

Testovanie mikrobicídnej účinnosti alkalického sanitačného prostriedku na psychrotrofné baktérie

MARGITA ČANIGOVÁ - VIERA DUCKOVÁ

SÚHRN. V práci sa testovala účinnosť alkalického sanitačného prostriedku na psychrotrofné baktérie izolované z mlieka. Pri dodržaní podmienok aplikácie prostriedku (0,7%-ný roztok, teplota roztoku 65 °C, doba pôsobenia 10 minút) sa usmrtenie baktérií zistilo v prostredí bez organických nečistôt, ako aj s ich prítomnosťou. Zníženie teploty sanitačného roztoku na 40 °C sa prejavilo prežívaním psychrotrofných baktérií v prostredí s organickými nečistotami (pri koncentrácii vyššej ako 0,6 g na 100 ml).

Kľúčové slová: mikrobicídna účinnosť; alkalický sanitačný prostriedok; psychrotrofné baktérie

Mlieko je cenný prírodný produkt pre ľudskú výživu, ale vďaka svojmu zloženiu je aj ideálnou živnou pôdou pre mnohé mikroorganizmy. Nároky na mikrobiologickú kvalitu mlieka a na čistotu zariadení používaných pri jeho získavaní a spracovaní sú preto vysoké.

Súčasný stav v prvovýrobe mlieka v podmienkach Slovenskej republiky je charakteristický uplatňovaním prevažne veľkovýrobných technológií, čím výrazne stúpajú hygienické požiadavky na čistotu dojníc, hygienu prostredia, v ktorom sa mlieko získava, na zdravotný stav dojníc, na hygienu dojenja a v neposlednom rade na úroveň čistenia a dezinfekcie dojacej a chladiacej techniky. Konečný efekt sanitácie, ktorú predstavuje čistenie a dezinfekcia, ovplyvňuje niekoľko fyzikálnych a chemických faktorov, ako sú teplota, koncentrácia, doba pôsobenia sanitačnej látky, druh, zloženie a vlastnosti sanitačného prostriedku, denzita a zastúpenie mikroorganizmov, ako aj vlastnosti a stav asanovaného povrchu a ďalšie [1, 2].

Účinnosť vykonaných sanitačných prác sa prejaví na kvalitatívnom a kvantitatívnom zastúpení mikroorganizmov na sanítovaných plochách

Ing. Margita ČANIGOVÁ, CSc., Ing. Viera DUCKOVÁ, Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita, ul. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra.

Korešpondujúci autor: Ing. Margita ČANIGOVÁ, CSc., e-mail: margita.canigova@uniag.sk

a teda v konečnom dôsledku aj v mlieku. Väčšina kontaminujúcich mikroorganizmov sa následným tepelným ošetrením mlieka ničí. Avšak pre ďalšie technologické spracovanie a kvalitu vyrobených mliečnych výrobkov je nežiaduca prítomnosť mikroorganizmov s lytickými vlastnosťami, predovšetkým v smere proteolýzy a lipolýzy. Jednou z takýchto skupín mikroorganizmov sú psychrotrofné mikroorganizmy. Tieto sú nežiaduce najmä z dôvodu produkcie extracelulárnych, značne termorezistentných enzýmov, schopných rozkladať základné zložky mlieka, najmä mliečny tuk a proteíny [3].

Lipázy psychrotrofných baktérií väčšinou odštiepujú masné kyseliny z 1. a 3. polohy v triacylglyceroloch. Uvoľnené masné kyseliny sú príčinou vzniku rôznych chýb chuti mliečnych výrobkov ako horká, mydlovitá, stuchnutá a ďalšie. Najväčšie senzorické problémy vznikajú pri uvoľnení kyselín s nízkym počtom uhlíkov, teda C_4 až C_{12} [3].

Proteinázy prednostne atakujú χ -kazeín za tvorby para- χ -kazeínu. To má za následok destabilizáciu kazeínových micel a následne koaguláciu mlieka. Z ďalších frakcií kazeínu sa štiepia β -kazeín a α_{s1} -kazeín. Pri tomto štiepení sa môžu tvoriť peptidy až aminokyseliny, čím je možné vysvetliť horknutie mlieka [4, 5].

