

ŠTÚDIUM CITLIVOSTI MIKRO-ORGANIZMOV NA BIOCÍDY

HAJNALKA ŐSZIOVÁ a LUCIA BIROŠOVÁ

Ústav potravinárstva a výživy, Oddelenie výživy
a hodnotenia kvality potravín, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita,
Radlinského 9, 812 37 Bratislava
zora271@gmail.com

Došlo 6.9.16, prijaté 3.11.16.

Kľúčové slová: chlórdioxid, peroxid vodíka, chlórnan sodný, gramnegatívne baktérie, grampozitívne baktérie

Úvod

Antiseptiká a dezinfekčné látky sú rozsiahle používané v nemocniciach a iných zdravotníckych zariadeniach vďaka povrchovému využitiu. Konkrétne sú najdôležitejšou súčasťou postupov kontroly infekcií a prostriedkom pri prevencii nozokomiálnych infekcií¹. Riziko mikrobiálnej kontaminácie a infekcií viedlo ku zvýšenému používaniu týchto látok aj v potravinárskom priemysle. „Biocídy“ je všeobecný výraz charakterizujúci chemické látky, väčšinou širokospektrálneho účinku, schopné inaktivovať mikroorganizmy. Tieto látky majú odlišnú chemickú štruktúru a pôsobia na mikroorganizmy rôznymi mechanizmami². Vedecká literatúra uvádza prípady zníženej citlivosti na

biocídy a mechanizmy ich účinku boli obsiahle skúmané^{3–7}. Hoci zistené skutočnosti sú pozoruhodné, množstvo terminológie a metodík popisujúcich rezistenciu voči biocídom vychádza z prác týkajúcich sa antibiotík, pričom sú tu tendencie odhadovať a porovnávať bez zváženia základných rozdielov, ktoré existujú v mechanizmoch účinku antibiotík a biocídom a v metódach využívaných na stanovenie ich účinnosti. Zhrnutie mechanizmov antibakteriálneho pôsobenia najčastejšie používaných antiseptík a dezinfekčných látok je uvedené v tab. I. Na skúmanie týchto mechanizmov existujú celé série techník, ktoré zahŕňajú overenie príjmu látok bunkou⁸, lýzu a únik intracelulárnych zložiek⁹, poruchy bunkovej homeostázy¹⁰, vplyv na membrány¹¹, inhibíciu enzýmov, elektrónového transportu a oxidačnej fosforylácie¹², interakcie s makromolekulami¹³, vplyv na biosyntetické procesy makromolekúl¹⁴ a mikroskopické zmeny biocídom exponovaných buniek¹⁵.

Štúdie niektorých z týchto látok ukazujú, že pri vysokých koncentráciách (ktoré sa používajú v praxi na dosiahnutie rýchleho mikrobicídneho účinku) narúšajú bunkovú membránu alebo inaktivujú širokú škálu enzýmov, no pri nižších koncentráciách môžu pôsobiť tak ako antibiotiká, teda špecificky zasahovať jedno alebo dve cieľové miesta v bunke. Napriek tomu, pre biocídy, ktoré zasahujú viac cieľových miest, je citlivosť každého tohto miesta pravdepodobne premenlivá a závislá od koncentrácie biocídu¹⁶.

Mechanizmy znižujúce citlivosť mikroorganizmov na biocídy

Termín „rezistencia“ je definovaný ako necitlivosť, resp. odolnosť určitého druhu mikroorganizmu voči antibiotiku. Preto sa vedci zhodli na tom, že v súvislosti s biocídnymi zlúčeninami by bolo vhodnejšie používať termín

Tabuľka I
Prehľad mechanizmov antibakteriálneho pôsobenia biocídných zlúčenín²

Cieľové miesto	Zlúčenina	Mechanizmus účinku
Bunkový obal	glutaraldehyd EDTA	priečne väzby proteínov, G-baktérie: únik Mg ²⁺ iónov, strata lipopolysacharidov
Vnútoraná membrána	kvartérne amóniové zlúčeniny diamíny fenoly	poškodenie membrány týkajúce sa fosfolipidovej dvojvrstvy, indukcia úniku aminokyselín, prepúšťanie membrány
Makromolekuly	formaldehyd glutaraldehyd	priečne väzby proteínov a NK, priečne väzby proteínov
DNA	akridíny halogény H ₂ O ₂ , ióny Ag	interkalácia do DNA, inhibícia syntézy DNA, poškodenie reťazca DNA
Oxidačné činidlá	halogény peroxydy	oxidácia tiolových skupín, tvorba voľných •OH radikálov, oxidácia tiolových skupín

„znižená citlivosť“. Napriek tomu sa v literatúre stretávame s používaním oboch pojmov nezávisle od kontextu, v ktorom sú spomínané.

