

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Rezistence bakterií k desinfekčním prostředkům  
používaných v potravinářském průmyslu**

**Bakalářská práce**

**Yeldana Sadykova**

**Obor studia: Výživa a potraviny**

**Vedoucí práce: Ing. Roman Švejstl, Ph.D.**

© 2021 ČZU v Praze

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Rezistence bakterií k desinfekčním prostředkům používaných v potravinářském průmyslu" jsem vypracoval(a) samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor(ka) uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 3. 5. 2021

---

## **Poděkování**

Rád(a) bych touto cestou poděkoval(a) Ing. Romanu Švejtilovi, PhD. za odborné vedení, cenné rady, věnovaný čas při zpracování této bakalářské práce.

# Rezistence bakterií k dezinfekčním prostředkům používaných v potravinářském průmyslu

## Souhrn

Tato bakalářská práce zabývá se rezistencí bakterií k dezinfekčním prostředkům používaných v potravinářském průmyslu. Cílem této práce bylo zjistit citlivost různých rodů bakterií na různé koncentrace chlornanu sodného.

V první části práce jsou popsány dezinfekční prostředky, které jsou široce používány ve zdravotnictví, v potravinářství a je důležitou součástí kontroly šíření infekci, a také pro snížení kontaminace potravin a povrchů. Alkoholy, fenoly, chlor, kvartérní amoniové sloučeniny a další aktivní chemické látky (biocidy) jsou součástí těchto prostředků. Je známo mnoho způsobů působení antimikrobiálních látek, jsou často širokospektrální a mohou cílit na více míst oproti antibiotikům. Používají se v kombinaci s jinými látkami, tím lze zvýšit jejich aktivitu působení na mikroorganismy. Dále je v práci popsáno jejich využití v potravinářství, v chovu a ve spotřebních výrobcích.

V praktické části je testována citlivost čtyř vybraných kmenů bakterií (*E.coli*, *Salmonella* sp., *B.cereus* a *Serratia marcescens*) na různé koncentrace chlornanu sodného (NaClO), který je účinnou složkou dezinfekčního prostředku značky Savo.

Ze získaných výsledků lze odvodit, že efektivita účinné látky nezáleží na rodové příslušnosti testovaných kmenů, protože všechny byly citlivé na stejné koncentrace NaClO, a to konkrétně na koncentrace 94 a 9,4 mg/g, jejichž specifické růstové rychlosti se statisticky významně lišily ( $P < 0,05$ ) od kontroly (0 mg/g) i nižších koncentrací NaClO (0,94 a 0,094 mg/g), vůči kterým byly testované kmeny rezistentní.

**Klíčová slova:** bakterie; dezinfekce; mikroorganismy; sanitace; potravinářský provoz

# Resistance of bacteria to disinfectants used in food industry

## Summary

This bachelor thesis is focused on the resistance of bacteria to disinfectants used in the food industry. The aim of this work was to determine the sensitivity of different genera of bacteria to various concentrations of sodium hypochlorite.

The first part of the work describes disinfectants that are widely used in health care and food industry and are an important part of control of the infection spread, and to reduce contamination of food and surfaces. Alcohols, phenols, chlorine, quaternary ammonium compounds and other active chemicals (biocides) are part of these products. There are many ways how antimicrobials work, they are often broad-spectrum, and thus can target more sites of the cell than antibiotics. They are used in combination with other chemical substances, which can increase their activity on microorganisms. Furthermore, this work describes their use in food industry, animal husbandry, and consumer products.

In the practical part, the sensitivity of four selected species of bacteria (*E. coli*, *Salmonella* sp., *B. cereus* and *Serratia marcescens*) are tested against different concentrations of sodium hypochlorite (NaClO), which is an active component of “Savo” disinfectant.

The obtained results show that the efficacy of the active substance does not depend on the genus of the tested bacteria, as they were all sensitive to the same NaClO concentrations, namely 94 and 9.4 mg/g, their specific growth rates statistically significantly differed ( $P < 0.05$ ) from control (0 mg/g) and from lower concentrations of NaClO (0.94 and 0.094 mg/g) to which the tested strains were resistant.

**Keywords:** bacteria; disinfection; microorganisms; sanitation; food industry

# Obsah

1	Úvod .....	8
2	Cíl práce.....	9
3	Literární rešerše.....	10
3.1	Sanitace .....	10
3.2	Čištění .....	10
3.3	Dezinfekce.....	10
3.4	Účinky dezinfekčních prostředků na mikroorganismy .....	11
3.5	Dělení dezinfekčních prostředků z chemického hlediska.....	12
3.5.1	Alkoholy .....	13
3.5.2	Aldehydy.....	13
3.5.3	Halogeny.....	14
3.5.4	Cyklické sloučeniny .....	14
3.5.5	Kovy.....	15
3.5.6	Sloučeniny peroxygenů .....	15
3.5.7	Fenoly a bisfenoly .....	15
3.5.8	Kvartérní amoniové sloučeniny .....	16
3.6	Dezinfekční prostředky v potravinářském průmyslu .....	16
3.7	Použití dezinfekčních prostředků ve spotřebních výrobcích.....	17
3.8	Dezinfekční prostředky v chovech zvířat .....	17
3.9	Legislativa.....	17
3.10	Kontaminace z prostředí.....	18
3.11	Odolnost bakterií vůči dezinfekčním prostředkům v krmivech.....	18
3.12	Získaná odolnost .....	20
3.13	Mechanismy rezistence.....	21
4	Metodika.....	24
4.1	Materiál .....	24
4.1.1	Pomůcky .....	24
4.1.2	Přístroje.....	24
4.1.3	Chemikálie .....	24
4.1.4	Použité kmeny bakterií .....	24
4.1.5	Dezinfekční prostředek .....	25
4.2	Metodika.....	25
4.2.1	Příprava vzorku.....	25
4.2.2	Vyhodnocení.....	26
5	Výsledky.....	27

<b>6</b>	<b>Diskuse</b> .....	<b>28</b>
<b>7</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>30</b>
<b>8</b>	<b>Použitá literatura</b> .....	<b>31</b>

# 1 Úvod

Během posledního desetiletí se celosvětově zvýšila rezistence vůči antibiotikům díky různým mechanismům v bakteriálních patogenech, a nejen v patogenech (Maillard 2007). Existuje mnoha studií o rezistenci mikrobů vůči antibiotikům a biocidům, a tedy o vlivu na léčbu nemocí u lidí a zvířat. Byly hlášeny i případy zkřížené rezistenci mezi typy léčiv. Příkladem rezistence na antibiotika je bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, který vyvolává nemoc a následnou smrtelnost u lidí (Pang et al. 2019).