Psychrotrofné mikroorganizmy patria k ubikvitným mikroorganizmom, čo znamená, že sa nachádzajú všade, vo vode, pôde, na rastlinách. Do surového mlieka sa dostávajú buď z vyššie uvedených zdrojov alebo z dojacieho zariadenia. Predovšetkým mliečne potrubie, ventily a gumové nástavce sú hlavným zdrojom ich kontaminácie. Až 90%-nú kontamináciu spôsobujú zle sanitované dojacie a chladiace zariadenia [6].

Dôležitým faktorom podieľajúcim sa na kontaminácii mlieka psychrotrofnou mikroflórou je aj schopnosť najmä zástupcov gramnegatívnych baktérií priľnúť k povrchu zariadení, čo zrejme súvisí so špecifickou stavbou ich bunkových stien a zvýšenou priľnavosťou týchto baktérií k povrchu zariadení, ako aj selektívnou povahou čistiacich a dezinfekčných prostriedkov [7].

Cieľom práce bolo v modelových pokusoch otestovať účinnosť alkalického sanitačného prostriedku za rôznych aplikačných podmienok na psychrotrofné baktérie pôvodne izolované zo surového kravského mlieka. Výsledky majú prispieť k poznatkom o citlivosti psychrotrofných mikroorganizmov na sanitačný prostriedok používaný v podmienkach našej prvovýroby mlieka.

Materiál a metódy

Testovaný sanitačný prostriedok je prostriedok bežne aplikovaný pri sanitácii zariadení používaných v prvovýrobe mlieka. Je to kombinovaný alkalick-

ký čistiaci (účinné zložky NaOH a KOH) a dezinfekčný (účinná zložka chlórnan sodný) prostriedok.

Odporúča sa používať ho vo forme 0,5 až 1%-ného vodného roztoku (v závislosti od tvrdosti vody) pri teplote 50–65 °C s dobou cirkulácie 15 až 10 min. Prostriedok sa testoval vo forme 0,7%-ného vodného roztoku (index alkality 66, obsah aktívneho chlóru 231 mg v 1 l) v prostredí bez prítomnosti a s prítomnosťou organických nečistôt s rastúcim obsahom (vo forme prídavku živného bujónu č. 2). Vzhľadom na to, že v prvovýrobe mlieka pri sanitácii zariadení sú najčastejšie problémy s dodržiavaním teploty sanitačných roztokov, v jednej sérii pokusov sa pracovalo s roztokmi teplými 65 °C a v druhej sérii 40 °C, pričom sa roztoky nechali pôsobiť 10 minút.

Ako testovacie mikroorganizmy sa použili psychrotrofné baktérie. Tieto mikroorganizmy sa vybrali z už vyššie uvedených dôvodov, ale aj preto, že to nie sú bežné testovacie mikroorganizmy pri zisťovaní mikrobicídnej účinnosti sanitačných prostriedkov. Mikroorganizmy sa pôvodne izolovali z bazénových vzoriek surového kravského mlieka. Izolované baktérie sa identifikovali ako G⁻ baktérie z čeľade *Pseudomonadaceae* a z čeľade *Enterobacteriaceae* [8]. V pokusoch sa používala suspenzia príslušnej baktérie v živnom bujóne č. 2 (Imuna, Šarišské Michaľany) s hustotou približne 10⁷ buniek v 1 ml. Suspenzia sa pripravila z kultúry vyrastenej za 24 h pri teplote 22 °C na živnom agare č. 2 (Imuna, Šarišské Michaľany) prenesením jednej bakteriologickej kľučky do 10 ml živného bujónu č. 2 a inkubáciou 5 h pri 22 °C.

Účinnosť sanitačného prostriedku sa zisťovala štandardnou suspenznou metódou podľa Kneiflovej [9] v troch opakovaníach.