Znížená citlivosť mikroorganizmov môže byť dôsledkom dvoch skutočností:

- výsledok podmienok kultivácie,
- získania genetických elementov, ktoré kódujú rezistentné mechanizmy.

Prirodzené vlastnosti baktérií spôsobujúce zníženie citlivosti na biocídy

Prvým miestom mikroorganizmov, ktoré interaguje s biocídom, je bunkový povrch. Citlivosť je významne ovplyvnená zložením bunkovej steny a zložkami vonkajšieho povrchu, čo podmieňuje interakciu a následnú absorpciu biocídu bunkou. Prirodzené zloženie týchto vrstiev je premenlivé a závisí od typu mikroorganizmu. Grampozitívne baktérie sú všeobecne relatívne viac citlivé na biocídy ako gramnegatívne baktérie. Vonkajšia membrána gramnegatívnych baktérií pôsobí ako permeabilná bariéra, pretože úzke porínové kanály obmedzujú penetráciu hydrofóbných molekúl a nízka fluidita lipoproteínsacharidových vrstiev brzdí difúziu lipofilných zlúčenín. Niektoré bakteriálne kmene sú prirodzene rezistentné voči určitému typu biocídu. *Pseudomonas aeruginosa* má v porovnaní s inými baktériami odlišné zloženie lipopolysacharidov vonkajšej membrány a tiež iný obsah kationov¹⁷. Je dokázané, že vyšší obsah Mg^{2+} zodpovedá za silnejšie väzby medzi lipopolysacharidmi². U niektorých kmeňov rodu *Proteus*, ktoré boli odolné voči viacerým typom biocídov, sa dokázala prítomnosť menej kyslých lipopolysacharidov vonkajšej membrány¹⁸.

Nedávne štúdie ukázali, že efluxné pumpy, hlavne pumpy so širokou špecifitou, taktiež pripievajú ku prirodzenej rezistencii gramnegatívnych baktérií vypumpovaním rozmanitých zlúčenín, vrátane farbív, detergentov a antibiotík von z bunky¹⁹. Schweizer²⁰ tvrdí, že prítomnosť Mex efluxného systému u *Pseudomonas aeruginosa* je spolu s porínovými kanálmi vo vonkajšej membráne zodpovedná za vysokú prirodzenú rezistenciu tohto kmeňa voči antimikróbnym zlúčeninám v porovnaní s inými gramnegatívnymi baktériami. Prenášače môžu byť klasifikované podľa troch hlavných kritérií – zdroja energie, fylogenetických vzťahov a substrátovej špecifity. Na základe sekundárnych aktívnych prenášačov (antiport, symport a uniport) bolo opísaných desať rodín antibiotických efluxných púmp, rozdelených do piatich superrodín: SMR (small multidrug resistance), MET (multidrug endosomal transporter), MAR (multi antimicrobial resistance), RND (resistance nodulation division) a MFS (major facilitator superfamily). Efluxné pumpy majú špecifitu voči veľkému počtu substrátov, teda môžu interagovať so širokou škálou zlúčenín²¹. Ďalším mechanizmom znižujúcim citlivosť na biocídy je ich inaktivácia. U biocídov je tento jav pozorovaný zriedkavejšie ako v prípade antibiotík, no existujú dôkazy, že sa vyskytuje. Potvrdila sa inaktivácia fenolov a niektorých aldehydov pri rode *Pseudomonas*²².

Bola opísaná inaktivácia didecyldimetylamónium chloridu kmeňom *Pseudomonas fluorescens*²³ a tiež detoxifikácia triklozán u baktérií²⁴.

