

IN VITRO TESTING OF THE SANITARY SOLUTIONS EFFECT FOR THE ENTEROCOCCI SURVIVAL

Jana Fabianová, Viera Ducková, Margita Čanigová, Miroslav Kročko, Michal Gábor

ABSTRACT

The effect of the sanitary solutions to the survival of antibiotic resistant enterococci isolated from raw cow milk was examined. The main species isolated from raw cow milk were *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. mundtii* and *E. casseliflavus*. The *E. faecalis* strains were the predominant isolates resistant to ampicillin, gentamicin and tetracycline. The effect of the sanitary solutions based on nitric acid, phosphoric acid and hexamethylenediamine was evaluated. The 0.75% sanitary solutions with temperature 30°C, 40°C and 60°C, adjusted hardness of water to 0°, 15°, 30° and 40° and in the presence of organic load (0.1% milk) during 20 minutes of action were tested. The sanitary solutions were sufficiently effective for all tested strains, also in the lower temperature with the presence of organic and inorganic load in the environment. Only the counts of strain *E. faecalis* (53) were reduced from the 6.5×10^5 to 3.1×10^1 cfu. ml⁻¹ in the conditions of sanitary solution with water hardness 45°, 0.1% of milk organic load in the temperature 30°C. It was also tested the effect of sanitary solution on the combination of both *E. faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* during the same conditions, which however after application of the sanitary solutions were reliably inactivated.

Keywords: enterococci, sanitary solutions, water hardness, organic load

ÚVOD

Enterokoky predstavujú veľkú časť autochtónnych baktérií spojených s cicavčím gastrointestinálnym traktom (Giraffa, 2002).

Do mlieka sa môžu dostať z viacerých zdrojov a to cestou primárnej alebo sekundárnej kontaminácie surového mlieka. Zdrojom kontaminácie mlieka enterokokmi môže byť povrch vemena, krmivo, výkaly, voda, prach, ale aj ruky a odev dojiča. Ďalším zdrojom sú plochy zariadení a nástrojov používaných v prvovýrobe mlieka. Greifová et al. (2003) uvádzajú, že enterokoky sa pravidelne nachádzajú v dojaciích strojoch alebo na inom náradí a zariadení.

Enterokoky sa môžu dostávať i do mliečnych výrobkov. Z pasterizovaného mlieka izolovali enterokoky Fracalanza et al. (2007) alebo Riboldi et al. (2009). Termorezistenciu niektorých druhov enterokokov dokazujú výsledky autorov Batish et al. (2006), ktorí okrem pasterizovaného mlieka izolovali termorezistentné druhy i z odtučneného sušeného mlieka, dojčenských mliečnych produktov, ale i zo sladeného kondenzovaného mlieka. Enterokoky sú stálou súčasťou mikroflóry syrov. Do syrov sa môžu pridávať zámerne vo forme štartovacích kultúr, ale na druhej strane sa môžu vyskytovať v syroch i ako kontaminujúca mikroflóra, ktorá sa dostáva do syra prostredníctvom kontaminovanej suroviny – mlieka alebo sekundárne z prostredia počas výroby syrov (Giraffa, 2002). Enterokoky sa stanovili napr. v syroch Feta (Grécko), Tettila (Španielsko), Caciotta a Fontina (Taliansko), Kaškaval (Bulharsko), Ras a Domiatti (Egypt) (Ducková et al., 2005). Zastúpené sú i v tradičnej slovenskej bryndzi (Belicová et al., 2007, Ducková et al., 2009). V bryndzi sa podieľajú napríklad na zrení a vzniku typických chuťových vlastností a voni bryndze.

Výskyt enterokokov v mliečnych výrobkoch má teda aj pozitívny význam. V niektorých druhoch syrov majú enterokoky významnú úlohu z hľadiska ich zrenia a kvality vďaka ich acidifikačnej, proteolytickej, lipolytickej aktivite a schopnosti utilizovať citrát. Preto, ako už bolo spomenuté, sa využívajú vo forme štartovacích kultúr pri výrobe niektorých priemyselných druhov syrov, u ktorých napomáhajú dosiahnuť typickú chuť a vôňu charakteristickú pre syry vyrábané tradičnými metódami v menších mliekárňach (García et al., 2002, Foulque Moreno et al., 2006).