Súčasne sa okrem vykonaných modelových pokusov analyzovali aj vzorky oplachových vôd. Tieto sa odobrali z poľnohospodárskeho podniku po sanitácii dojacieho systému prostriedkom, ktorý sa testoval (používaný ako 0,7%-ný roztok, doba cirkulácie 20 minút). Vo vzorkách vody sa sledovali celkové počty mikroorganizmov [10], psychrotrofné baktérie [11] a kolidiformné baktérie [12].

Výsledky a diskusia

Výsledný efekt sanitácie predstavuje súhrnné pôsobenie viacerých činiteľov okrem iných aj množstva použitého prípravku, teploty a doby pôsobenia sanitačného roztoku a prítomnosti nečistôt. Z výsledkov uvedených v tab. 1 vyplýva, že po aplikácii testovaného prostriedku v podmienkach určených jeho výrobcem, tak v dokonale čistom prostredí, ako aj v prostredí s nečistotami proteínového charakteru, sa nezistil rast testovaných psychrotrofných

TAB. 1. Mikrobicídna účinnosť testovaného alkalického sanitačného prostriedku (0,7%-ný roztok, teplota 65 °C, doba pôsobenia 10 min) na psychrotrofné baktérie.

TAB. 1. Microbicidal efficiency of the alkalic sanitation agent (concentration 0.7 %, temperature 65 °C, application time 10 min) to psychrotrophic bacteria.

Testovaná baktéria ¹	Roztok s organickou záťažou ² [g / 100 ml]								
	0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	1,8	2,1	2,5
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> A	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas fluorescens</i> B	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas fluorescens</i> C	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas fluorescens</i> D	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Alcaligenes faecalis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> B	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Enterobacter aerogenes</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Yersinia enterocolitica</i> A	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Yersinia enterocolitica</i> B	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Escherichia coli</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Klebsiella</i> sp.	–	–	–	–	–	–	–	–	–

A, B, C, D - označujú rôzny pôvod kmeňov. – mikroorganizmus nerástol.

A, B, C, D - designate various origins of microbial strains. – no microbial growth. 1 - tested bacterium, 2 - solution with an organic load.

baktérií. Najčastejšie sa testoval druh *Pseudomonas fluorescens*, pretože to je najčastejšie izolovaný druh psychrotrofnej baktérie z mlieka [13, 14]. Použitie kmene *Pseudomonas fluorescens* sa izolovali z bazénových vzoriek mlieka rôznych producentov (v tab. 1 sú rozlíšené indexmi). 100%-ný baktericídny účinok prostriedku sa zistil aj na *Pseudomonas aeruginosa*, ktorý sa vyznačuje zvýšenou odolnosťou až rezistenciou na niektoré typy dezinfekčných prostriedkov [15, 16]. Mikrobicídny účinok na testované psychrotrofné mikroorganizmy sa dosiahol zrejme použitou vysokou teplotou roztoku. Vyššia teplota dezinfekčného roztoku v procese sanitácie podporuje síce dosiahnutie výborného dekontaminačného efektu, ale na druhej strane má i nežiaduce účinky, napr. poškodzovanie sanitovaných materiálov [17], denaturáciu proteínov spojenú s ich fixáciou k čistenému povrchu a tvorbou biofilmu.

Bežným javom v podmienkach našej prvovýroby je používanie sanitačných roztokov s nižšou teplotou najmä z ekonomických dôvodov. Pokles teploty sanitačných roztokov sa zisťuje aj pri sanitácii v zimnom období a pri veľkých cirkulačných okruhoch. Napr. FOLTYS [18] zistil, že teplota sanitačných roztokov na farmách pri vypúšťaní kolísala medzi 20–55 °C, pričom až u 80 % fariem sa zistila teplota roztokov nižšia ako 40 °C. Práve tieto farmy produkovali mlieko nízkej mikrobiologickej kvality.

