testování účinnosti sanitačních roztoků vůči biofilmům a na vybraných experimentálních datech byly prezentovány její možné variace. Finální podoba metodického postupu bude zpracována do formy metodiky, ve které bude dostupná uživatelům.

Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou Národní agentury pro zemědělský výzkum Ministerstva zemědělství České republiky při řešení projektu QK1710156 v programu ZEMĚ a s využitím finanční podpory na dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace dle rozhodnutí MZE-RO1421.

Literatura

BELESSI Ch.E.A., GOUNADAKI A.S., PSOMAS A.N., SKANDAMIS P.N. (2011): Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 145, s. S46-S52.

BREMER P.J., FILLERY S., Mc GUILLAN A.J. (2006): Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 106, s. 254-262.

ČSN EN ISO 4833-1 (2014): Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů – Část 1: Technika přelivem a počítáním kolonií vykultivovaných při 30 °C. ÚNMZ.

DE SILVA FERNANDES M., COELHO ALVARES A.C., MANOEL

J.G.M., RAMIRES ESPER L.M., KABUKI D.Y., KUJAYE A.Y. (2017): Formation of multi-species biofilms by *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis* and *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing and effectiveness of chemical sanitation procedures. *International Dairy Journal*, 72, s. 23-28.

DJORDJEVIC D., WIEDMANN M., MCLANDSBOROUGH L. A. (2002): Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied Environmental Microbiology*, 68, s. 2950-2958.

FATHOLLAHI A., COUPE S.J. (2021): Effect of environmental and nutritional conditions on the formation of single and mixed-species biofilms and their efficiency in cadmium removal. *Chemosphere*, 283, 131152.

FLINT S., BREMER P., BROOKS J., PALMER J., SADIQ F.A., SEALE B., TEH K.H., WU S., MD ZEIN S.N. (2020): Bacterial fouling in dairy processing. *International Dairy Journal*, 101, 104593.

GUERRERO-NAVARRO A.E., RÍOS-CASTILLO A.G., RIPOLLES-AVILA C., FELIPE X., RODRÍGUEZ-JEREZ J.J. (2020): Microscopic analysis and microstructural characterization of the organic and inorganic components of dairy fouling during the cleaning process. *Journal of Dairy Science*, 103, s. 21117-2127.

HANUŠ O., HAVLAS L., HAŇKOVÁ J., NĚMEČKOVÁ I., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R. (2017): Sezónnost a odhad tepelné stability syrového kravského mléka pro jeho výběr k technologickému zpracování. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 160, s. 4-8.

KUNOVÁ G., PECHAČOVÁ M., PEROUTKOVÁ J., ROUBAL P., JAGLIČ Z., PAZLAROVÁ J. (2009): Kontrola a monitorování úrovně a účinnosti sanitace v mlékárenských provozech. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 116, s. 18-23.

KUNOVÁ G., PECHAČOVÁ M., JAGLIČ Z., PAZLAROVÁ J., ROUBAL P. (2011): Biofilmy a hygiena výroby v mlékárenských provozech. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 127, s. XIX-XXII.

NĚMEČKOVÁ I., HLAVÁČKOVÁ Z., ŠEBKOVÁ T., SMOLOVÁ J., STRMISKA V., HORÁČKOVÁ Š. (2017): Vliv sanitačních roztoků na kvasinky kontaminující mlékárenské provozy a na jejich biofilmy. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 161, s. 8-13.

Korespondující autor: Ing. Irena Němečková, Ph.D.,
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, e-mail: nemeckova@milcom-as.cz.

Přijato do tisku: 12. 7. 2021

Lektorováno: 30. 7. 2021

“CO JE ZAJÍMAVÉHO VE VĚDECKÉ LITERATUŘE”

Mléko a mléčné výrobky jsou neustále centrem pozornosti výzkumu. Výběr z vědecké literatury pro toto číslo zahrnuje následující publikace:

NOVÉ METODY DETEKCE REZIDUÍ ANTIBIOTIK V MLÉCE

Stanovení stopových hladin florfenikolu, thiamfenikolu a chloramfenikolu v krmivech pomocí HPLC-MS/MS

Gavilán, R.E. et al. (2019): Determination of florfenicol, thiamfenicol and chloramfenicol at trace levels in animal feed by HPLC-MS/MS. *Antibiotics*, 8(2): 59.

Podávat medikovaná krmiva obsahující florfenikol a thiamfenikol je v Evropské unii povoleno dle veterinárního předpisu a s dodržением ochranných lhůt. Při jejich výrobě však může dojít ke křížové kontaminaci s jinými neúčinnými krmivy, kde je však přítomnost florfenikolu, thiamfenikolu i chloramfenikolu zakázána. Proto by podle přílohy