Positívom niektorých kmeňov enterokokov sú aj ich probiotické vlastnosti. Využíva sa takto napr. kmeň *Enterococcus faecium* M-74 (Mego et al., 2005). V súvislosti s probiotickými účinkami enterokokov sa začala študovať aj ich metabolická vlastnosť - schopnosť produkovať bakteriocíny, resp. enterocíny. Výskumu enterocínov sa venovali napr. Lauková a Ciziková (2001).

Popri pozitívnych vlastnostiach enterokokov však netreba zabúdať aj na ich negatíva. Jedným z negatívnych aspektov výskytu enterokokov v syroch je ich schopnosť produkovať biogénne amíny, napr. tyramín, histidín, tyrozín (Sarantinopoulos et al., 2001, Fernández et al., 2006, Kučerová et al., 2009).

Enterokoky sú známe aj rezistenciou na niektoré antibiotiká. Okrem prirodzenej rezistencie na niektoré antibiotiká je pre enterokoky charakteristická aj ich jedinečná schopnosť výmeny genetického materiálu, čím si dokážu získať rezistenciu voči antibiotikám ako sú aminoglykozidy (gentamicín, streptomycín), glykopeptidy (vankomycín a teikoplanín), tetracyklíny (tetracyklín), makrolidy (erytromycín) a chloramfenikol (Huys et al., 2004). V súvislosti s doteraz uvedeným sa následne objavujú myšlienky, že enterokoky sa vzhľadom na ich prítomnosť v potravinách dostávajú do tráviaceho traktu človeka, kde sa

následne môže uskutočňovať prenos génov rezistencie na antibiotiká aj na prítomné patogénne mikroorganizmy.

Medzi negatíva enterokokov patrí aj schopnosť niektorých kmeňov formovať biofilm (Metzger, 2008, Necedová et al., 2009), pričom je známa skutočnosť, že baktérie viazané v biofilmoch sú rezistentnejšie voči antimikrobiálnym látkam než planktonické bunky. Účinným spôsobom zabránenia tvorby biofilmov a tým aj obmedzenia nežiaducej kontaminácie a šírenia enterokokov je dôsledná sanitácia.

Účinnosť sanitácie ovplyvňuje niekoľko faktorov, medzi ktoré Laktičová et al. (2006) zaraďujú účinnosť dezinfekčného prostriedku (jeho koncentráciu, teplotu, dobu pôsobenia, počet aplikácií), vlastnosti dezinfikovaného prostredia (konzistenciu, prítomnosť organických látok, reakciu prostredia, teplotu prostredia), ale i samotnú odolnosť mikroorganizmov a pod.

Cieľom práce bolo v modelových pokusoch zhodnotiť účinnosť sanitačného prostriedku, bežne používaného v mliekarenskom závode na sanitáciu zvozných cisterien a zásobných tankov pre surové kravské mlieko, na enterokoky izolované zo vzoriek mlieka.

MATERIÁL A METÓDY

Izolácia a identifikácia enterokokov.

Odoberali sa vzorky surového kravského mlieka (bazénové, cisternové a zo zásobných tankov). Enterokoky sa stanovovali na živnom médiu Slanetz – Bartley (HiMedia Laboratories, India), pri teplote $37 \pm 1^\circ\text{C}$, po 48 ± 2 hodinách (STN 56 0100, 1970). Príslušnosť k rodu *Enterococcus* sa potvrdila rastom izolovaných kmeňov na selektívnom žlč-eskulin-azidovom médiu (Biokar Diagnostic, Francúzsko) po 24 hodinách kultivácie pri $37 \pm 1^\circ\text{C}$, príslušnosťou ku G^+ baktériám, negatívnym katalázovým a pozitívnym PYRA – testom (Lachema, Česká republika). Potvrdené kmene sa druhovo identifikovali pomocou komerčného EN-COCCUS testu (Lachema, Česká republika). Zástupcovia druhu *Enterococcus faecalis* sa potvrdili i PCR metódou postupom uvedeným v práci Fabianová et al. (2010).