Zníženie teploty aplikovaných sanitačných roztokov môže viesť k prežívaniu mikroflóry prítomnej na sanitovaných plochách. Dokazujú to aj nami získané výsledky. Znížením teploty roztoku testovaného prostriedku na 40 °C sa rast testovaných mikroorganizmov inhiboval len v prostredí bez organických nečistôt, resp. s ich koncentráciou do 0,6 g v 100 ml - tab. 2. Postupným zvyšovaním koncentrácie organických látok proteínovej povahy v prostredí sa zvyšovalo percento prežívajúcich mikroorganizmov. V prostredí s obsahom 1,5 g organických nečistôt v 100 ml sa zistilo, že prežívajú všetky testované mikroorganizmy. Väčšia odolnosť voči pôsobeniu testovaného roztoku za daných aplikačných podmienok sa zistila u baktérií z čeľade *Enterobacteriaceae* - obr. 1.

Výsledky modelových pokusov s testovaním sanitačného roztoku pri nižších teplotách sa potvrdili aj analyzovaním vzoriek oplachových vôd. Vzorky sa odoberali na mliečnej farme, kde sa tento prostriedok používal a kde sa nedodržiavala odporúčaná teplota sanitačného roztoku (pri vypúšťaní kolísala teplota od 25 °C do 40 °C) - tab. 3.

Je pritom zaujímavé, že sa v oplachových vodách nezistila prítomnosť koliformných baktérií, ktoré sa pokladajú za indikátor sanitácie, avšak počty psychrotrofnej mikroflóry z celkových počtov mikroorganizmov predstavovali priemerne 62,6 %.

Prežitie mikroorganizmov v prostredí s nečistotami pri nižších teplotách sanitačných roztokov súvisí zrejme s ochranným pôsobením nečistôt na mikroorganizmy a nedostatočným vplyvom nižšej teploty.

Je známe, že nečistoty sťažujú prenikanie dezinfekčných roztokov k mikroorganizmom, prípadne sa na ne viažu, alebo s nimi reagujú [19].

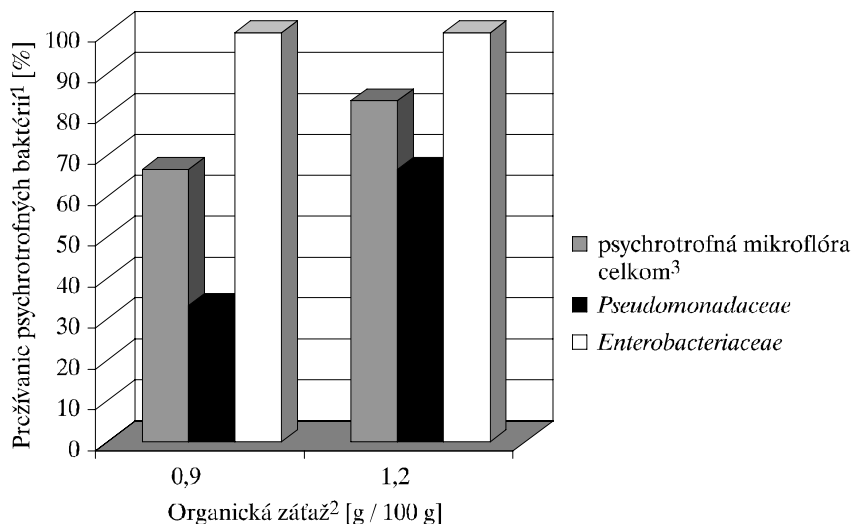
TAB. 2. Mikrobicídna účinnosť testovaného alkalického sanitačného prostriedku (0,7%-ný roztok, teplota 40 °C, pôsobenie 10 min) na psychrotrofné baktérie.

TAB. 2. Microbicidal efficiency of the alkaline sanitation agent (concentration 0.7 %, temperature 40 °C, application time 10 min) to psychrotrophic bacteria.