V mnoha oblastech sanitace je považována za zásadní krok k udržování požadovaného hygienického stavu. Důležitým postupem před dezinfekcí je čištění, které může odstranit většinu mikroorganismu a může mít vliv na účinnost dezinfekce. Existuje různé metody dezinfekce: chemická, fyzikální, biologická a fyzikálně-chemická. Chemická dezinfekce používá se proti bakteriím jako *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* a *Salmonella*, které jsou patogenem různých onemocnění. Látky obsažené v dezinfekčních prostředcích mohou mít různé účinky na kmeny mikroorganismu a jejich účinnost může být ovlivňována vnějšími a vnitřními faktory (pH, teplota atd.).

Zvyšující obavy o kontaminaci potravin, vedlo k zvýšení používání dezinfekčních prostředků. Podle Barbosa & Levy (2000) používání antimikrobiálních látek je předpokládanou hlavní hnací silou vzniku antimikrobiální rezistence.



## **2 Cíl práce**

Dezinfekční prostředky jsou nezbytnou součástí v každém potravinářském provozu. Jejich význam spočívá v likvidaci mikroorganismů, které by mohly kontaminovat suroviny při výrobě potravin.

Cílem práce je popsat různé typy dezinfekčních prostředků používaných v potravinářství a jejich vliv na mikroorganismy. V rámci praktické části bude proveden i menší pokus ověřující citlivost čistých bakteriálních kultur na vybraný dezinfekční prostředek. Hypotézou je, že citlivost bakterií se bude lišit v závislosti na rodovou příslušnost jednotlivých druhů.

### 3 Literární rešerše

Hlavním cílem této kapitoly je vysvětlení některých pojmů z oblasti dezinfekce a dezinfekčních prostředků, popisovat jejich hlavní účinky a obsahující látky.

#### 3.1 Sanitace

Rostoucí poptávka po potravinách živočišného původu vede k novým výzvám a požadavkům na účinnější program kontroly nemocí pro zajištění uspokojivou úroveň hygieny. Mokrý povrchy v potravinářských provozech jsou vhodným místem pro růst mikroorganismů (MO), a proto MO mohou i v malých koncentracích ovlivňovat výrobu a jakost produktu.

Rizika mikrobiální kontaminace zvyšují nároky na efektivnost sanitace (čištění, dezinfekce, dezinfekce a deratizace) a je nezbytná v potravinářských provozech. Sanitace je souhrn opatření nutných k odstranění nežádoucí kontaminace potravin a zajišťuje hygienické podmínky výroby potravin a bezpečnost personálu. Provádí se z důvodů zamezení výskytu nežádoucích MO, škůdců a vůně, tam kde jejich výskyt může způsobit technologické vady, kažení, onemocnění. V závislosti na typu nečistoty, které mohou být v různých formách a konzistencích bude se měnit postup sanitace. Každý potravinářský provoz musí určit si vlastní sanitační řád (Vítová, 2004).

#### 3.2 Čištění

Čištění je důležitým, přísně kontrolovaným a pravidelně opakujícím procesem, který má vliv na výsledek dezinfekce. Často se v potravinářství mechanické čištění doplňuje s chemickým (Vítová 2004).

Programy čištění by měly být prováděny co nejhospodárněji a nejpřímočařejší, což znamená co nejméně, v co nejkratším čase, s nízkými chemickými, energetickými a pracovními náklady, produkující co nejméně odpadu a bez poškození zařízení (Lelieveld 1985). Mechanická a chemická síla, teplota a doba kontaktu v režimu čištění by měly být pečlivě zvoleny tak, aby dosáhly odpovídajícího čistícího účinku (Czechowski & Banner 1992).

#### 3.3 Dezinfekce

Dezinfekce – přerušení cesty nákazy, odstranění původců infekce pomocí fyzikálních, chemických, fyzikálně-chemických způsobů (Votava 2005; Ministerstvo zdravotnictví). Cílem dezinfekce je snížit povrchovou populaci životaschopných mikrobů po vyčištění a zabránit mikrobiálnímu růstu na površích před zahájením výroby.

Biocidy – dezinfekční látky, které narušují strukturu MO nebo metabolické pochody.

Volba dezinfekce vyplývá ze znalostí cest a mechanismů šíření infekce, vnějších faktorů (pH, vlhkost, teplota...) a odolností MO. Spektrum působení a účinnost se na jednotlivé MO liší (viz. Tabulka 2). Nezbytné podle druhu kontaminace a materiálů zvolit správný dezinfekční prostředek správné koncentraci.

Dle Troller (1993) musí dezinfekční prostředek (DP): (1) být účinný za podmínek použití; (2) být bezpečný pro provozovatele, kteří jej používají; (3) neovlivňovat chuť ani vůni potravin; (4) být snadno spláchnutelný, nezanechávající toxické zbytky; a (5) se snadno používatelný.

Způsoby dezinfekce:

1. Fyzikální dezinfekce – usmrcení MO pomocí teploty, filtrace, ultrafialové záření.
2. Chemická dezinfekce – používají se biocidní a dezinfekční přípravky.
3. Fyzikálně-chemická dezinfekce – kombinace fyzikálních a chemických způsobů.

Účinný postup čištění a dezinfekce se skládá ze sledu oplachů a aplikací detergentů a DP v různých kombinacích teploty a koncentrace (Frank & Koffi 1990). Použití vody s dostatečným objemem a teplotou zvyšuje čisticí účinek.

Pozornost by měla být věnována také kvalitě zpracovatelské vody, páry a dalších přísad. Použití přísad špatné kvality snadno kazí sanitační proces. Kromě toho musí použité nástroje a metody rovněž vyhovovat procesu a personál musí být řádně vyškolen a odpovědný za udržení dobré úrovně hygieny (Mattila-Sandholm & Wirtanen 1992).

Systém mytí pouze čistou vodou však není praktický kvůli neúčinnosti. Pro zvýšení čisticího účinku se přidávají povrchově aktivní látky, které zachycují ulpívající částice a mikroby z povrchů ve vodě. Po výrobním běhu by mělo být zařízení demontováno a vyčištěno. Vyčištěné nádoby by mělo být skladováno na regálech a stolech, nikoli na podlaze (Mattila-Sandholm & Wirtanen 1992).