Izolácia a identifikácia psychrotrofnej baktérie.

Psychrotrofné baktérie sa stanovili na GTK agare (HiMedia Laboratories, India) s prídavkom sušeného odstredeného mlieka, pri teplote $6,5 \pm 1^\circ\text{C}$ po 10 dňoch kultivácie (STN ISO 6730, 2000). Základné rozdelenie psychrotrofných baktérií do skupín G^+ a G^- a oxidázová skúška sa vykonali postupom podľa Betinu et al. (1988) a komerčným OXItestom (Lachema, Česká republika). Rodová a druhová identifikácia sa robila pomocou komerčného NEFERMtestu 24 (Lachema, Česká republika).

Hodnotenie citlivosti k antibiotikám.

U identifikovaných kmeňov rodu *Enterococcus* sa hodnotila citlivosť k antibiotikám diskovou difúznou metódou na Mueller Hinton agare (HiMedia Laboratories, India) použitím antibiotických diskov s koncentráciou – Ampicillin 10 mcg/disk, Erythromycin 15 mcg/disk, Gentamicin 10 mcg/disk, Tetracycline 30 mcg/disk, Teicoplanin 30 mcg/disk a Vancomycin 30 mcg/disk (HiMedia Laboratories, India). Zaradenie jednotlivých kmeňov medzi rezistentné, stredne

rezistentné a citlivé sa uskutočnilo podľa kritérií CLSI (1999).

Testovanie schopnosti enterokokov prežívať proces sanitácie za rôznych modelových podmienok

Príprava bakteriálnej suspenzie

Pre modelové pokusy sa použilo 6 náhodne vybraných identifikovaných kmeňov enterokokov. Z 24 hodinových bakteriálnych kultúr vyrastených na GTK agare (HiMedia Laboratories, India) pri $37 \pm 1^\circ\text{C}$ sa vo fyziologickom roztoku pripravila suspenzia zodpovedajúca $0,5^\circ$ McFarlandovej zákalovej stupnice. Intenzita zákalu sa hodnotila prístrojom Densi-la-meter. Mikrobiálna suspenzia sa následne zriedila a získala sa pracovná suspenzia baktérií obsahujúca rádovo 10^6 KJTJ.ml⁻¹, ktorá sa použila pre modelové pokusy. Presný počet enterokokov sa stanovil zriedovacou kultivačnou metódou na žlč-eskulin-azidovom agare (Biokar Diagnostic, Francúzsko) pri $37 \pm 1^\circ\text{C}$ po 24 hodinách.

Príprava sanitačných roztokov

Hodnotil sa účinok sanitačného prostriedku používaného v mliekarenskom závode na sanitáciu zvozných cisterien a zásobných tankov. Sanitačný prostriedok obsahoval kyselinu dusičnú, kyselinu fosforečnú a hexametyléndiamín. Sanitačné roztoky sa pripravili z destilovanej vody (tvrdosť vody 0°) a z destilovanej vody, do ktorej sa pridalo 15 mg, 30 mg a 45 mg CaCO₃ na 100 ml vody, čo zodpovedá tvrdosti vody 15° , 30° a 45° . Testovali sa sanitačné roztoky s koncentráciou 0,75 %, pri teplote 30°C , 40°C a 60°C . Doba pôsobenia bola 20 minút.

