

# Z výzkumu a praxe

## Studium rezistence mikroorganismů vůči dezinfekčním prostředkům

663.13  
663.12

VĚRA KURZOVÁ, promovaná biolog, Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, Praha

**Klíčová slova:** pivo, kvasinky, laktobacily, pediokoky, *Escherichia coli*, rezistence, dezinfekce, kontaminace

### 1. ÚVOD

Při provozních aplikacích mycích a dezinfekčních prostředků je uplatňována tradující se zkušenost střídání alkalických a kyselých roztoků, aby se zabránilo vzniku rezistence u kontaminujících mikroorganismů.

Vznik rezistence mikroorganismů je projevem cytoplazmatické dědičnosti. Za přenos rezistence je zodpovědný konjugací RTF faktor, přičemž rezistence může být přenášena nejen mezi kmeny téhož druhu, nýbrž i mezi příbuznými rody, takže se mezi bakteriální mikroflórou určitého prostředí rychle šíří [1].

Rezistenci můžeme z praktického hlediska rozdělit na přirozenou, zdánlivou a získanou. Při technické dezinfekci v provozní praxi se lze setkat převážně s rezistencí přirozenou a zdánlivou. Přirozená rezistence je specifická pro určitý druh a kmen mikroorganismů (např. vůči teplu), nevzniká pod vlivem agencií. Zdánlivá rezistence je jev, s kterým se můžeme setkat při aplikaci dezinfekčního prostředku na silně znečištěné materiály, protože při vyšších počtech zárodků se smrtící efekt nutně prodlužuje. K obdobnému jevu může docházet i při práci se silně znečištěným dezinfekčním prostředkem [2].

V pivovarské literatuře nenacházíme konkrétní údaje o sledování průběhu vzniku rezistence mikroorganismů vůči používaným dezinfekčním prostředkům. Následující studie je příspěvkem k objasnění tohoto jevu, který by se mohl projevit při sanitačních postupech v pivovarech.

### 2. MATERIÁL A METODY

#### 2.1 Testované mikroorganismy:

*Saccharomyces cerevisiae-carlsbergensis* P 96  
*Saccharomyces diastaticus* Spk 4  
*Escherichia coli* (PF UK- B 26)  
*Lactobacillus brevis* L 1  
*Lactobacillus buchneri* L 2  
*Pediococcus species* Ped 1  
*Pediococcus species* Ped 2

**2.2 Pro studium vzniku rezistence** byla aplikována metoda s ponořenými nosiči [3], která se projevila jako vhodná již při dřívějším sledování podmínek inhibice mikroorganismů dezinfekčními prostředky [4]. Jako nosiče mikroorganismů se použily pryžové hadičky, dezinfekční účinek se stanovoval stupněm zákalu vzniklého při kultivaci vydezinfikovaného nosiče:

0 = žádný nárůst,  
1 = slabý nárůst,  
2 = střední nárůst,  
3 = silný nárůst,  
4 = velmi silný nárůst.

Nosiče s laktobacily a pediokoky se kultivovaly v MRS médiu 7 dnů při 28 °C, nosiče s kvasinkami v 8% sladně 48 hodin při 26 °C a nosiče s *Escherichia coli* v maseptonovém bujónu 24 hodin při 37 °C.

**2.3 Možnost vzniku rezistence byla sledována vůči dezinfekčnímu prostředku Persteril (35% kyselina peroctová) při teplotě 10 °C**

### 3. VÝSLEDKY SLEDOVÁNÍ VZNIKU REZISTENCE VŮČI DEZINFEKČNÍMU PROSTŘEDKU PERSTERIL

Na nosič po kultivaci se působilo dezinfekčním prostředkem o koncentraci, která ještě zcela neinhibuje testovaný mikroorganismus [4]. Po kultivaci v teku-

tém médiu se celý postup opakoval až 10krát. Takto pasážovaná kultura se testovala na koncentraci dezinfekčního prostředku, která původní kmen 100% inhibovala. Byl-li zaznamenán po aplikaci této a případně i vyšší koncentrace dezinfekčního prostředku růst kultury, je tento růst důkazem vzniku rezistence. Byl-li výsledek negativní, znamená to, že ke vzniku rezistentních mutantů nedošlo.