Použití účinných čisticích prostředků a DP na biofilmy (přípevněné k pevným povrchům shluky MO), které obtížné odstranitelné minimalizuje kontaminaci produktu, zvyšuje trvanlivost a snižuje riziko onemocnění přenášeného potravinami. Také bylo zjištěno, že MO v biofilmech vytvářejí toxiny, které mohou být transportovány do potravin, aniž by způsobily naočkování látky významným množstvím mikroorganismů (Troller 1993).

Čištění otevřených procesních povrchů a povrchů ve zpracovatelském prostředí se provádí buď pěnou nebo gelem. Pěnové jednotky jsou konstruovány tak, aby vytvořily pěnu s různou vlhkostí a trvanlivostí v závislosti na čištění, které má být provedeno. Aplikace gelů prodlužuje dobu kontaktu se znečištěnou plochou a lze ji použít s nízkotlakým systémem. Čištění se většinou provádí v kombinaci s konečnou dezinfekcí, protože na povrchu budou pravděpodobně životaschopné mikroby, které by mohly poškodit další výrobu. Kromě toho je zapotřebí dobré větrání v procesních zařízeních, aby bylo možné vysušit procesní zařízení a procesní linky (Wirtanen et al. 2000).

### **3.4 Účinky dezinfekčních prostředků na mikroorganismy**

Antimikrobiální látka je činidlo, které vymytí nebo brání rozvoji MO. Jejich klasifikace závisí na rolích, které vykonávají. Látky, které vymytí mikroby, jsou známé jako mikrobicidní, zatímco ty, které pouze brání jejich růstu, se nazývají mikrobiostatické. Vzhledem k tomu, že MO byly uznány jako příčinné činitele přenosných nemocí, došlo k zavedení různých způsobů snižování prevalence MO. Chemoterapie, imunizace, sterilizace a dezinfekce jsou některé z použitých metod (Omoruyi et al. 2011). Koncept DP a antiseptik je omezit nebo minimalizovat přítomnost MO. Aby se zabránilo infekcím, pokud jde o zranění, je nejdůležitějším opatřením zabít nebo inhibovat růst mikroorganismů na kůži, ranách a v dutině lidského těla (Awodele et al. 2007). Antimikrobiální potenciál DP by mohl být ovlivněn jejich formulačními vlastnostmi, koncentrací organických složek, teplotou, synergii, rychlostí ředění a experimentálními postupy (Denyer et al. 1985). Antimikrobiální činidla, jako jsou antibiotika (která ničí MO v těle) a

antiseptika (která napadnou MO spojené s živým tělem (vnější) a při použití na MO je činí neaktivními tím, že inhibují jejich množení), se zcela liší od dezinfekčních prostředků.

Jako DP se používá široká škála různých látek, včetně alkoholů, aldehydů, halogenů atd. Bakterie si tvoří bílkoviny známé jako heat-shock protein (HSP), které chrání bílkoviny před reakcemi, které by je mohly poškodit. Role HSP je významná, pokud jsou buňky ve stresu, např. zvýšení teploty v důsledku infekce. Při vysokých teplotách začnou bílkoviny ztrácet svou trojrozměrnou molekulární strukturu a začnou se shlukovat dohromady a vytvářet velké nerozpustné agregáty (Li & Srivastava 2003). Chlornan, chemická látka v chlorovém bělidle, má podobný účinek na bílkoviny jako tepelný stres, což vede k shlukování proteinů. Chlornan inaktivuje bílkoviny nezbytné pro růst bakterií, čímž zabíjí bakterie (Thompson 1986). Metylalkohol je převážně alkohol, i když je obecně uznáván jako DP kvůli své schopnosti v podstatě snížit kožní flóru, sterilizovat zařízení nebo povrchy a byl široce používán pro přípravu kůže před injekcí nebo operací (El-Mahmood et al. 2009). I když jsou všechny výše uvedené DP účinné, některé bakterie tvoří tvrdé endospory, které jim umožňují tolerovat drsné ekologické situace, a tím znečišťovat povrchy potravin a pracovních místností (Ray et al. 2004).

Dezinfekční prostředky nepronikají do biofilmové matrice ponechané na povrchu po neúčinném čisticím postupu velmi dobře, a proto nezničí všechny živé buňky v biofilmech (Carpentier & Cerf 1993). Dezinfekční prostředky jsou neúčinnější při absenci organického materiálu. Kupříkladu rušivé organické látky, pH, teplota, koncentrace a doba kontaktu obecně řídí účinnost DP (Mosteller & Bishop 1993). Dezinfekční prostředky musí být účinné, bezpečné a snadno se používají a musí být snadno opláchnout povrchy a nesmí zanechat žádné toxické zbytky nebo zbytky, které by ovlivňovaly senzorickou kvalitu výrobku.

### 3.5 Dělení dezinfekčních prostředků z chemického hlediska

Biocidy jsou obecně širokospektrální a často se používají v různých nastaveních. Předpokládá se, že mechanismy účinků jsou různé a cílí na cytoplazmatickou membránu, proteiny, DNA, RNA a další složky buněk MO.

Podle Votava (2005) nejčastěji používané mechanismy chemických látek jsou:

- oxidace (halogeny, oxidy, peroxidy, sloučeniny peroxigenů...).
- hydrolýza (kyseliny, louhy).
- tvorba soli s bílkovinami (kovy, halogeny).
- koagulace bílkovin (kovy, fenoly, alkoholy, aldehydy).
- změny permeability buněčné membrány (porucha membrány) způsobené KAS.
- inaktivace enzymů (kovy, fenoly, aldehydy).