Gram-pozitívne baktérie

Bunková stena gram-pozitívnych baktérií je zložená prevažne z peptidoglykán a kyseliny teichovej. Ani jedna z týchto zložiek však nepredstavuje efektívnu bariéru pre vstup antiseptík a dezinfekčných látok do vnútra bunky. Ľahký prestup vysokomolekulárnych látok bunkovou stenou by teda mohol vysvetľovať citlivosť týchto organizmov na mnohé antibakteriálne agensy, vrátane kvartérnych amónnych zlúčenín a chlórhexidínu²⁵. V prírode existujú aj mukózne kmene s bunkovou stenou obalenou tenkou vrstvou. Nemukózne kmene sú inaktivované oveľa rýchlejšie ako mukózne chloroxylenolom, cetrimidom, chlórhexidínom²⁶.

Gram-negatívne baktérie

Vonkajšia membrána gram-negatívnych baktérií pôsobí ako bariéra limitujúca vstup mnohých chemicky odlišných typov antibakteriálnych látok. Zatiaľ čo nízkomolekulové hydrofilné molekuly prechádzajú do bunky porínmi, hydrofóbné molekuly prechádzajú cez vonkajšiu membránu. Medzi gramnegatívne baktérie, ktoré vykazujú necitlivosť na viaceré antiseptiká a dezinfekčné činidlá, patria *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Proteus spp.* a *Providencia stuartii*²⁷. Vonkajšia membrána *Pseudomonas aeruginosa* môže byť zodpovedná za pomerne vysokú odolnosť. V porovnaní s inými mikroorganizmami má iné zloženie lipopolysacharidov a tiež iný obsah kationov vonkajšej membrány¹⁷. Vysoký obsah Mg^{2+} iónov podporuje silné priečne väzby medzi lipopolysacharidmi. Naproti tomu *Pseudomonas stutzeri* je vysoko citlivý na mnohé antibiotiká a dezinfekčné činidlá, čo naznačuje, že takéto látky nemajú problémy pri prestupe vonkajšej membrány týchto mikroorganizmov²⁸. U zástupcov rodu *Proteus* bola pozorovaná vyššia odolnosť voči chlórhexidínu, kvartérnym amónnym zlúčeninám, EDTA a diamidínom²⁹. Dôvodom by mohla byť prítomnosť menej kyslých lipopolysacharidov vonkajšej membrány³⁰. *Burkholderia cepacia* obsahuje v lipopolysacharidoch vonkajšej membrány fosfátovanú arabinózu, čo znižuje afinitu tejto membrány voči polymyxínovým antibiotikám a iným kationovým alebo polykationovým molekulám¹⁸.

Znížená citlivosť na biocídy vyplývajúca z fenotypických zmien

Fenotyp bunky sa môže výrazne zmeniť v závislosti od prostredia, v ktorom sa nachádza. Fyziologická (fenotypová) adaptácia mikroorganizmov ako odpoveď na zmeny prostredia vedúca k zníženej citlivosti voči biocídom je tiež považovaná za mechanizmus rezistencie. Vyčerpanie živín ako signál indukujúci zvýšenie rezistencie

voči antimikrobiálnym látkam popísali viacerí autori^{3,4,31,32}. Rezistencia hladujúcich baktérií voči biocídom a antibiotikám môže prameniť zo zmien v bunkových obaloch, ktoré zvyšujú ich bariérové vlastnosti a bránia prístupu antimikrobiálnych látok k cieľovému miestu alebo je umožnená inými mechanizmami. Mikroorganizmy sú schopné sa zhlukovať na pevných povrchoch, čo vedie k tvorbe biofilmu. Baktérie v rôznych zónach biofilmu sú vystavené odlišným výživovým podmienkam a vykazujú iné fyziologické vlastnosti³³. Vo vnútri biofilmu znižuje obmedzenie výživy rastovú rýchlosť, čo môže ovplyvňovať citlivosť na biocídne látky^{34,35}.

