



QK1710156-CM2 METODIKA TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI SANITAČNÍCH ROZTOKŮ PROTI BIOFILMŮM

(typ výsledku „Nmet“ – Metodika)

Zpracovali:

IRENA NĚMEČKOVÁ¹, ŠÁRKA TREŠLOVÁ¹, ELIŠKA LEŠKOVÁ¹,

EVA ŠVIRÁKOVÁ², RENATA KARPÍŠKOVÁ³

1 – Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

2 – Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

3 – Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

ISBN 978-80-88390-03-9 (MILCOM)

Vydáno v říjnu 2021

Vydavatel:

Pro: Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Vysokou školu chemicko-technologickou v Praze a Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i vydal MILCOM a.s.,
Ke Dvoru 12a, Praha 6, 16000

Forma vydání:

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF.

Zveřejněno na webové stránce:

https://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/QK1710156_CM2.pdf

1. Vydání 2021

ISBN 978-80-88390-03-9 (MILCOM)

Podíl autorů na tvorbě metodiky:

IRENA NĚMEČKOVÁ – podíl 55 %
ŠÁRKA TREŠLOVÁ – podíl 18 %
ELIŠKA LEŠKOVÁ – podíl 17 %
EVA ŠVIRÁKOVÁ – podíl 5 %
RENATA KARPÍŠKOVÁ – podíl 5 %

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:

- 1) Odborník z daného oboru: MVDr. Zoran Jaglič, Ph.D., DYNTEC spol. s r. o.
- 2) Pracovník státní správy: MVDr. Kateřina Březinová, Ph.D., Státní veterinární správa

Dedikace na projekt:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QK1710156 s názvem: „Nové přístupy a metody analýzy pro zajištění kvality, bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti sýrů, optimalizace jejich výroby a zefektivnění procesů hygieny a sanitace při současném snížení zátěže životního prostředí odpadními vodami“ s finanční podporou NAZV Ministerstva zemědělství ČR.

Cíl metodiky

Metodika je určena pro *in vitro* posuzování účinnosti sanitačních roztoků vůči biofilmům tvořeným mikroorganismy vyskytujícími se v mlékárenských a dalších potravinářských provozech. Metodika umožňuje hodnotit všechny typy roztoků používaných v provozních podmínkách k sanitaci povrchů technologických zařízení a pomůcek, a to včetně roztoků obsahujících povrchově aktivní látky, které mohou při testování jinými metodikami zkreslovat výsledky. Metodika rovněž umožňuje simulovat působení sanitačních roztoků na biofilmy uchycené na nerez a dalších materiálech, aby co nejlépe modelovala provozní podmínky. Metodika umožňuje charakterizovat sanitační roztoky z hlediska jejich účinnosti vůči biofilmům vytvořeným za optimálních podmínek referenčními kmeny se silnou tvorbou biofilmu. Primárně je však určena pro vytipování vhodných sanitačních roztoků účinných proti vyizolovaným divokým kmenům způsobujícím problémy na konkrétních potravinářských provozech. Proto zahrnuje i kmeny se slabší tvorbou biofilmu či podmínky kultivace biofilmu modelující provozní podmínky.

Vlastní popis metodiky

Mikroorganismy

Pro práci se připraví mikroorganismy, např. sbírkové kmeny nebo izoláty z daného provozu vybrané dle účelu stanovení. Čerstvě se nakultivují ve vhodných neselektivních tekutých kultivačních médiích (např. Brain Heart Infusion Broth, Glucose Trypton Yeast Extract Broth, apod.). Kultivuje se při vhodné teplotě, ve vhodné atmosféře a po dobu potřebnou k tomu, aby daný kmen vykazoval dostatečný, okem pozorovatelný nárůst. Kultivace se provádí aerobně, popř. v termostatu s modifikovanou atmosférou dle růstových požadavků testovaných kmenů.

Denzita mikroorganismů ve všech dále uvedených vzorcích se stanovuje standardně jako celkový počet mikroorganismů, popř. odpovídajícími selektivními kultivačními postupy.

Kultivační média

Pro tvorbu biofilmu určeného k testování účinnosti sanitačních roztoků lze použít jak syntetická, tak modelová tekutá média. Neselektivní syntetická tekutá média vhodná pro kultivaci daného druhu mikroorganismu se připraví podle návodu výrobce.