Pracovný postup

K čerstvo pripraveným a vytemperovaným sanitačným roztokom s rôznou tvrdosťou sa pridalo polotučné mlieko (organická záťaž) a pripravená pracovná suspenzia enterokokov. Tým sa získali roztoky s výslednou koncentráciou 0,75 %, koncentráciou mlieka 0,1 % a počtom enterokokov cca 10^5 buniek ml⁻¹. Po premiešaní sa nechali skúmavky vo vodnom kúpeli pri príslušnej teplote stanovenú dobu 20 minút. Počiatočný počet enterokokov ako aj počet enterokokov prežívajúcich pôsobenie sanitačného roztoku sa následne stanovil kultiváciou na žlč-eskulin-azidovom agare (Biokar Diagnostic, Francúzsko) pri $37 \pm 1^\circ\text{C}$ po 24 hodinách.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kmene enterokokov sa získali z rôznych typov vzoriek mlieka. Ich pôvod je uvedený v tabuľke 1. Suspektné kolónie enterokokov sa po izolácii identifikovali biochemickými testami. Ako vidieť z tabuľky 1, v surovom kravskom mlieku sa nachádzali druhy – *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. mundtii* a *E. casseliflavus*. Uvedené druhy rodu *Enterococcus*, ktoré sa vybrali aj pre modelové pokusy sú pre mlieko najtypickejšie. Potvrdzujú to i výsledky iných autorov (Citak et al., 2005, Peterson-Wolfe et al., 2008).

Najčastejšie izolovaným druhom bol *E. faecalis*. Práve z toho dôvodu sa testovali v modelových pokusoch 3 rôzne kmene tohto druhu. Zástupcovia druhu *E. faecalis* sa okrem biochemických testov potvrdili aj PCR metódou. Po identifikácii sa u izolovaných kmeňov stanovovala rezistencia na vybrané antibiotiká. Profil antibiotickej rezistencie jednotlivých kmeňov uvádza tabuľka 1. Rezistentné na antibiotiká boli predovšetkým kmene *E. faecalis*. Išlo o rezistenciu na ampicilín, gentamicín, tetracyklín a teikoplanín. Fracalanza et al. (2007)

u enterokokov izolovaných z pasterizovaného mlieka stanovili rezistenciu na ampicilín, chloramfenikol, erytromycín, gentamicín, imipeném, penicilín, nitrofurantoin, norfloxacin, streptomycín a tetracyklín. **Gomes et al. (2008)** v súlade s našimi výsledkami, pri hodnotení enterokokov brazílskych syrov zistili väčšiu rezistenciu na antibiotiká u izolátov druhu *E. faecalis* v porovnaní s druhom *E. faecium*.

Tabuľka 1 Profil antibiotickej rezistencie u kmeňov enterokokov izolovaných z rôznych typov vzoriek mlieka

Kmeň	Pôvod mlieka	Rezistencia					
		A	E	G	T	T e	V
83 <i>E. faecium</i>	Cisternová vzorka	S	C	C	C	C	C
93 <i>E. mundtii</i>	Cisternová vzorka	S	C	C	C	C	C
98 <i>E. casseliflavus</i>	Bazénová vzorka	S	C	C	C	C	C
111 <i>E. faecalis</i>	Zásobný tank	S	S	S	S	R	S
100 <i>E. faecalis</i>	Bazénová vzorka	R	C	R	S	C	C
53 <i>E. faecalis</i>	Zásobný tank	S	C	C	R	C	C

Priemer inhibičnej zóny v mm

- A- Ampicilín 10 mcg/disk, R ≤ 18 mm, S 19-25 mm
- E- Erytromycín 15 mcg/disk, S 16-20 mm, C ≥ 21 mm
- G- Gentamicín 10 mcg/disk, R ≤ 12 mm, S 13-14 mm, C ≥ 15 mm
- T- Tetracyklín 30 mcg/disk, R ≤ 18 mm, S 19-22 mm, C ≥ 23 mm
- Te- Teikoplanin 30 mcg/disk, R ≤ 10 mm, C ≥ 14 mm
- V- Vankomycín 30 mcg/disk, C ≥ 17 mm

Genetickú spojitosť medzi rezistenciou na antibiotiká a rezistenciou na dezinfekčné prostriedky, konkrétne kvartérne amóniové zlúčeniny, u stafylokokov izolovaných z potravín potvrdili **Langsrud et al. (2003)**.