#### 3.1 Laktobacily

Kmen L 1 — Zkoušené varianty působení Persterilu

|                  |                  |                  |
|------------------|------------------|------------------|
| 0,1 % — 30 minut | 0,2 % — 30 minut | 0,3 % — 30 minut |
| 1. pasáž 4       | 1. pasáž 4       | 1. pasáž 0       |
| 2.-5. pasáž 4    | 2. pasáž 0       |                  |
|                  | 0,2 % — 30 minut |                  |
|                  | 1. pasáž 4       |                  |
|                  | 2.-5. pasáž 4    |                  |

Výchozí kultura izolátu L 1 byla inhibována již v druhé pasáži 0,2 % Persterilem po 30minutovém působení. Tato kultura byla 5krát pasážována při nižší koncentraci — 0,1 % a ve všech pasážích dosáhla kultura maximálního nárůstu. Po páté pasáži byla kultura opět vystavena působení 0,2 % Persterilu. V tomto případě bylo již zjištěno, že po pěti po sobě následujících pasážích nebyla kultura touto koncentrací inhibována.

Opakovaným působením 0,1 % Persterilu na kmen L 1 byl zjištěn vznik rezistence vůči 0,2 % Persterilu.

Kmen L 2 — Zkoušené varianty působení Persterilu

|                  |                          |
|------------------|--------------------------|
| 0,1 % — 60 minut | 0,2 % — 60 minut         |
| 1. pasáž 4       | 1. pasáž 4               |
| 2. pasáž 4       | 2. pasáž 3               |
| 3. pasáž 3       | 3. pasáž 0               |
| 4. pasáž 0       |                          |
| 0,1 % — 30 minut |                          |
| 1.-5. pasáž 4    |                          |
|                  | 0,2 % — 30 minut         |
|                  | 1.-10. pasáž 4           |
|                  | izolát s označením L2-R2 |

Izolát L 2 — R 2

|                  |                  |
|------------------|------------------|
| 0,2 % — 60 minut | 0,3 % — 30 minut |
| 1. pasáž 4       | 1. pasáž 4       |
| 2.-10. pasáž 4   | 2. pasáž 0       |
|                  | 0,3 % — 30 minut |
|                  | 1. pasáž 4       |
|                  | 2. pasáž 4       |
|                  | 3. pasáž 4       |
|                  | 4. pasáž 3       |
|                  | 5. pasáž 2       |

Výchozí kultura byla inhibována v třetí pasáži 0,2 % Persterilem po 60minutovém působení. Tato kultura byla postupně 4krát pasážována při nižší koncentraci 0,1 % po dobu 30 minut a poté 10krát pasážována v 0,2 % Persterilu opět po dobu 30 minut. Ve všech těchto pasážích dosáhla kultura maximálního nárůstu. Po tomto opakovaném působení dezinfekčního prostředku byl z kultury získán izolát s označením L 2 — R 2. Tento izolát pak vykazoval v dalších zkouškách rezistenci vůči 0,2 % Persterilu i při prodloužené době působení 60 minut a současně získal i zvýšenou odolnost vůči 0,3 % koncentraci Persterilu.

#### 3.2 Pediokoky

Kmen Ped 1 — Zkoušené varianty působení Persterilu

|                  |                  |
|------------------|------------------|
| 0,1 % — 60 minut | 0,1 % — 30 minut |
| 1. pasáž 4       | 1. pasáž 4       |
| 2. pasáž 0       | 2. pasáž 1-2     |
|                  | 3. pasáž 0       |

## Kmen Ped 2 — Zkoušené varianty působení Persterilu

0,1 % — 60 minut  
1. pasáž 4  
2. pasáž 0

0,1 % — 30 minut  
1. pasáž 4  
2. pasáž 1—2  
3. pasáž 0

Oba testované kmeny pediokoků jsou vůči Persterilu velmi citlivé. Za zkoušených podmínek byly schopny se pomnožovat do maximálního nárůstu pouze v 1. pasáži, ve 2. pasáži vykazovaly již slabý nárůst a ve 3. pasáži docházelo ke 100% inhibici.