Tabulka 1: Typy dezinfekčních prostředků v potravinářských procesech „upraveno podle Troller 1993“

Typy dezinfekčních prostředků	Výhody	Nevýhody	Použití
<b>Chlornany</b>	Levný, efektivní v širokém mikrobiálním spektru, snadné použití	Nestabilní, toxický, oxidační, korozivní, zapáchá, může dráždit pokožku	Hliníkový povrch, porézní povrch, nerezový ocel, povrch dlaždic, bakteriostatikum, kontrolu zápachu, oplachovací a chladicí voda
<b>Kvartéerní amonná činidla</b>	Nekorozivní, bez dráždivých účinků, žádná chuť a vůně	Neúčinné proti gramnegativním bakteriím, tvoří film, MO si mohou vyvinout rezistence	Hliníkový povrch, porézní povrch, nerezová ocel, povrchy dlaždic, bakteriostatikum, kontrola zápachu
<b>Jodoform</b>	Nekorozivní, snadné použití, bez dráždivých účinků, široké spektrum	Chuť a vůně, vytváří fialovou sloučeninu se škrobem	Hliníkový povrch, gumový povrch, nerezový ocel, betonový povrch, dopravní pásy, biofilm

### 3.5.1 Alkoholy

Ve skupině alkoholů ethanol, isopropanol a n-propanol jsou nejčastěji používané sloučeniny. Aktivita alkoholů je rychlá a širokospektrální, jsou účinné proti bakteriím, virům a houbám, avšak nejsou účinné vůči sporám. Alkoholy mohou zesilovat aktivitu jiných biocidů, např. kyseliny solné nebo formaldehydu. Účinnost závisí na koncentraci aktivní sloučeniny (70% ethanol působí baktericidně) a MO (Gerald 1999). Znalosti o specifickém způsobu účinku alkoholů jsou omezené z důvodů jejich toxicity, avšak primárním způsobem účinku je denaturace a koagulace bílkovin a projeví se v přítomnosti vody. To ovlivňuje strukturu a funkci membrány, což vede k uvolňování intracelulárních složek, rušení buněčného metabolismu a buněčných funkcí a následně buněčné lýze (Dupuy 1998). Alkoholy jsou široce používány pro dezinfekci rukou, kůže a tvrdého povrchu v prostředí zdravotní péče (Danmap 2014).

### 3.5.2 Aldehydy

Hlavními aldehydy používanými jako biocidy formaldehyd (monoaldehyd) a glutaraldehyd (dialdehyd). Jsou to velmi aktivní sloučeniny a mají široké spektrum účinku, včetně bakterií, bakteriálních spor, hub a virů. V nemocnicích se používají k dezinfekci

zařízení, jako jsou endoskopy. Formaldehyd je reaktivní sloučenina, která může integrovat s DNA, RNA a proteiny připojením volných amino skupin, primárním amidů a může křížové připojovat s nukleovou kyselinou (Gerald 1999). Glutaraldehyd také způsobuje křížové propojení amino skupin v bílkovinách a inhibuje transportní procesy do buňky (Maillard 2007).

### 3.5.3 Halogeny

Mechanismus účinku je založen na oxidačních reakcích. Jsou dobře účinné proti bakteriím, kvasinkám, plísním.

Sloučeniny jodu.

Intenzivní a rychlý, nízká toxicita. Nevýhodou je pomalá rozpustnost anorganického jodu ve vodě. Proto se nejvíc využíván jodofor, ve kterém jod navázaný na povrchově aktivní organický polymer, který je nosičem jodu. Jodofor je méně toxický, bez dráždivých účinků, rychle působí a může být používán jako antiseptikum (Votava 2005).

Sloučeniny chloru.

Nejdůležitější látky ve skupině obsahující chlor tvoří chlornan, oxid chloričitý, dichlorisokyanurát sodný a chloramin-T. Tyto sloučeniny jsou vysoce oxidační a mají široké spektrum aktivity, včetně bakterií, virů a spor. Jejich primární použití je v dezinfekci tvrdého povrchu. Z těchto sloučenin je chlornan sodný jedním z nejpoužívanějších chemických DP a je široce používán v potravinářském průmyslu, stejně jako pro dezinfekci povrchů a nástrojů v nemocnicích. Specifické antimikrobiální působení látek obsahující chlor však není dobře pochopeno, vzhledem k jejich silnému oxidačnímu potenciálu se předpokládá, že tyto sloučeniny reagují s bílkovinami a enzymy (thiolové skupiny jsou obzvláště považovány za cíle) (Hammerum 1998). Účinek chloraminů možno zvýšit přidáním kvarterní amoniové soli.

Chlornan sodný velmi účinný proti druhům hub jako *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium commune*, *P. polonicum* a *P. roqueforti* a dalších, a to i v přítomnosti organických látek, které mohou ovlivňovat jeho účinek. Chlor působí i při nízkých teplotách, je levný a na površích zanechává jen malé skvrny a filmy. Ve výsledku je to jedna z nejčastěji používaných sloučenin v sanitačních systémech a je považována za jednu z nejlepších alternativ pro potravinářský průmysl (Bernardi et al. 2018).

### 3.5.4 Cyklické sloučeniny

Cyklické sloučeniny působí baktericidně, někdy fungicidně. Chlorhexidin je dvojmocné, kationtová sloučenina. Vzhledem ke své nízké rozpustnosti ve vodě se tato sloučenina často vyrábí jako anorganická sůl, např. chlorhexidin glukonát, aby se zvýšila rozpustnost sloučeniny. Chlorhexidin je baktericidní, ale není příliš fungicidní a aktivní proti některým virům a sporám bakterií (Aarestrup et al. 2000). Bakterie se mohou stát rezistentní. Chlorhexidin představuje jeden z nejpoužívanějších biocidů pro dezinfekci kůže a sliznice ve zdravotnictví. Používá se také v zemědělství pro přímé použití na domácí zvířata. Chlorhexidin a alkoholy se často používají společně pro dezinfekci kůže v důsledku rychlého účinku alkoholů a zbytkového účinku chlorhexidinu (Maillard 2007). Přes své výhody je aktivita chlorhexidinu závislá na pH a významně se snižuje, pokud je přítomna organická hmota (Russell & Day 1993). Soli chlorhexidinu disociují při fyziologickém pH a uvolňují kladně nabitý kation sloučeniny. Baktericidní aktivita je způsobena vazbou kationtové molekuly na záporně nabitě bakteriální

buněčné stěny. To má bakteriostatický účinek při nízkých koncentracích chlorhexidinu a při vysokých koncentracích způsobuje destrukce membrány zničení buňky (Leikin & Paloucek 2008).