Enterokoky patria k mikroorganizmom, ktoré sú schopné prežívať a adaptovať sa na extrémne podmienky prostredia. Práve z uvedených dôvodov sa *in vitro* hodnotilo i pôsobenie sanitачného roztoku, za spolupôsobenia rôznych faktorov ovplyvňujúcich účinnosť sanitácie. Hodnotil sa sanitачný prostriedok bežne používaný v mliekarenskom závode, z ktorého pochádzali aj vzorky mlieka. Výrobca ho odporúča používať ako 0,7 až 1,5 % roztok s teplotou 60 až 70 °C a dobou pôsobenia 20 minút.

V rámci modelovania podmienok sanitácie, a v snahe čo najviac sa priblížiť podmienkam praxe, sa testoval vplyv teploty sanitачného roztoku (30, 40 a 60 °C), vplyv prítomnosti organickej záťaže ako dôsledok nedostatočného čistenia (prídavok mlieka 0,1 %) a vplyv rôznej tvrdosti vody (0°, 15°, 30° a 45°). Nižšie teploty 30 °C a 40 °C sa zvolili zámerne, keďže v praxi sa hlavne z ekonomických dôvodov častokrát používajú sanitачné roztoky s nižšou teplotou. Výsledky

hodnotenia účinnosti sanitачného roztoku na vybrané kmene enterokokov uvádza tabuľka 2.

Ako vyplýva z tabuľky 2, pri dodržaní podmienok sanitácie, ktoré odporúča výrobca, bol sanitачný roztok dostatočne účinný a pôsobil letálne na všetky testované kmene mikroorganizmov. Išlo o populáciu enterokokov rádovo 10⁵ KTJ v 1 ml. V surovom kravskom mlieku sa populácia enterokokov podľa **Görnera a Valíka (2004)** pohybuje v rámci intervalu 10 000 až 50 000 KTJ.ml⁻¹ a **Kučerová et al. (2009)** stanovili 1 000 až 100 000 KTJ.ml⁻¹.

Účinnosť voči testovaným kmeňom mikroorganizmov mal sanitачný roztok aj pri teplotách 40 °C a 30 °C a v prostredí organickej a anorganickej záťaže. Výnimku predstavoval jedine kmeň *E. faecalis* (53), ktorý prežil podmienky sanitácie v prípade, že sanitачný roztok sa pripravil z vody s tvrdosťou 45 °, v prostredí sa nachádzala organická záťaž vo forme 0,1 % prídavku mlieka a teplota roztoku bola iba 30 °C. Počty enterokokov sa v tomto prípade redukovali z pôvodných 6,5 x 10⁵ na 3,1 x 10¹ KTJ.ml⁻¹.

Autori **Salo et al. (2006)** pokladajú teplotu CIP čistenia za veľmi významný faktor, pretože ako vyplýva z ich výsledkov, problémy pri inaktivácii mikroorganizmov sa vyskytli, keď teplota klesla pod 50 °C. Rovnako i **Feldmann et al. (2006)** zistili, že pokles teploty oplachovej vody pod 42 °C viedol k zvýšeniu kontaminácie koliformnými baktériami a *Pseudomonas* spp. Vplyv teploty na účinnosť sanitácie potvrdzujú i výsledky **Canigovej et al. (2004)**, ktorí zároveň zdôrazňujú, že na účinnosť sanitácie má obzvlášť veľký vplyv organická záťaž v sanitovanom prostredí a môže umožniť mikroorganizmom prežívať podmienky aplikácie sanitачného roztoku.