Modelová tekutá média se volí tak, aby na testovacích destičkách netvořila nadměrné množství usazenin. Kvůli usazování bílkovin a popř. i tuku proto nejsou vhodnými médii mléko ani smetana. Nicméně použít lze sušené odstředěného mléko obnovené na koncentraci nejvýše 5,0 g/100 ml. Prostřednictvím sušeného odstředěného mléka obnoveného na nízké koncentrace (0,1 g/100 ml a vyšší) lze modelovat tzv. „bílé vody“. Média na bázi mléka se tepelně ošetří při 110 °C po dobu 20 minut.

Použít lze rovněž nezahuštěnou sladkou syrovátku, u které se pH upraví na hodnotu 4,4 ± 0,2, provede se tepelné ošetření při 110 °C po dobu 20 minut, poté se vysrážené bílkoviny asepticky odstředí při 4000g-6000g po dobu 15 minut. Dále se použije supernatant, u kterého se zneutralizuje pH na hodnotu vhodnou pro růst testovaného mikroorganismu pomocí sterilního roztoku NaOH o koncentraci 4 mol/l. Takto upravenou syrovátku lze použít neředěnou, anebo ředěnou sterilní destilovanou vodou v objemovém poměru 1:1.

Optimalizace podmínek pro vytvoření biofilmu

Pro testování účinnosti sanitačních roztoků je potřeba připravit dostatečné množství biofilmu. K tomu je potřeba vybrat vhodné produkční kmeny mikroorganismů a/nebo optimální podmínky kultivace. Podle účelu stanovení se buď usiluje o vytvoření optimálního množství

biofilmu, anebo se připraví přijatelné množství biofilmu pro pevně daný soubor kmenů nebo pro pevně dané podmínky kultivace.

Potenciálně využitelné kmeny nakultivované v neselektivním syntetickém tekutém médiu za podmínek uvedených v kapitole Mikroorganismy se naředí v poměru 0,3 ml kultury do 10 ml sterilního neselektivního syntetického tekutého média. Odtud se na mikrotitrační destičky předem vypláchnuté 70% etanolem a usušené na vzduchu (ideálně v laminárním boxu pod UV lampou) nadávkuje po 100 µl naředěné kultury. Od každého kmene se připraví sada 5-7 mikrotitračních destiček (pro každou dobu kultivace jedna destička) se 4 jamkami obsazenými daným kmenem a 4 jamkami sterilním médiem jako kontrolou na každé destičce. Na každou destičku se dávkuje pouze kmeny se stejnou teplotou a atmosférou kultivace. Kultivuje se buď při teplotě vhodné pro růst daného kmene, nebo při teplotě modelující podmínky na provoz. Přibližně každých 24 h se hodnotí množství biofilmu na jedné mikrotitrační destičce z připravené sady.

Na mikrotitrační destičce se vizuálně zhodnotí, zda mikroorganismy za podmínek metody narostly. Následně se obsah destičky slije, destička se 5x promyje destilovanou vodou a do jamek se napipetuje 150 µl 0,1% vodného roztoku krystalové violeti. Barví se po dobu 45 minut, pak se barvivo slije a destička se 5x promyje destilovanou vodou a nechá okapat. Obarvený biofilm se poté rozpustí ve 150 µl 95% etanolu. Změří se absorbance při 560 nm.

Pro jednotlivé kmeny a doby kultivace se spočítá průměrná absorbance ze čtyř jamek očištěná o průměrnou absorbanci kontrolního vzorku. Jak odpovídá opakovatelnosti metody, absorbance paralelních jamek by se mezi sebou neměly lišit o více než 0,15. Interpretace výsledků je následující:

- Vhodné kmeny kultivované po vhodně dlouhou dobu dosahují absorbance mezi 0,45 a 1,0.
- Absorbance nad 1,0 značí vhodný kmen, ale příliš dlouhou dobu kultivace. Nicméně při hodnocení už po 24 h kultivace absorbance hodnotu 1,0 za podmínek metody většinou nepřekračuje.
- Pokud absorbance převýší hodnotu 0,05, avšak v žádném z hodnocených časů nepřesáhne hodnotu 0,45, kmen je méně vhodný a měla by být zvážena účelnost jeho dalšího použití a doba kultivace zvolena tak, aby bylo dosaženo maximální absorbance.
- Absorbance pod 0,05 značí, že daný kmen biofilm netvoří, a tedy ho nelze použít.

Uvedený postup představuje screeningovou metodu, která umožňuje jednoduchým způsobem a i z velkého množství kombinací kmenů a podmínek kultivace vybrat varianty pro vlastní testování. To však bude probíhat za mírně odlišných podmínek (jiný podkladový materiál pro tvorbu biofilmu, popř. také jiné kultivační médium), a proto se intenzita tvorby biofilmu zjištěná screeningem a při vlastním testování v některých případech může lišit. Zjištěná absorbance mezi 0,05 a 0,45 proto pouze upozorňuje na potenciálně méně vhodný kmen, avšak jeho použití nevyklučuje.