### 3.5.5 Kovy

Síran měďnatý ( $\text{CuSO}_4$ ) je nejpoužívanější sloučenina mědi a používá se k dezinfekci kopyt domácích zvířat. Dalším používaným kovem je stříbro. Nejdůležitějšími sloučeninami stříbra využívanými pro dezinfekci jsou dusičnan stříbrný ( $\text{AgNO}_3$ ) a sulfadiazin stříbrný ( $\text{AgSD}$ ), které se používají k prevenci infekcí při popáleninách. Předpokládá se, že  $\text{Cu}^{2+}$  působí na thiolovou skupinu enzymů a bílkovin a způsobuje celkovou koagulaci cytoplazmatických složek (Aarestrup et al. 2000).  $\text{Ag}^+$  může také interagovat se skupinami thiolů v enzymech a bílkovinách a reagovat s nukleovými kyselinami. Cytoplasmická membrána, která obsahuje mnoho důležitých enzymů, je považována za důležité cílové místo pro  $\text{Ag}^+$  (McDonnell 1999).

### 3.5.6 Sloučeniny peroxygenů

Nejdůležitějšími sloučeninami patřícími do skupiny peroxygenů jsou peroxid vodíku (PV) a kyselina peroctová (PAA). PV je silná oxidační sloučenina se širokým spektrem aktivit proti MO, včetně bakterií, virů, kvasinek a bakteriálních spor. Je široce používán pro dezinfekci a sterilizaci. PV jedním z nejvíce využívaných biocidů pro dezinfekci zařízení pro manipulaci s potravinami v potravinářském průmyslu. PV se také používá pro účely veterinární hygieny, včetně dezinfekce míst, ve kterých jsou zvířata umístěna (včetně celých stájí), držena nebo přepravována, aby se snížila zátěž MO a zabránilo hromadění a šíření chorob. PV napadá buňky tvorbou volných hydroxylových radikálů ( $\cdot\text{OH}$ ), což jsou vysoce reaktivní molekuly díky svým silným oxidačním vlastnostem. Mohou reagovat a zničit důležité buněčné složky, jako jsou membránové lipidy, DNA, ribozomy, enzymy a bílkoviny (Lassen et al. 2001). PAA se obecně používá ke snížení houbového znečištění vzduchu a často se používá v průmyslových procesech. Tato chemická látka má širokou škálu působení, rychle inaktivuje MO a funguje na základě pravidel oxidace buněčné membrány a poškozuje enzymatický systém, toxikologicky stabilní kyselý DP (McDonnell et al. 2002). PAA je dobrým řešením proti hub *Cladosporium sp.* i při nízkých dávkách (Bernardi et al. 2018).

### 3.5.7 Fenoly a bisfenoly

Podle McDonnella (1999) jsou sloučeniny fenolového typu širokospektrální antimikrobiální léky s antibakteriálními, antifungálními a antivirovými účinky. Již dlouho se používají pro antiseptické, dezinfekční a konzervační účely. Nejdůležitějšími bisfenolovými sloučeninami jsou triclosan a hexachlorofen, které se široce používají pro antiseptická mýdla a ruční oplachování. Triclosan se také používá v průmyslu a je začleněn do různých produktů, včetně hraček, zubní pasty, kosmetiky a deodorantů. Předpokládá se, že způsob účinku těchto sloučenin je narušení cytoplazmatické membrány způsobující rychlé uvolňování intracelulárních složek (Jaglic et al. 2012).

### 3.5.8 Kwartérní amoniové sloučeniny

Patří do skupiny kationických povrchově aktivních látek. Mezi nejdůležitější sloučeniny ve skupině kvartérní amoniové sloučeniny patří benzalkoniumchlorid a cetrimid. KAS působí na buněčnou membránu, mění její propustnost a způsobují vyčerpání buněk v důsledku stimulace glykolýzy. Kvůli jejich nedostatečné účinnosti proti *P. commune* a *P. roqueforti* nemohou být použity v sýrovém průmyslu, ale to může záležet na kmene (Bernardi et al. 2018). Používají se k dezinfekci prostor, kde jsou zvířata umístěna, držena a přepravována např. podlahy, stěny a dopravní prostředky. Používají se také k dezinfekci míst pro manipulaci s potravinami, včetně podlah, stěn a inventáře. KAS jsou membránově účinné sloučeniny; jejich hlavním cílem je cytoplazmatická membrána. Předpokládá se, že mechanismus účinku těchto sloučenin je adsorpce na buněčnou stěnu a její difúze následovaná interakcí s cytoplazmatickou membránou a narušením, která způsobuje uvolňování buněčných složek a srážení obsahu buněk a jejich lýza (Ceragioli et al. 2010).

Tabulka 2: Účinnost aktivních látek (Soukupová)

Aktivní látka	Bakterie		Viry		Houby, plísňě	Spory bakterií
	Gram+	Gram-	Obalené	Neobalené		
<b>Chlor</b>	++	++	++	++	++	+
<b>Glyoxal</b>	++	++	+	0	0	0
<b>Glutaraldehyd</b>	++	++	++	++	++	++
<b>Formaldehyd</b>	++	++	++	++	++	+
<b>Alkohol</b>	++	++	+	+	+	0
<b>KAS</b>	++	+	+	0	+	0
<b>Peroxosloučeniny</b>	++	++	++	++	++	++
<b>Peroxokyseliny</b>	++	++	++	++	++	++
<b>Fenoly</b>	++	++	++	0	++	0
<b>Guanidin</b>	++	++	+	+	++	0

++ - účinná + - částečná účinná 0 - neúčinná

### 3.6 Dezinfekční prostředky v potravinářském průmyslu

Zvýšení koncentrace zvířat vedlo k novým výzvám a požadavkům na účinnější programy kontroly nemocí, které by zajistily uspokojivou úroveň hygieny. Dezinfekce je nezbytnou součástí prevence a kontroly přenosu chorob mezi zvířaty. Biocidy jsou široce používány pro čištění a dezinfekci prostorů spojených s živými zvířaty, včetně hospodářských budov, ložního prádla, vybavení a dopravních prostředků (Sidhu et al. 2002). Podle zprávy dánské (2012) se biocidy používají přímo na zvířatech, např. v kopytech, aby se zabránilo infekčním kožním chorobám a čištění vemene a struků velké množství biocidů se také používá v oblastech výroby a zpracování potravin, včetně dezinfekce zařízení, strojů, kontejnerů, podlah, stěn a dekontaminace jatečně upravených těl, aby se vymýtilo a zabránilo šíření nežádoucích



mikroorganismů. Biocidy se také používají pro konzervační účely k prodloužení trvanlivosti výrobků a k potlačení kontaminace nebo kažení potravin.