Testovaná baktéria ¹	Roztok s organickou záťažou ² [g / 100 ml]								
	0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	1,8	2,1	2,5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	–	–	–	–	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	–	–	–	–	–	+	+	+	+
<i>Alcaligenes faecalis</i>	–	–	–	+	+	+	+	+	+
<i>Yersinia enterocolitica</i>	–	–	–	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	–	–	–	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella</i> sp.	–	–	–	+	+	+	+	+	+

+ mikroorganizmus rástol, – mikroorganizmus nerástol.

+ microbial growth, – no microbial growth. 1 - tested bacterium, 2 - solution with an organic load.



OBR. 1. Percento prežívajúcich skupín psychrotrofných baktérií po pôsobení 0,7%-ného alkalického sanitačného roztoku s teplotou 40 °C.

FIG. 1. Percentual amount of surviving groups of psychrotrophic bacteria after the application of the alkaline sanitation agent solution at a concentration of 0.7 % and at a temperature of 40 °C.

1 - % of psychrotrophic bacteria surviving, 2 - organic load, 3 - total psychrotrophic microflora.

TAB. 3. Prítomnosť mikroorganizmov v oplachových vodách po aplikácii alkalického sanitačného prostriedku (n = 12).

TAB. 3. Presence of microorganisms in the rinse water after the application of the alkaline sanitation agent (n = 12).

	celkový počet mikroorganizmov¹	psychrotrofné baktérie²	koliformné baktérie³
x [KTJ.ml ⁻¹]	3,80.10 ²	2,38.10 ²	<1,50.10 ²
x _{min} [KTJ.ml ⁻¹]	<1,50.10 ²	<1,50.10 ²	<1,50.10 ²
x _{max} [KTJ.ml ⁻¹]	2,70.10 ³	1,20.10 ³	<1,50.10 ²

KTJ - colony forming units (CFU). 1 - total microflora, 2 - psychrotrophic bacteria, 3 - coliform bacteria.

Mimoriadne nepriaznivo na účinnosť dezinfekcie pôsobí prítomnosť proteínov, ktoré zoslabujú účinok alkalických a chlórových roztokov [20]. Na dosiahnutie požadovaného efektu sanitácie pri nízkych teplotách je obvyčajne potrebné niekoľkonásobne zvýšiť koncentráciu sanitačného roztoku [9].

Záver

Na základe výsledkov testovania alkalického sanitačného prostriedku na vybrané psychrotrofné baktérie, ktoré všeobecne nepriaznivo ovplyvňujú kvalitu mlieka, sú schopné prežívať v nepriaznivých podmienkach a nezvyknú sa používať ako testovacie mikroorganizmy pre sanitačné prostriedky, môžeme konštatovať, že pri dodržaní aplikačných podmienok stanovených výrobcom tohto prostriedku, je rast psychrotrofných baktérií inhibovaný. Zníženie teploty sanitačného roztoku pod určenú hranicu za súčasnej prítomnosti nečistôt proteínovej povahy nemusí zabezpečiť požadovaný sanitačný efekt.