V rámci modelových pokusov sa začala testovať i účinnosť sanitачného roztoku na kombináciu - enterokok a psychrotrofná baktéria (*Pseudomonas aeruginosa*). V praxi totiž sanitачné roztoky nepôsobia na jednodruhové kultúry, ale na celú paletu rôznych mikroorganizmov. Predpokladáme, že medzi jednotlivými rodmi resp. aj druhmi mikroorganizmov môžu existovať rôzne vzájomné vzťahy, ktoré môžu ovplyvniť prežívanie mikroorganizmov po aplikácii sanitачného roztoku. V modelových pokusoch sanitачný roztok pôsobil letálne aj na kombináciu *E. faecalis* (100) a *Pseudomonas aeruginosa*, za všetkých testovaných podmienok. Testovanie psychrotrofnej baktérie sa zvolilo z dôvodu, že *Pseudomonas* spp. sa často izoluje z povrchu mliekarenských zariadení a je zároveň významnou baktériou spôsobujúcou kazenie potravín (**Wirtanen et al., 2000**). Jeho prežívanie sa vysvetľuje schopnosťou formovať biofilm (**Hood a Zottola, 1997, Simões et al., 2008**) a odolnosťou voči dezinfekčným prostriedkom (**Russell a Chopra, 1996**).

ZÁVER

Záverom možno konštatovať, že testovaný sanitачný prostriedok bol dostatočne účinný na testované mikroorganizmy aj v podmienkach výrazne zníženej teploty sanitачného roztoku (zo 60 °C na 30 °C) a za prítomnosti organickej i anorganickej záťaže. Napriek tomu sa odporúča v praxi nepodceňovať a dôsledne dodržiavať všetky faktory sanitácie.