### **3.7 Použití dezinfekčních prostředků ve spotřebních výrobcích**

Podle Bjorland et al. (2005) se biocidy používají jako konzervační látky v řadě produktů, včetně produktů pro osobní péči a kosmetiky, aby se zabránilo růstu mikroorganismů. Biocidní sloučeniny se přidávají do kosmetických přípravků, aby se zabránilo kontaminaci přípravku spotřebitelem během používání, výrobě a skladování.

Biocidy se, kromě výše uvedené oblasti používají pro řadu dalších účelů přispívajících k lidskému zdraví a blahobytu, jako jsou dezinfekce odpadních vod, bazénů a konzervačních prostředků v barvách a textilu.

Pokroky ve zpracovatelských technikách, konzervaci a balení umožnily ovocnářskému a zelenářskému průmyslu soustavně dodávat spotřebitelům širokou škálu produktů po celý rok v mnohem větším množství. Čerstvé ovoce a zelenina mohou být kontaminovány patogenními mikroorganismy prostřednictvím pěstitelských postupů, manipulace a zpracování (Tournas 2005). Vzhledem k tomu, že při prvotním zpracování zeleniny se často nevyužívá konzervační metod, existuje potenciálně větší riziko kontaminace a zhoršení produktu mikrobiálními populacemi (Thomas & O'Beirne 2000).

Vzhledem k tomu, že poptávka po zelenině a jiných plodinách stále roste, zvyšuje se také potřeba sladkovodních zdrojů, které by zajistily zavlažování. To může být obzvláště problematické pro sladkovodní zdroje, které přicházejí do styku s oblastmi, kde jsou velké živočišné provozy nebo velký počet pasoucích se zvířat (Kaferstein 2003).

### **3.8 Dezinfekční prostředky v chovech zvířat**

Čištění a dezinfekce je důležitou součástí prevence a kontroly chorob a zoonóz. Rutinní dezinfekce, někdy nazývaná obecná dezinfekce, vyžaduje široké spektrum antimikrobiální aktivity v boji proti široké škále nespecifikovaných organismů. Obecná dezinfekce se provádí na farmách, stejně jako na prodejních stodolách, výstavištích, karanténních stanicích, zoologických parcích, jatkách, drůbežářských a rybích líhních a závodech na zpracování potravin (Gosling 2018).

### **3.9 Legislativa**

Není pochyb o tom, že používání biocidů poskytuje řadu výhod a přispívá k lidskému zdraví a blahobytu. Biocidy se staly neocenitelnými prostředky a je nesmírně důležité, aby zůstaly účinné při kontrole nežádoucích mikroorganismů v různých aplikacích. Rozšířené používání biocidů však vedlo k obavám ohledně vzniku bakterií se sníženou citlivostí k biocidům a jejich potenciální úlohy při vývoji antimikrobiální rezistence u bakterií (Maillard 2007). V posledních letech bylo sestaveno několik stanovisek vědeckých výborů a Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA), aby byl sjednocen přístup k rizikům vzniku rezistence vůči biocidům a křížové rezistence vůči terapeutickým antimikrobiálním lékům (SCENIHR, 2009).

Vážné obavy z vývoje rezistence vůči biocidům a/nebo antimikrobiálním činitelům v důsledku používání biocidů přispěly k nařízení (nařízení (EU) č. 528/2012) k současné směrnici (98/8/ES) Pro povolení nového biocidního přípravku v EU musí být předloženy údaje prokazující, že dotčený přípravek je účinný a nevyvolává rezistenci vůči biocidům nebo antimikrobiálním činitelům. To vedlo k přípravě "Revize společného pokynu AFC/BIOHAZ o předkládání údajů pro ocenění bezpečnosti a účinnosti látek pro odstranění mikrobiální povrchové kontaminace potravin živočišného původu určených k lidské spotřebě" z EFSA. Cílem dokumentu je poskytnout žadatelům pokyny k předložení nezbytných údajů pro hodnocení bezpečnosti pro spotřebitele a životní prostředí, včetně účinku zbytkových koncentrací biocidů, kromě účinnosti látek pro odstranění/snížení mikrobiální povrchové kontaminace potravin živočišného původu. To zahrnuje nezbytné informace pro vyhodnocení možného vzniku získané snížené citlivosti na biocidy a/nebo rezistence vůči terapeutickým antimikrobiálním účinkům (EFSA 2010).

### **3.10 Kontaminace z prostředí**

Kontaminace čerstvých produktů může nastat prakticky kdekoli během výrobního procesu. Mnoho sporotvorných bakterií, jako je *Clostridium botulinum*, *C. perfringens* a enterotoxigenní *Bacillus cereus*, se nachází v půdě a může být přirozeně přítomno na některých plodinách (Beuchat & Ryu 1997). Jiné druhy bakterií nebo virů na čerstvých produktech mohou být zaneseny přímým kontaktem s fekálním materiálem nebo odpadními vodami používanými k zavlažování. Použití surového zvířecího hnoje jako hnojiva může zvýšit přítomnost mikroorganismů i na ovoci a zelenině (Crane et al. 1983). Dalším zdrojem předsklizňové kontaminace, která je často přehlížena, je kontakt s divokými nebo domácími zvířaty. Je například známo, že volně žijící ptáci potenciálně obsahují bakteriální patogeny přenášené potravinami, včetně bakterií rodu *Campylobacter* a *Salmonella* (Luechtefeld et al. 1980). Kontakt s fekálním materiálem těchto zvířat může vést ke kontaminaci rostlinných plodin.

Zvláštní zemědělské postupy, jako je používání zvířecího hnoje narozdíl od chemických hnojiv, mohou být faktorem při výskytu těchto patogenů přenášených potravinami do čerstvých produktů (Tauxe et al. 1997).

Salmonely se běžně nacházejí v gastrointestinálním traktu mnoha zvířat, jako jsou ptáci, plazi, hospodářská zvířata a lidé. Většina případů salmonelózy byla dříve připisována konzumaci kontaminované drůbeže a drůbežích produktů (Tauxe et al. 1997). Rostoucí počet ohnisek ve Spojených státech amerických s bakteriální kontaminací je primárně způsoben salmonelou (Harris et al. 2003).

### **3.11 Odolnost bakterií vůči dezinfekčním prostředkům v krmivech**

Rezistence vůči antibiotikům se vyskytuje v mnoha odvětvích, od akvakultury, zpracování potravin a zdravotní péče až po volně žijící živočichy, zvířata v zájmovém chovu a zvířata v produkčních chovech (Landers et al. 2012). Zemědělský průmysl spoléhá na používání antimikrobiálních látek ke zlepšení zdraví a produktivity zvířat, zejména u intenzivně chovaných druhů (Moyane et al. 2014). Proto je objem využití antimikrobiálních látek v průmyslu srovnatelný s objemem využití v medicíně. Je znepokojivé, že mnoho

antimikrobiálních léků, které jsou považovány za důležité pro lidské zdraví, se používá v chovech zvířat, jako jsou tetracykliny, peniciliny a sulfonamidy.