Vznik rezistence nebyl zaznamenán.

3.3 *Escherichia coli* — Zkoušené varianty působení Persterilu

0,1 % — 20 minut  
1. pasáž 4  
2. pasáž 2  
3. pasáž 0

0,2 % — 20 minut  
1. pasáž 1  
2. pasáž 0

0,1 % — 15 minut  
1. pasáž 4  
2.—5. pasáž 4

0,1 % — 20 minut  
1. pasáž 4  
2. pasáž 2  
3. pasáž 0

0,2 % — 20 minut  
1. pasáž 1  
2. pasáž 0

Podle získaných výsledků nebyl u kmene *Escherichia coli* B 26 pasážováním v 0,1 % Persterilu po dobu 15 minut zjištěn žádný posun ke vzniku rezistence jak pro vyšší koncentraci, tak i dobu působení.

## 3.4 Kvasinky

Kmen P 96-*Saccharomyces cerevisiae* — *carlsbergensis*  
Zkoušené varianty působení Persterilu

0,1 % — 60 minut  
1. pasáž 4  
2.—5. pasáž 4

0,2 % — 30 minut  
1. pasáž 4  
2. pasáž 2  
3. pasáž 0

0,2 % — 30 minut  
1. pasáž 4  
2.—5. pasáž 4

Kmen *Saccharomyces diastaticus* — Zkoušené varianty působení Persterilu

0,1 % — 60 minut  
1. pasáž 4  
2.—5. pasáž 4

0,2 % — 30 minut  
1. pasáž 4  
2. pasáž 3  
3. pasáž 1  
4. pasáž 1  
5. pasáž 0

0,2 % — 30 minut  
1. pasáž 4  
2.—5. pasáž 4

0,3 % — 30 minut  
1. pasáž 4  
2. pasáž 2—3  
3. pasáž 2—3

Výchozí kultury obou testovaných kmenů kvasinek byly postupným pasážováním inhibovány 0,2 % Persterilem po 30minutovém působení.

Tytéž kultury byly 5krát pasážovány při nižší 0,1 % koncentraci po dobu 60 minut a ve všech pasážích dosáhly maximálního nárůstu. Po páté pasáži byly kultury opět vystaveny působení 0,2 % Persterilu. V tomto případě bylo zjištěno, že oba kmeny kvasinek nebyly touto koncentrací inhibovány.

Po opakovaném působení 0,1 % Persterilu vykazovaly oba kmeny kvasinek v dalších zkouškách rezistenci vůči 0,2 % Persterilu a kmen *Saccharomyces diastaticus* vykazoval zvýšenou odolnost i vůči 0,3 % koncentraci Persterilu.

## 4. ZÁVĚR

Výsledky studia vzniku rezistence u kontaminujících pivovarských mikroorganismů při aplikaci dezinfekčního prostředku Persteril za podmínek studeného mytí

ukázaly, že testované mikroorganismy vykazovaly v této schopnosti rozdílné vlastnosti.

U pediokoků se projevila jejich zvýšená citlivost vůči působení Persterilu a vznik rezistence nebyl zaznamenán. Obdobně nebyl zjištěn žádný posun ke vzniku rezistence u kmene *Escherichia coli* B 26. Naopak byla za sledovaných podmínek jednoznačně prokázána možnost vzniku rezistence u laktobacilů a kvasinek, to jest u mikroorganismů, jejichž přítomnost ve stočeném pivu podstatnou měrou negativně ovlivňuje jeho trvanlivost.