Existuje viacero skutočností, ktoré vysvetľujú zníženie citlivosti baktérií vo vnútri biofilmu: obmedzený prístup látky k bunkám vo vnútri biofilmu, chemické interakcie medzi biocídom a biofilmom, tvorba mikroprostredia, produkcia degradujúcich enzýmov a neutralizujúcich zlúčenín, výmena genetického materiálu medzi bunkami biofilmu².

Napriek tomu, baktérie odobrané z biofilmu a rekultivované v médiu všeobecne nevykazovali zmenenú citlivosť^{33,36}. Znížená citlivosť na biocídy môže byť dôsledkom mutácie alebo nadobudnutia plazmidu, či transpozónu.

Plazmidom sprostredkované mechanizmy

Prvé dôkazy o kódovaní zníženej citlivosti na biocídy pomocou plazmidov sa týkali kovov, ako sú striebro, ortuť a organické ortuťnaté zlúčeniny. Bakteriálna rezistencia voči ortuti je nesená plazmidom, indukateľná a môže byť prenášaná počas konjugácie alebo transdukcie³⁷. Plazmidmi kódovaná rezistencia voči striebru bola zistená u *Pseudomonas stutzeri*³⁸, členov Enterobacteriaceae⁸ a *Citrobacter spp.*³⁹. Kovové zlúčeniny, ktoré vykazujú plazmidmi nesenú rezistenciu však nie sú v praxi bežne používané. Niektoré súčasné štúdie demonštrujú prítomnosť plazmidov v baktériách s nízkym stupňom rezistencie voči chlórhexidínu, kvartérnym amónnym zlúčeninám a trikozánu^{7,37,40}. Napriek tomu nebol potvrdený žiaden fyziologický podklad ani špecifický dôkaz, že by boli plazmidy do tohto procesu zahrnuté. Tieto mechanizmy sa najviac študovali u *Staphylococcus aureus*, u ktorého bolo dokázané, že niektoré biocídy (na základe MIC) vykazujú menšiu inhibíciu. Znížená citlivosť je tu sprostredkovaná skupinou štruktúrne príbuzných plazmidov kódujúcich qac gény⁴¹. Rodina génov qacAB kóduje protón-dependentné exportné proteíny, čo naznačuje významnú homológiu pre iné energeticky-dependentné transportéry, ako sú tetracyklínové prenášače objavené u tetracyklín-rezistentných baktérií⁴². Gény qacC a qacD kódujú identické fenotypy a vykazujú homológiu reštrikčných miest⁴³.

Znížená citlivosť na biocídy sprostredkovaná plazmidmi sa môže vyskytnúť aj pomocou iných mechanizmov. Jedným z nich je inaktivácia zlúčenín ortuti. Iným príkladom môže byť znížený príjem sprostredkovaný plazmidmi zodpovedný za rezistenciu voči striebru, i keď u niektorých mikroorganizmov, rezistentných voči tomuto

prvku a jeho zlúčeninám, dochádza ku akumulácii vysokých koncentrácií striebra, čo indikuje existenciu iných mechanizmov³⁹. Prítomnosť plazmidov u *Escherichia coli* poukázala na prepojenie s modifikovaním zloženia vonkajšej lipopolysacharidovej membrány a redukovaním množstva porínov, čo viedlo k zníženiu permeability pre cetrimidu a iné agensy⁴⁴.

Mutačná rezistencia voči biocídom

Antibiotiká obyčajne pôsobia na špecifické miesta vo vnútri bakteriálnej bunky. Mutácie, meniace tieto terčové miesta, sú častou príčinou vzniku rezistencie. Takéto cieľové miesta pôsobenia boli identifikované aj u niektorých biocídnych látok⁴⁵. Na rozdiel od antibiotík, v súvislosti s biocídnymi látkami existuje pomerne málo štúdií o úlohe mutácií pri vzniku rezistencie. *Serratia marcescens*, bežne inhibovaná pri 100 µg ml⁻¹ QAC, bola schopná adaptácie na rast pri 100000 µg ml⁻¹ (cit.⁴⁶). Rezistentné a citlivé bunky mali rôzne povrchové charakteristiky (elektroforetická mobilita), no rezistencia sa mohla stratiť pri raste na médiu bez QAC (cit.⁴⁷). Nedávne výskumy ukazujú, že mutácie v génoch kódujúcich efluxnú pumpu AcrAB u *Escherichia coli* a MexAB u *Pseudomonas aeruginosa* majú súvislosť so znížením citlivosti na biocídne látky^{20,48}.