Nadužívání a nevhodné používání antimikrobiálních látek v chovu zvířat vytvořilo obrovský seleční tlak, který zvyšuje a urychluje pravděpodobnost, že se bakterie přizpůsobí a pomnoží, aby vytvořily odolnější populaci. Šíření odolnosti vůči antibiotikům je usnadněno vysokou hustotou zvířat zapojených do prvovýroby (Aminov & Mackie 2007). Toto využívání antibiotik v nízké koncentraci po delší dobu podporuje vznik rezistence proti antibiotikům. Četné studie ukázaly, že používání antibiotik u zvířat na výrobu potravin, zejména pro neterapeutické použití, je spojeno s rezistencí u lidí, kteří žijí na farmách a v jejich blízkosti, a dokonce i u běžné populace prostřednictvím potravinového řetězce (Marshall & Levy 2011). V důsledku je zemědělský průmysl považován "hotspot" odolnosti vůči antibiotikům.

Aby výrobci potravin udrželi krok s obrovským rozsahem celosvětové produkce potravin a omezenými zdroji, použili nové technologie a alternativní výrobní metody k industrializaci a optimalizaci výroby potravin. Příkladem je použití antibiotik jako doplňkových látek v krmivech ke zvýšení růstu zvířat, dokud se neobjevily „superbugs“. V důsledku tohoto stavu byla antibiotika na úrovni farem zakázána (Koluman & Dikici 2013).

V souladu s nařízením (ES) č. 1831/2003 by měl být striktně dodržován a řádně vymáhán zákaz používání antibiotik jakožto látek podporujících růst platný od 1. ledna 2006.

Kromě antibiotik mohou podporovat šíření rezistence i těžké kovy jako Cd, Hg, Cu a Zn. Tyto kovy mohou se akumulovat v selektivních koncentracích v půdě, vodě a spustit tzv. koselekcí, kdy kromě rezistence vůči antibiotikům plazmidy poskytují také rezistenci vůči těžkým kovům, například mědi nebo stříbru. Proto ke zpomalení šíření rezistence je třeba přijmout další opatření (Seiler & Berendonk 2012).

Propojení rezistentních bakterií ze zvířat s lidmi není jednoduché, protože existuje mnoho možných způsobů přenosu. Přímé transferové trasy zahrnují kontakt se zvířaty v zájmovém chovu nebo kontakt s volně žijícími živočichy. Nepřímé přenosové cesty zahrnují kontaminaci půdy, řek a potoků zemědělskými odpadními vodami a šířením hnoje. Ty následně kontaminují plodiny a vodu používanou k pití a přípravě potravin. Nicméně, potravinový řetězec byl považován za hlavní cestu přenosu bakterií rezistentních vůči antibiotikům na člověka (Phillips et al. 2004).

Potenciální ohrožení lidského zdraví nadužíváním antibiotik u hospodářských zvířat je významné. Jeho dopad nebyl plně doceněn kvůli nedostatečnému výzkumu a dokumentaci (Landers et al. 2012). Četné studie však spojují rezistence proti antibiotikům u potravinářských zvířat s infekcemi rezistentními vůči antibiotikům u lidí (Marshall & Levy 2011). Mezi nejidentifikovanější patogeny přenášené potravinami, které byly spojeny s geny bakteriální rezistence u lidí a hospodářských zvířat, patří meticilin rezistentní stafylokoky (MRSA), *E. coli*, salmonely a enterokoky (Marshall & Levy 2011). Zoonózy jsou nákazy, které se mohou přenášet ze zvířat na člověka. Zoonotické infekce představují přibližně 60 % všech lidských onemocnění a 75 % nově se objevujících infekčních nemocí (Benon et al. 2018). Například Graham et al. (2009) zjistili, že izoláty enterokoků a stafylokoků z much v blízkosti drůbežářských farem nesly podobné rezistence na antibiotika jako izoláty z drůbežního podestýlky na farmách.

Patogeny přenášené potravinami rezistentní vůči antibiotikům u zvířat produkujících potraviny se mohou šířit na člověka konzumací kontaminovaných potravin nebo vody a přímým

kontaktem se zvířaty (McNulty et al. 2016). Existují různé fáze a interakce v potravinovém výrobním řetězci, ve kterém mohou vstoupit bakterie rezistentní vůči antibiotikům. Za první, ve fyzickém prostředí, jako je půda, vzduch a voda, se rezistentní organismy mohou šířit ze zvířat. Příkladem je spotřeba vody, která je kontaminována kvůli rezistentním bakteriím z živočišného odpadu, který se používá jako hnojivo. Na farmě by mohl být přímější přenos rezistentních bakterií mezi zvířaty ve stádě a zvířaty v těsné blízkosti, jakož i mezi zemědělci a jejich zvířaty (Landers et al. 2012).

Bakterie v potravinách, které jsou nositeli rezistence, budou navíc pravděpodobně perzistentní v potravinářských komoditách kvůli své celkové odolnosti vůči jiným environmentálním stresorům, jako jsou konzervační látky a dezinfekční prostředky. To je způsobeno indukci *mar operonu* (multiple antibiotic resistance operonu) v důsledku vystavení environmentálnímu stresu. *Mar operon* reguluje expresi mnoha genů, včetně těch, které kódují různé mechanismy rezistentní vůči antibiotikům (McMahon et al. 2007). Proto může mít odolnost bakterií vůči antibiotikům vliv na jejich přetrvávání bakterií kvůli jejich schopnosti odolat účinkům různých environmentálních stresorů.

Problémem lidského zdraví je přenos bakterií rezistentních vůči antibiotikům v potravinách na člověka a následná kolonizace lidského střeva. To zdůrazňuje význam správné manipulace s potravinami a přípravy ze strany spotřebitelů, aby se zabránilo přenosu, protože přítomnost bakterií rezistentních vůči antibiotikům by mohla nepříznivě ovlivnit budoucnost lidského zdraví, protože některé infekce se obtížně léčí nebo pokud dojde k infekcím, pokud jsou požitý patogení bakterie rezistentní vůči antibiotikům (Bester & Essack 2010).