Experimentální sestava

Metodika umožňuje otestovat účinnost sanitačních roztoků vůči biofilmům uchyceným na nerez, skle, plexiskle, polystyrenu, apod. neporézních, pevných a tepelně odolných materiálech. Doporučuje se nechat si z vybraných materiálů na zakázku vyrobit destičky o rozměrech 110 x 25 x 1 mm. Alternativně lze použít komerčně dostupná podložní sklička pro mikroskopii o rozměrech 76,2 x 25,4 x 1 mm. Vyrobené destičky nebo podložní sklička (dále jen „destičky“) se vysterilují suchým teplem při 180 °C po dobu 2 h.

Vysterilované destičky se vloží do širokohrdlých uzavíratelných reagenčních lahví (např. s GL šroubovým uzávěrem) o objemu 250 ml a přilije se 200 ml nesterilního kultivačního média. Poté se médium v reagenčních lahvích i s destičkami tepelně ošetří za podmínek

uvedených v kapitole Kultivační média. Výjimkou jsou média na bázi syrovátky, která se do reagenčních lahví vysterilovaných suchým teplem při 180 °C po dobu 2 h asepticky nadávkuje po sterilaci a odstředění (postup viz kapitola Kultivační média).

Testování účinnosti sanitačních roztoků proti biofilmům

Pro každý testovaný kmen se připraví minimálně tři reagenční lahve s destičkou a kultivačním médiem pro stanovení množství biofilmu před sanitací a minimálně po třech lahvích pro každý sanitační roztok, který má být vůči biofilmu daného kmene otestován. Tyto lahve se naočkují 1 % obj. čerstvě připravené kultury testovaného kmene, jak je popsáno v kapitole Mikroorganismy. Následuje kultivace biofilmu za podmínek optimalizovaných podle výše uvedeného postupu. Doporučuje se zkontrolovat denzitu mikroorganismů v médiích před a po kultivaci.

Všechny destičky s biofilmem se sterilní pinzetou vyjmou z lahví, vloží do kádinek a z každé strany opláchnou 25 ml sterilní destilované vody. K manipulaci s destičkami se s výhodou využije plocha přesahující rozměry podložních sklíček. Opláchnuté destičky se odkládají do sterilních vzorkovnic, krabiček, apod. nádob, které umožňují opřít destičky tak, aby se nakultivovaný biofilm ani z jedné strany destičky nedotýkal nádoby a neotíral se.

Z destiček určených pro stanovení množství biofilmu před sanitací se odeberou stěry. Stírají se obě strany destičky (bez hran), v ploše, která byla ponořena v kultivačním médiu, s výjimkou centimetrového pásu v místech, kam dosahovala hladina média. Použit lze běžně dostupné typy stěrovek (např. polyuretanové houbičkové stěrovky, transportní stěrovky z umělého hedvábí, vatové stěrovky, apod.). Stanoví se denzita mikroorganismů ve stěrech.

Destičky, které mají být vystaveny působení sanitačních roztoků, se postupně vkládají do čistých reagenčních lahví s 250 ml testovaných sanitačních roztoků vytemperovaných na vodní lázni na testovanou teplotu. Najednou se vždy zpracovává jen tolik destiček, u kolika je technicky možné ohlídat požadovanou dobu působení sanitačních roztoků. Jestliže se sanitační roztok používá ve formě pěny, vytvoří se dostatek pěny pomocí elektrického šlehače a pěna s destičkou se vloží do sterilní kádinky zakryté alobalem. Po uplynutí testované doby působení roztoků se destičky sterilní pinzetou vyjmou, opláchnou z každé strany 25 ml sterilní destilované vody a bezprostředně se zbytky biofilmu po sanitaci setrou. Následně se stanoví denzita mikroorganismů ve stěrech.

Pro dosažení přesnějších výsledků testování se doporučuje destičky vyjmuté ze sanitačních roztoků neoplachovat sterilní destilovanou vodou, ale vhodně zvoleným sterilním neutralizačním roztokem. Složení neutralizačního roztoku závisí na aktivních látkách obsažených v sanitačním roztoku, který má být neutralizován. Doporučení pro volbu neutralizačních roztoků, stejně jako postupy validace jsou uvedeny např. v ČSN EN 1276 (2020).