LITERATÚRA

- BATISH, V. K., CHANDER, H., RANGANATHAN, B. 2006. Heat resistance and other characteristics of deoxyribonuclease positive Enterococci isolated from milk and milk products. In *Journal of Food Science*, vol. 50, 2006, no. 3, pp. 834 – 835.
- BELICOVÁ, A., KRIŽKOVÁ, L., KRAJČOVIČ, J., JURKOVIČ, D., SOJKA, M., EBRINGER, L., DUŠINSKÝ, R. 2007. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus* species isolated from Slovak bryndza cheese. In *Folia Microbiologica*, vol. 52, 2007, no. 2, pp. 115 – 119.
- BETINA, V., BARÁTHOVÁ, H., FARGAŠOVÁ, A., FRANK, V., HORÁKOVÁ, K., ŠTURDÍK, E. 1988. Mikrobiologické laboratórne metódy. Bratislava: Alfa, 1988. 536 s.
- CITAK, S., YUCEL, N., MENDI, A. 2005. Antibiotic resistance of enterococcal isolates in raw milk. In *Journal of Food Processing and Preservation*, vol. 29, 2005, pp. 183 – 195.
- CLSI. 1999. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard M31-A. Wayne Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- ČANIGOVÁ, M., HEGEDŮSOVÁ, A., DUCKOVÁ, V. 2004. Testing the effect of sanitary detergents on psychrotrophic bacteria isolated from milk. In *Hungarian Veterinary Journal*, vol. 126, 2004, no. 12, pp. 761- 764.
- DUCKOVÁ, V., ČANIGOVÁ, M., KROČKO, M. 2005. Enterokoky izolované z bryndze a ich rezistencia na antibiotiká. In *Zborník z medzinárodnej konferencie "Rizikové faktory potravinového reťazca"*, Nitra: SPU, 2005, pp. 233 – 237, ISBN 80 – 8069 – 760 – 4.
- 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, pp. 70 – 74.
- FABIANOVÁ, J., DUCKOVÁ, V., ČANIGOVÁ, M., KROČKO, M. 2010. Výskyt enterokokov v kravskom mlieku a ich rezistencia na antibiotiká. In *Potravinárstvo*, vol. 4, 2010, no. 2, pp. 17-21.
- FELDMANN, M., ZIMMERMANN, A., HOEDEMAKER, 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, pp. 274 – 281.
- FERNÁNDEZ, M., LINARES, D. M., RODRÍGUEZ, A., ALVAREZ, M. A. 2006. Factors affecting tyramine production in *Enterococcus durans* IPLA 655. In *Applied Microbiology and Technology*, vol. 73, 2006, no. 6. pp. 1400 – 1406.
- FOULQUIE 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, pp. 1 – 24.
- FRACALANZZA, S. A. P., SCHEIDEGGER, E. M. D., DOS SANTOS, P. F., LEITE, P. C., TEIXEIRA, L. M. 2007. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat nad pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. In *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, vol. 102, 2007, no. 7, pp. 853 – 859.
- 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, pp. 668 – 675.
- GARCÍA, M. C., RODRÍGUEZ, M. J., BERNARDO, A. 2002. Study of enterococci and micrococci isolated throughout manufacture and ripening of San Simón cheese. In *Microbiology*, vol. 19, 2002, pp. 23 – 33.
- GIRAFFA, G. 2002. Enterococci from foods. In *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 26, 2002, no. 2, pp. 163 – 171.
- GOMES, B. C., ESTEVES, C. T., PALAZZO, I. C. V., DARINI, A. L. C., FELIS, G. E., CECHI, L. A., GÖRNER, F., VALÍK, E. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava: Malé centrum, 2004. 528. s. ISBN 80 – 967064 – 9 – 7.
- GREIFOVÁ, M., GREIF, G., LEŠKOVÁ, E., MÉRIOVÁ, K. 2003. Enterokoky – ich hodnotenie v mliekarenskej technológii. In *Mliekarstvo*, vol. 34, 2003, no. 4, pp. 42 - 44.
- HOOD, S., ZOTTOLA, E. 1997. Isolation and identification of adherent Gram-negative microorganisms from four meat processing facilities. In *Journal of Food Protection*, vol. 60, pp. 1135 – 1138.
- HUYS, G., D'HAENE, K., COLLARD, J. M., SWINGS, J. 2004. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance of *Enterococcus* isolates from food. In *Applied Environmental Microbiology*, vol. 70, 2004, NO. 3, pp. 1555 – 1562.
- KUČEROVÁ, K., SVOBODOVÁ, H., TŮMA, Š., ONDRÁČKOVÁ, I., PLOCKOVÁ, M. 2009. Production of Biogenic Amines by Enterococci. In *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 27, 2009, special issue 2, pp. 50-55.
- LAKTÍČOVÁ, K., ONDRAŠOVIČ, M., ONDRAŠOVIČOVÁ, M., SASÁKOVÁ, N., VARGOVÁ, M., ŠMIRJÁKOVÁ, M., JURIS, P. 2006. Čistenie a dezinfekcia v potravinárskom priemysle. In *Slovenský veterinársky časopis*, vol. 31, 2006, pp. 150 – 152.
- LANGSRUD, S., SIDHU, M. S., HEIR, E., HOLCK, A. L. 2003. Bacterial disinfectant resistance – a challenge for food industry. In *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 51, 2003, pp. 283 – 290.
- LAUKOVÁ, A., CZIKKOVÁ, S. 2001. Antagonistic effect of enterocin CCM 4231 from *Enterococcus faecium* on „bryndza“, a traditional Slovak dairy product from sheep milk. In *Microbiological Research*, vol. 156, 2001, no. 1, pp. 31 - 34.
- MEGO, M., MÁJEK, J., KONČEKOVÁ, R. EBRINGER, L., CIERNIKOVÁ, S., RAUKO, P., KOVAC, M., TRUPL, J., SLEZÁK, P., ZAJAC, V. 2005. Intramucosal bacteria in colon cancer and their elimination by probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 with organic selenium. In *Folia Microbiologica*, vol. 50, 2005, no. 5, pp. 443 – 447.
- 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.
- NECIDOVÁ, L., JANTOŠOVÁ, B., KARPÍŠKOVÁ, S., CUPÁKOVÁ, Š., DUŠKOVÁ, M., KARPÍŠKOVÁ, R. 2009. Importance of *Enterococcus* spp. for forming a biofilm. In *Czech Journal of Food Sciences*, vol. 27, 2009, no. 2, pp. 354 - 356.

PETERSSON-WOLFE, C. S., ADAMS, S., WOLF, A. L., HOGAN, J. S. 2008. Genomic Typing of Enterococci Isolated from Bovine Mammary Glands and Environmental Sources. In *Journal of Dairy Science*, vol. 91, 2008, pp. 615 – 619.