Získané výsledky ukázaly na nutnost důsledné a pravidelné kontroly koncentrace používaných mycích a dezinfekčních roztoků. Při provozních sanitačních postupech se nedoporučuje pracovat s příliš nízkými koncentracemi dezinfekčních prostředků, a to zejména při nižších teplotách, aby se zabránilo adaptaci a postupné selekci rezistentních mutantů kontaminujících mikroorganismů. Současně se doporučuje dodržovat zásadu časté změny mycích a dezinfekčních prostředků.

## Literatura

- [1] ŠILHÁNKOVÁ, L.: Mikrobiologie pro potravináře, SNTL, Praha, 1983.
- [2] Anonym: Brauwelt-Report, 115, 1975, s. 1428.
- [3] DRAWERT, F. (ed.): Brautechnische Analysenmethoden (MEBAK), Band III. Freising-Weihestephan, 1982.
- [4] KURZOVÁ, V. - VERNEROVÁ, J.: Výzkum mikrobiologické účinnosti sanitačních prostředků a postupů. (Záv. zpráva), VÚPS, Praha, 1986.
- [5] TOPKA, P.: Kvas. prům., 29, 1983, s. 268.
- [6] SCHMIDT, H. J.: Brauind., 72, 1987, s. 44.

Lektoroval Ing. Jan Šavel, CSc.

## Kurzová, V.: Studium rezistence mikroorganismů vůči dezinfekčním prostředkům. Kvas. prům., 34, 1988, č. 2, s. 37—39.

Studie se zabývá sledováním průběhu vzniku rezistence u pivovarských kontaminujících mikroorganismů vůči dezinfekčnímu prostředku Persteril (35% kyselina peroctová) za podmínek studené sanitace.

Výsledky ukázaly, že testované mikroorganismy vykazovaly za sledovaných podmínek v této schopnosti rozdílné vlastnosti. U zástupců rodu *Pediococcus* a *Escherichia coli* nebyl zjištěn žádný posun ke vzniku rezistence. Naopak byla za sledovaných podmínek prokázána možnost vzniku rezistence u laktobacilů a kvasinek.

## Курзова, В.: Исследование сопротивляемости микроорганизмов в отношении к дезинфицирующим средствам. Квас. прум., 34, 1988, № 2, стр. 37—39.

Статья занимается исследованием хода возникновения сопротивляемости пивоваренных, контаминирующих микроорганизмов в отношении к дезинфицирующему средству Перстерил в условиях холодной санитарии.

Результаты доказали, что исследуемые микроорганизмы при рассматриваемых условиях показывали в этой способности различные свойства. В случае представителей штамма *Pediococcus* и *Escherichia coli* не был установлен никакой сдвиг по направлению к возникновению резистенции; наоборот, при исследуемых условиях была доказана возможность ее возникновения для лактобацилл и дрожжей.

## Kurzová, V.: Study of Microbial Resistance to Disinfectants. Kvas. prům., 34, 1988, No. 2, pp. 37—39.

A development of the resistance in beer contaminated microorganisms to the Persteril disinfectant under conditions of a cold sterilization is described. Under these conditions the microorganisms tested showed different properties. Unlike to the genus *Pediococcus* and the strain *Escherichia coli*, the development of the resistance with lactobacilli and yeasts has been found.

## Kurzová, V.: Studium der Resistenz der Mikroorganismen gegen Desinfektionsmittel. Kvas. prům., 34, 1988, Nr. 2, S. 37—39.

In der Arbeit wurde bei bierkontaminierenden Mikroorganismen die Resistenzbildung gegenüber dem Desin-

fektionsmittel Persteril verfolgt, und zwar unter Bedingungen der kalten Sanitation.

Die Ergebnisse zeigten, daß die getesteten Mikroorganismen in der Fähigkeit der Resistenzbildung verschiedene Eigenschaften aufweisen. Bei den Vertretern

des Genus *Pediococcus* und *Escherichia coli* wurde keine Verschiebung zu der Resistenzbildung festgestellt. Bei Lactobazillen und Hefen wurde dagegen unter den verfolgten Bedingungen die Möglichkeit der Resistenzbildung erwiesen.