Interpretace výsledků

Množství biofilmu před a po sanitaci se vyjádří jako počet kolonietvorných jednotek (KTJ) ve stěrech získaných za podmínek metody a spočítá se jako aritmetický průměr minimálně ze tří paralelních stanovení. Průměrná hodnota se následně logaritmuje. Dílčí výsledky paralelních stanovení by se mezi sebou neměly lišit o více než 2 log KTJ/stěr. Tato hodnota odpovídá opakovatelnosti metody a indikuje nutnost neomezovat se na jediné stanovení, ale pracovat minimálně se třemi paralelními vzorky.

K průkaznému dílčímu úbytku biofilmu působením sanitačních roztoků dochází, pokud je rozdíl průměrných hodnot před a po sanitaci vyšší než 3 log KTJ/stěr. Výsledkem, který je z hlediska aplikace sanitačních roztoků v provozních podmínkách žádoucí, je snížení množství biofilmu pod mez detekce ve všech paralelních stanoveních. Z toho plyne, že čím vyšší je počáteční množství biofilmu, tím přesněji lze účinnost různých sanitačních roztoků vůči

testovanému kmeni porovnat. Žádoucí je, aby množství biofilmu před sanitací dosahovalo hodnot 6-8 log KTJ/stěr.

Srovnání novosti postupů

Pro testování účinnosti sanitačních roztoků vůči planktonickým buňkám existují standardizované postupy, např. ČSN EN 1276 (2020), v případě testování vůči biofilmům je však situace komplikovanější. Předložená metodika reaguje na aktuální potřebu mít k dispozici postup pro hodnocení účinnosti sanitačních roztoků proti biofilmům, a to včetně roztoků obsahujících povrchově aktivní látky. Použití povrchově aktivních látek v sanitačních roztocích se stává čím dál běžnější, vyvíjeny jsou také nové typy aktivních látek nebo jejich kombinace. Povrchově aktivní látky se používají buď jako základ, anebo ke zlepšení užitečných vlastností sanitačních roztoků na bázi jiných aktivních látek. V tom případě mají např. funkci smáčecí, antiredepozitní, pěnotvornou nebo antimikrobiální.

Schopnost povrchově aktivních látek hromadit se na fázových rozhraních však může způsobovat, že tyto látky při barvení a kvantifikaci biofilmu některými metodami způsobují falešně pozitivní výsledky (Němečková a kol., 2017). V literatuře jsou proto dostupné údaje o účinnosti pouze základních roztoků obsahujících nejběžněji používané aktivní látky (např. Jaglič a kol., 2012, Bremer a kol., 2006, de Silva Fernandes a kol., 2017, Belessi a kol., 2011). Problematiku tvorby biofilmů v prvovýrobě a zpracování mléka a testování účinnosti sanitačních roztoků přehledně zpracovali Vlková a kol. (2008).

Tvorba biofilmu různými kmeny mikroorganismů za různých podmínek kultivace a účinnost sanitačních roztoků vůči biofilmům je nejčastěji hodnocena na mikrotitračních destičkách spektrofotometricky, po barvení biofilmu krystalovou violetí. Postup využívající mikrotitrační destičky, jak je uveden v této metodice, byl adaptován z prací, které publikovali Djordjevic a kol. (2002) a Purkrťová a kol. (2010). Na druhou stranu byla také publikována metoda sofistikovaná a náročná na vybavení. Využívá průtočnou celu s čerpadlem, ve které je biofilm tvořen na nerezovém, skleněném nebo polystyrenovém žetonu. Následně je biofilm detekován mikroskopicky ve fázovém kontrastu a kvantifikován rozborem stěrů (Luppens a kol., 2002).

Předložená metodika díky využití kultivačního rozboru stěrů eliminuje riziko falešně pozitivních výsledků v důsledku hromadění povrchově aktivních látek na destičce. Zároveň byla vypracována a optimalizována do podoby snadno proveditelné, dostupné a nenáročné na přístrojové vybavení. Oproti stávajícím metodám, které pracují převážně se syntetickými tekutými médii, předložená metodika zahrnuje i postupy pro modelová média reflektující potřeby mlékárenského průmyslu a doporučuje postupy pro jejich přípravu.

Popis uplatnění metodiky

Metodika byla na základě smlouvy o využití výsledků uplatněna u uživatele Českomoravský svaz mlékárenský z.s. Metodika je určena k zavedení do laboratoří poskytujících poradenství a servis, resp. výzkum a vývoj v oborech zemědělství a potravinářství, zejména prvovýroby a zpracování mléka, dále pak hygieny a sanitace, mikrobiologie, veterinární medicíny, a v dalších souvisejících oborech. Uplatní se při optimalizaci sanitačních postupů, zvyšování kvality, bezpečnosti a trvanlivosti potravin díky účinnější eliminaci biofilmů a při vývoji a testování nových sanitačních roztoků a jejich aktivních složek.