Experimentálna časť

Cieľom výskumnej práce bolo overiť možnosť adaptácie vybraných baktérií na biocídy ich pasážovaním v tuhých médiách so subinhibičnou alebo so stúpajúcou koncentráciou biocídov. Boli použité nasledovné biocídy: chlornan sodný (NaClO) a chlórdioxid (ClO₂), tie nám poskytol podnik ZsVS a peroxid vodíka so striebrom (H₂O₂ s Ag) nám poskytol firma Sanosil Slovakia.

Použitie bakteriálne kmene nám poskytol STU Bratislava, mikrobiologické oddelenie, pochádzali z Českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej university v Brne. Boli použité bakteriálne kmene: *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*. Bol pripravený živný agar č. 2 na stanovenie antimikrobiálneho účinku postupom, že sme navázili a rozvarili agar a rozdávkovali sme po 20 ml do Erlenmayerových baniek a sterilizovali sme v autokláve 20 min pri teplote 121 °C. Sterilizovaný agar sme ochladili na 40 °C a pridali sme antimikrobiálnu látku, aby sme dosiahli požadovanú koncentráciu. Médium z baniek sme vyliali do sterilných Petriho misiek a nechali sme stuhnúť vo vodorovnej polohe.

Sledovali sme zmeny v citlivosti baktérií pri pasážovaní v prítomnosti subinhibičných koncentrácií biocídov. Bolo sledované prispôsobovanie sa baktérií zvyšujúcej sa koncentrácií biocídu v médiu. Pracovali sme v troch paralelných stanoveniach. Naočkovali sme baktérie na PM s agarom obsahujúcim koncentráciu biocídu rovnú

Tabuľka II

Pasážovanie baktérií^a na pevných médiách so stúpajúcou koncentráciou H₂O₂ s Ag

Koncentrácia H ₂ O ₂ s Ag [µg ml ⁻¹]	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
100	+	+	+	+	+	+
200	–	+	+	–	+	+
400	–	+	+	–	+	–
600	–	+	+	–	+	–
800	–	+	+	–	+	–
1000	–	+	+	–	+	–
1250	–	+	+	–	+	–
1500	–	–	–	–	–	–

^a+ rast; – nerast

0,5 MIC. Vyrastené kolónie sme preočkovali na médium s dvojnásobne vyššou koncentráciou biocídu. Takto sme postupovali, pokiaľ sú baktérie schopné adaptácie – rastu. Inkubovali sme pri 37 °C po 24 hodín.

Výsledky a diskusia

Pasážovali sme pôvodné kmene *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* a to naočkovaním na

LB-agar so subinhibičnou koncentráciou biocídov (100 µg ml⁻¹). Preočkovávaním vždy na médium s vyššou koncentráciou sme získavali kmene prispôsobené rásť na vyšších koncentráciách biocídov. Pracovali sme v troch paralelných stanoveniach a pasážovali sme suspendovaním kultúry vo fyziologickom roztoku a následným očkovaním sterilnými mikrobiologickými pipetami. Na vyššej koncentrácii biocídov už neboli schopné rastu. V prípade preočkovávania z PM na PM sme získali kmeň *Bacillus subtilis* schopný rásť pri koncentrácii 2200 µg ml⁻¹ NaClO, čo predstavuje 800násobné zvýšenie oproti pôvodnej MIC, ako vidieť v tab. II a III.