RIBOLDI, G. P., FRAZZON, J., D'AZEVEDO, P. A., FRAZZON, A. P. G. 2009. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. In *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 40, 2009, pp. 125 – 128.

RUSSELL, A., CHOPRA, I. 1996. *Understanding Antibacterial Action and Resistance*, 2nd Edition. Ellis Horwood, London.

SALO, S., EHAVALD, H., RAASHA, L., VOKK, R., WIRTANEN, G. 2006. Microbial surveys in Estonian dairies. In *LWT*, vol. 39, 2006, pp. 460 – 471.

SARANTINOPOULOS, P., ANDRIGHETTO, C., GEORGALAKI, M. D., REA, M. C., LOMBARDI, A., COGAN, T. M., KALANTZOPOULOS, G., TSAKALIDOU, E. 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. In *International Dairy Journal*, vol. 11, 2001, no. 8, pp. 621 – 647.

SIMÕES, M., SIMÕES, L. C., VIEIRA, M. J. 2008. Physiology and behavior of *Pseudomonas fluorescens* single and dual strain biofilms under diverse hydrodynamic stresses. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 128, 2008, pp. 309 – 316.

STN 56 0100: 1970. Mikrobiologické skúšanie potravín, predmetov bežnej spotreby a prostredia potravinárskych prevádzok. Bratislava: ÚNMS, 1970. 239 p.

STN ISO 6730: 2000. Mlieko. Stanovenie počtu jednotiek tvoriacich kolónie psychrotrofných mikroorganizmov. Technika počítania kolónii vykultivovaných pri 6,5 °C. Bratislava: SÚTN, 2000. 14 s.

WIRTANEN, G., SAARELA, M., MATTILA-SANDHOLM, T. 2000. Biofilms – impact of hygiene in food industries. In Bryers, J. (Ed.), *Biofilms II: Process Analysis and Applications*. Wiley-Liss, New York.

PodĎakovanie.

Práca sa riešila v rámci projektu VEGA 1/0410/09

Kontaktná adresa:

Ing. Jana Fabianová, Levické mliekarne a. s., Júrska cesta 2, 934 01 Levice, jfabianova@levmilk.sk

Ing. Viera Ducková, PhD., Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovensko, viera.duckova@uniag.sk

Doc. Ing. Margita Čanigová, CSc., Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovensko, margita.canigova@uniag.sk

Ing. Miroslav Kročko, PhD., Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovensko, mirokrocko@yahoo.com

Ing. Michal Gábor, PhD., Katedra genetiky a plemenárskej biológie, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 01 Nitra, Slovensko, Michal.Gabor@uniag.sk

Tabuľka 2 Hodnotenie účinku sanitáčného roztoku (koncentrácia 0,75 %, teplota 30 °C, 40 °C a 60 °C, doba pôsobenia 20 minút) v prostredí organickej (0,1 % mlieka) a anorganickej záťaže (tvrdosť použitej vody 0°, 15°, 30° a 45°) na kmene enterokokov izolovaných z mlieka.

Kmeň	Počiatočný počet (KTJ.ml ⁻¹)	Počty enterokokov (KTJ.ml ⁻¹) po aplikácii sanitáčného roztoku pri uvedenej teplote a tvrdosti požitej vody											
		30 °C				40 °C				60 °C			
		0°	15°	30°	45°	0°	15°	30°	45°	0°	15°	30°	45°
83 <i>E. faecium</i>	1,53 x10 ⁶	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
93 <i>E. mundtii</i>	5,7x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
98 <i>E. casseliflavus</i>	7,6 x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
111 <i>E. faecalis</i>	5,3 x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
100 <i>E. faecalis</i>	3,9 x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
53 <i>E. faecalis</i>	5,8 x10 ⁵	0	0	0	3,1x10 ¹	0	0	0	0	0	0	0	0
100 <i>E. faecalis</i> + <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3,9 x10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1,2 x10 ⁷	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0