Ekonomické aspekty

Metodika je určena k provádění ve standardně vybavené laboratoři klasické kultivační mikrobiologie. V závislosti na vybavenosti konkrétní laboratoře může vyvstát potřeba dokoupit reagenční lahve se šroubovým GL uzávěrem v přiměřeném množství kusů. Biofilm, vůči němuž mají být sanitační roztoky testovány, se nakultivuje buď na běžných podložních sklíčkách pro mikroskopii, anebo na účelově připravených destičkách s nerez, plexiskla, polystyrenu apod. Celkové náklady na zavedení metodiky pravděpodobně nepřesáhnou 15 tis. Kč.

Lze očekávat, že cena za otestování jednoho kmene a jednoho sanitačního roztoku v externí laboratoři se bude pohybovat odhadem okolo 3 tis. Kč a okolo 1 tis. Kč za každý další sanitační roztok pro daný kmen. Zisk je odhadován na 600,- Kč za jednu kombinaci kmen-roztok, resp. na 200,- Kč za každý další roztok pro daný kmen.

Pro konečného uživatele bude ekonomický přínos záviset na závažnosti mikrobiologického problému, který se díky této metodice podaří vyřešit. Odhadem se zamezení ztrát v důsledku výroby neshodných výrobků může pohybovat ve výši řádově stovek tisíc až milionu korun pro každý vyřešený problém.

Seznam použité související literatury

- 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 1276 (2020): Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika – Kvantitativní zkouška v suspenzi k hodnocení baktericidní aktivity chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik používaných v potravinářství, průmyslu, domácnostech a veřejných prostorách – Zkušební metoda a požadavky. Praha, Česká agentura pro standardizaci.
- DE SILVA FERNANDES M., COELHO ALVARES A.C., MANOEL J.G.M., RAMIRES ESPER L.M., KABUKI D.Y., KUAYE 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., MCLANDBOROUGH L. A. (2002): Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied Environmental Microbiology*, 68, s. 2950-2958.
- JAGLIČ Z., ČERVINKOVÁ D., VLKOVÁ H., MICHU E., KUNOVÁ G., BABÁK V. (2012): Bacterial biofilms resist oxidising agents due to the presence of organic matter. *Czech Journal of Food Sciences*, 30, s. 178-187.
- LUPPENS S.B.I., REIJ M.W., VAN DER HEIJDE R.W.L., ROMBOUTS F.M., ABEE T. (2002): Development of a standard test to assess the resistance of *Staphylococcus aureus* biofilm cells to disinfectants. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, s. 4194-4200.
- NĚMEČKOVÁ I., HLAVÁČKOVÁ Z., ŠEBKOVÁ T., SMOLOVÁ J., STRMISKA V., HORÁČKOVÁ Š. (2017): Vliv sanitačních roztoků na kvasinky kontaminující mlékařenské provozy a na jejich biofilmy. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 161, s. 8-13.

- PURKRTOVÁ S., TUROŇOVÁ H., PILCHOVÁ T., DEMNEROVÁ K. (2010): Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to disinfectants. *Czech Journal of Food Sciences*, 28, s. 326-332.
- VLKOVÁ H., BABÁK V., SEYDLOVÁ R., PAVLÍK I., SCHLEGELOVÁ J. (2008): Biofilms nad hygiene on dairy farms and in the dairy industry: Sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms – A review. *Czech Journal of Food Sciences*, 26, s. 309-323.

Seznam publikací, které předcházely metodice

- NĚMEČKOVÁ I., MIHALOVÁ D., KEJMAROVÁ M., ROUBAL P. (2015): Metody testování účinnosti sanitačních roztoků proti plísním. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 152, s. III-VII.
- 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.
- NĚMEČKOVÁ I., HAVLÍKOVÁ Š., HROMÁDKOVÁ E., ELICH O. (2020): Screening antibakteriální účinnosti bezoplachových dezinfekčních přípravků používaných proti koronaviru SARS-CoV-2. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 180, s. 15-20.
- NĚMEČKOVÁ I., TREŠLOVÁ Š., LEŠKOVÁ E. (2021): Vývoj metody pro testování účinnosti sanitačních roztoků proti biofilmům. *Mlékařské listy – zpravodaj*, 187, s. 9-14.