Tabuľka III

Pasážovanie baktérií^a na pevných médiách so stúpajúcou koncentráciou NaClO

Koncentrácia NaClO [µg ml ⁻¹]	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
100	+	+	+	+	+	+
200	+	+	+	+	+	+
400	+	+	+	+	+	+
600	+	+	+	+	+	+
800	+	+	+	+	+	+
1000	–	+	+	–	+	+
1250	–	+	+	–	+	+
1500	–	+	+	–	+	+
1700	–	+	+	–	+	+
2000	–	+	+	–	–	+
2200	–	–	–	–	–	+
2400	–	–	–	–	–	–

^a+ rast; – nerast

Tabuľka IV

Pasážovanie baktérií^a na pevných médiách so stúpajúcou koncentráciou ClO₂

Koncentrácia ClO ₂ [µg ml ⁻¹]	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
100	+	+	+	+	+	+
200	+	+	+	+	+	+
400	+	+	+	–	+	+
500	–	+	+	–	+	+
600	–	–	–	–	–	–

^a+ rast; – nerast

Zo získaných výsledkov vidieť, že najnižšiu rezistenciu vykazovali kmene *Escherichia coli* a *Enterococcus faecalis*. Kmeň *Bacillus subtilis* má pre rôzne biocidy značne odlišnú adaptáciu.

Kmene *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* vykazovali pre použité biocidy podobné schopnosti adaptácie rastu. V prípade kmeňov *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* a *Bacillus subtilis* bol najúčinnjším biocidom zo skúmaných biocidov peroxid vodíka so striebrom. Pre kmene *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Staphylococcus aureus* bol najefektívnejším biocidom chlórdioxid (tab. IV).

Záver

V práci sme sa venovali štúdiu vzniku rezistencie baktérií *Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* a *Bacillus subtilis* voči biocídnym látkam chlórnanu sodného, chlórdioxidu a peroxidu vodíka so striebrom a sledovali sme, či je táto rezistencia spojená so zníženou citlivosťou baktérií na vybrané biocidy. Výsledky práce možno zhrnúť nasledovne, že pasážovaním v médiách so stúpajúcou koncentráciou vybraných biocidov možno získať kultúru schopnú rásť až pri koncentrácii biocidov 2200 µg ml⁻¹ NaClO, čo predstavuje 800násobné zvýšenie oproti pôvodnej MIC.

Z vyššie uvedených štúdií však vyplýva, že neexistuje žiaden jednotný model vyjadrujúci vzťah medzi zníženou citlivosťou voči biocidom. Pozorovania sa potvrdzujú alebo vyvracajú v závislosti od povahy biocidu a taktiež od podmienok, za ktorých boli urobené.

LITERATÚRA

- Rutala, W. A.: Am. J. Infect. Control. 23, 313 (1995).
- McDonnell G., Russel A. D.: Clinical Microbiol. Rev. 12, 147 (1999).
- Brown M. R. W., Collier P. J., Gilbert P.: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 34, 1623 (1990).
- Gilbert P., Collier P. J., Brown M. R. W.: Antimicrobial Agents and Chemotherapy 34, 1865 (1990).
- Maillard J.-Y.: J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl. 92, 16S (2002).
- Kroll R. G., Patchett R. A.: Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser. 27, 189 (1991).
- Russell A. D.: Progress in Medicinal Chem. 35, 134 (1998).
- Silver S., Misra S.: Annu. Rev. Microbiol. 42, 711 (1988).
- Denyer S. P., Hugo W. B.: Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser. 27, 171 (1991).
- Lambert R. J. W., Joynson J., Forbes B.: J. Appl. Microbiol. 91, 972 (2001).
- Gilbert P., Barber J., Ford J.: Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser. 27, 155 (1991).
- Fuller S. J.: Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser. 27, 235 (1991).
- Russell A. D., Morris A., Allwood M. C.: Methods Microbiol. 8, 95 (1973).
- Eklund T., Nes I. F.: Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser. 27, 225 (1991).
- Beveridge E. G., Boyd I., Dew I., Haswell M., Lowe C. W. G.: Soc. Appl. Bacteriol. Tech. Ser. 27, 135 (1991).
- Beumer R., Bloomfield S. F., Exner M., Fara G. M., Nath K. J., Scott E.: Microbial resistance and biocides, A review by the IFH, (2000).
- Brown M. R. W.: The role of cell envelope in resistance, resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Wiley, Chichester 1975.
- Cox A. D., Wilkinson S. G.: Mol. Microbiol. 5, 641 (1991).
- Levy S. B.: J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl. 92, 65S (2002).
- Schweizer H. P.: Antimicrob. Agents Chemother. 42, 394 (1998).
- Van Bambeke F., Balzi E., Tulkens P. M.: Biochem. Pharmacol. 60, 457 (2000).
- Sondossi M., Rossmore H. W., Wiremann J. W.: J. Ind. Microbiol. 1, 97 (1986).
- Nishihara T., Okamoto T., Nishiyama N.: J. Appl.