Literatúra

1. BOHNACK, V.: Normung und ihre Rolle für die Lebensmittelhygiene. Archiv für Lebensmittelhygiene, 49, 1998, s. 121-132.
2. HOFMANN, I. - GOLA, J.: Hygiena a sanitace v masospracujících závodech a provozovnách (III). Maso, 5, 1994, s. 20-25.
3. VYLETĚLOVÁ, M. - HANUŠ, O. - URBANOVÁ, E.: Výskyt proteolytických a lipolytických psychrotrofních bakterií v bazénových vzorcích kravského mléka. Veterinářství, 49, 1999, s. 480-482.
4. FAIRBAIRN, D. J. - LAW, B. A.: Proteinases of psychrotrophic bacteria: their production, properties, effects and control. Journal of Dairy Research, 53, 1986, s. 139-177.
5. FAJARDO-LIRA, C. - ORIA, M. - HAYES, K. D.: Effect of psychrotrophic bacteria and of an isolated protease from *Ps. fluorescens* M 3/6 on the plasmin system of fresh milk. Journal of Dairy Science, 83, 2000, s. 2190-2199.
6. VYLETĚLOVÁ, M. - HANUŠ, O. - BENDA, P.: Psychrotrofní a celková mikrobiální kontaminace syrového kravského mléka. Veterinářství, 48, 1998, s. 373-374.
7. BURDOVÁ, O.: Kvalita mléčných výrobků v závislosti od mikrobiální kontaminace syrového mléka. Mlékářstvo, 29, 1998, s. 44-45.
8. ČANIGOVÁ, M.: Identifikácia psychrotrofných baktérií izolovaných zo surového kravského mlieka. In : Zborník z medzinárodného vedeckého seminára „Aktuálne problémy riešené v agrokomplexe“. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 1999, s. 104-106.
9. KNEIFLOVÁ, J.: Hodnocení baktericidní účinnosti dezinfekčních prostředků suspenzní mikrometodou. Československá epidemiologie, mikrobiologie, imunologie, 37, 1988, s. 97-103.
10. STN ISO 4833. Všeobecné pokyny na stanovenie celkového počtu mikroorganizmov. Metóda počítania kolónií kultivovaných pri teplote 30 °C. Bratislava : ÚNMS, 1997. 12 s.
11. STN ISO 6730. Mlieko. Stanovenie počtu jednotiek tvoriacich kolónie psychrotrofných mikroorganizmov. Technika počítania kolónií vykultivovaných pri teplote 6,5 °C. Bratislava : ÚNMS, 2000. 12 s.
12. STN ISO 4832. Všeobecné pokyny na stanovenie koliformných baktérií. Metódy počítania kolónií. Bratislava : ÚNMS, 1997. 8 s.
13. COUSIN, M. A. : Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: a review. Journal of Food Protection, 45, 1982, s. 192-207.

14. TERNSTRÖM, A. - LINDBERG, A. M. - MOLIN, G.: Classification of the spoilage flora of raw and pasteurized bovine milk, with special reference to *Pseudomonas* and *Bacillus*. Journal of Applied Bacteriology, 75, 1993, s. 25-34.
15. MELICHERČÍKOVÁ, V.: Citlivosť *Pseudomonas aeruginosa* k niektorým desinfekčným prostriedkům. Acta hygienica, epidemiologica et microbiologica, 10, 1980, s. 56-60.
16. RUŽIČKOVÁ, A. - MAJERÍKOVÁ, I.: Sekundárna rezistencia mikroorganizmov na dekontamináčny prostriedok Antibacteric-P. Bulletin potravinárskeho výskumu, 38, 1999, s. 67-83.
17. CUŘÍN, J.: Jak hodnotíme mycí a dezinfekční prostředky. Kvasný průmysl, 42, 1996, s. 307-309.
18. FOLTYS, V.: Problematika získavania kvalitného mlieka. In: Zborník referátov „Súčasnosť a perspektíva slovenského mliekárstva“. Nitra : Agroinštitút, 1999, s. 68-70.
19. KRÉBES, T. - SÁSIK, M.: Sanitácia v potravinárstve A - Z. Bratislava : Alfa, 1978. 188 s.
20. VOLNÁ, F.: Dezinfekcia a sterilizácia - teória a prax. Žilina : Vrana, 1999. 188 s.

Do redakcie došlo 29.11.2003.

Testing of the microbicidal efficiency of an alkaline sanitation agent to psychrotrophic bacteria

ČANIGOVÁ, M. - DUCKOVÁ, V.: Bull. potrav. Výsk., 42, 2003, p. 255-262.

SUMMARY. Efficiency of an alkaline sanitation agent to psychrotrophic bacteria isolated from milk was tested. Adhering to application conditions of the agent (concentration 0.7 %; temperature of the solution 65 °C; application time 10 min) devitalization of bacteria was determined both in the environment without and with organic contaminants. A decrease in the temperature of the sanitation solution to 40 °C lead to the survival of psychrotrophic bacteria in the environment with organic contaminants (at a concentration higher than 0.6 g per 100 ml).

KEYWORDS: microbicidal efficiency; alkaline sanitation agent; psychrotrophic bacteria