- Microbiol. 88, 641 (2000).
24. Meade M.: *Detoxification of the widely used antibacterial agent, triclosan, discovered in bacteria*. Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology, Los Angeles 2000.
 25. Russell A. D.: Int. Biodeterior. Biodegrad. 36, 247 (1995).
 26. Kolawole D. O.: FEMS Microbiol. Lett. 25, 205 (1984).
 27. Russell A. D., Gould G. W.: J. Appl. Bacteriol., Symp. Suppl. 65, 167S (1988).
 28. Russell A. D., Mills A. P.: J. Clin. Pathol. 27, 463 (1974).
 29. Martin T. D. M.: J. Med. Microbiol. 2, 101 (1969).
 30. Vaara M.: Microbiol. Rev. 56, 395 (1992).
 31. Brown M. R. W., Williams P.: Annual Rev. Microbiol. 39, 527 (1985).
 32. Brown M. R. W., Barker J.: Trends Microbiol. 7, 45 (1999).
 33. Brown M. R. W., Gilbert P.: J. Appl. Bacteriol., Symp. Suppl. 74, 87S (1993).
 34. Cozens R. M., Brown M. R. W.: J. Pharm. Sci. 72, 1363 (1983).
 35. Stickler D. J., Dolman J., Rolfe S., Chawla J.: Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 8, 974 (1989).
 36. <http://www.erc.montana.edu/CBEssentials-SW/bf-basics-99/bbasics-01.htm>, stiahnuté 2.9.16.
 37. Russell A. D.: J. Appl. Microbiol. 82, 155 (1997).
 38. Haefeli C., Franklin C., Hardy K.: J. Bacteriol. 158, 389 (1984).
 39. Trevor J. T.: Enzyme Microb. Technol. 9, 331 (1987).
 40. Russell A. D.: J. Hosp. Infect. 6, 9 (1985).
 41. Tennent J. M., Lyon B. R., Midgley M., Jones J. G., Purewal A. S., Skurray R. A.: J. General Microbiol. 135, 1 (1989).
 42. Rouche D. A., Cram D. S., Di Berardino D., Littlejohn T. G., Skurray R. A.: Mol. Microbiol. 4, 2051 (1990).
 43. Littlejohn T. G., Di Berardino D., Messerotti L. J., Spiers S. J., Skurray R. A.: Gene 101, 59 (1990).
 44. Rossouw F. T., Rowbury R. J.: J. Appl. Bacteriol. 56, 63 (1984).
 45. Russell A. D., Day M. J.: Microbios 85, 45 (1996).
 46. Chaplin C. E.: J. Bot. 29, 373 (1951).
 47. Nicoletti G., Boghossian V., Gureviteh F., Borland R., Morgenroth P.: J. Hosp. Infect. 23, 87 (1993).
 48. Chuanchuen R., Beinlich K., Schweizer H. P.: Abstracts of the Annual Meeting of the American Society of Microbiology, Los Angeles 2000.

H. Ösziová and L. Birošová (*Department of Food and Nutrition, Department of Nutrition and Quality Assessment of Food, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava*): **Study of the Sensitivity of Microorganisms to Biocides**

The paper is devoted to the study of the resistance of *Salmonella enterica subsp. enterica serovar typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus subtilis* to biocidal substances, such as sodium hypochlorite, chlorine dioxide, and hydrogen peroxide containing silver. The interdependence between this resistance and a reduced sensitivity of these bacteria to the selected biocides was studied. The results can be summarized as follows: passaging in media with increasing concentrations of selected biocides can yield a culture capable of growing at as high concentrations of biocides as 2200 µg mL⁻¹ NaClO, which represents an 800-fold increase over the original MIC (minimum inhibitory concentration). It follows from the results, however, that there is no single model describing the relationship between the resistance and the reduced susceptibility to biocides. The results depend on the nature of the biocide, as well as on the conditions under which they are obtained.