Během výroby potravin by zpracovatelské kroky, jako jsou zemědělské činnosti, porážkové postupy a přeprava potravinářských zvířat, mohly zavést do potravinového řetězce rezistentní bakterie (McEwen & FedorkaCray 2002). Stříkání jatečně upravených těl masa roztoky organických kyselin za jejich dekontaminace může vést k přežití patogenů rezistentních vůči kyselinám. To by následně mohlo zkřížit kontaminaci potravin a "kolonizovat" prostředí výroby potravin, což by podkopalo účinnost čištění a sanitace (Berry & Cutter 2000). Kontaminace během přípravy potravin a konzumace kontaminovaného masa a jiných potravinářských výrobků navíc vede k přímější přenosové cestě bakterií rezistentních vůči antibiotikům. Zbytková antibiotika v syrovém mase by mohla vést k rozvoji bakterií rezistentních vůči antibiotikům v lidském střevě (Kjeldgaard et al. 2012).

### **3.12 Získaná odolnost**

Podle Bockstael & Van Aerschot (2009) je rezistence vůči antimikrobiálním látkám běžným a rostoucím problémem u mnoha důležitých lidských patogenů. Hlavní mechanismy, kterými bakterie získávají odolnost vůči terapeutickým antimikrobiálním účinkům, zahrnují; (1) cílová změna, (2) neproniknutelnost, (3) enzymatická modifikace nebo zničení sloučeniny a (4) aktivní eflux. Vzhledem k tomu, že antimikrobiální činidla mají obecně specifické cílové místo v buňce, může získání jednoho z těchto mechanismů způsobit, že bakterie jsou rezistentní i vůči dalším sloučeninám, které mají stejný nebo podobný mechanismus účinku.

Příkladem vzniku rezistencí je používání triclosanu. Triclosan je širokospektrální antimikrobiální látka používaná v mýdlech na ruce, krémech, oděvech, plastech a zubních pastách a je nejběžněji používaným bisfenolem za posledních 30 let. Některé studie naznačují,

že v případě triclosanu může nesprávné podávání zvolit širší rezistenci (Schweizer 2001). Triclosan působí v nízkých koncentracích podobně jako antibiotika na konkrétní buněčný cíl, enoyl-acylovou nosnou proteinovou reductázu (FabI), důležitý enzym při syntéze bakteriálních mastných kyselin (Ciusa et al. 2012).

Nedávno byl v klinických izolátech *S. aureus* objeven nový mechanismus pro sníženou náchylnost k triclosanu. Byla identifikována další kopie genu *fabI*, který pravděpodobně pochází ze *Staphylococcus haemolyticus*, která byla získána pomocí plazmidového přenosu plazmidů s genem kódujícím rezistenci. Autoři dále vyhledáváním v databázi zjistili, že *S. haemolyticus* verze genu *fabI* byla přítomna v různých stafylokociích, včetně *S. aureus* a *Staphylococcus epidermidis*, ve kterých byl další gen *fabI* umístěn na plasmidech spolu s genem *qacA*. To naznačuje, že tento nový mechanismus pro sníženou náchylnost k triclosanu se aktivně přenáší mezi stafylokoky (Ciusa et al. 2012).

Jak již bylo zmíněno, biocidy budou mít pravděpodobně více nespecifických cílových míst v buňce a snížená náchylnost k biocidům zprostředkovaná mutací je vzácná. Enzym enoyl-ACP reductáza, kódovaný genem *fabI*, je však specifickým cílovým místem pro triclosan (Saleh et al. 2011). Změny cílového místa zprostředkované mutací, které snižují inhibiční účinek triclosanu a zvýšená exprese *fabI*, byly popsány jako mechanismy, které mají za cílovou náchylnost ke triclosanu (Skovgaard et al. 2013).

Je známa i snížená citlivost na formaldehyd. Byla zjištěna mezi klinickými izoláty *Enterobacteriaceae* a kontaminovanými dezinfekčními roztoky. Glutathion-dependentní formaldehyddehydrogenáza kódovaná genem *adhC* na plazmidu pVU3695 je zodpovědná za toleranci formaldehydu vůči *Escherichia coli* VU3695 (Kummerle et al. 1996). Kromě toho byla prokázána křížová rezistence mezi antibiotiky a DP u *E. coli*.

Langsrud et al. (2003) objevil kmeny *Serratia marcescens* v koupeli na nohy v potravinářském průmyslu, které mohou přežívat v amfoterních biocidech. Nebylo jasné, zda byl odpor přirozený nebo získaný.

### 3.13 Mechanismy rezistence

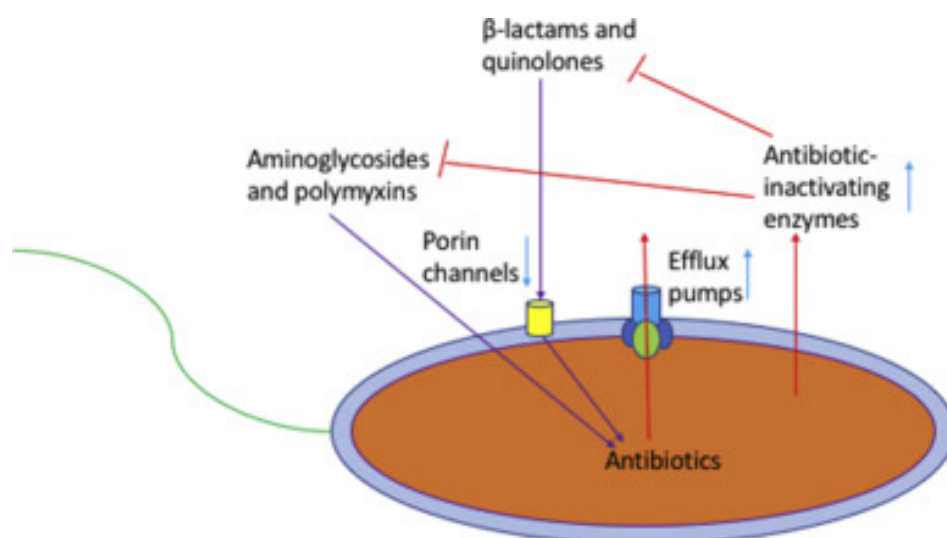
Od počátku 60. let 20. století narůstají problémy spojené s růstem a rozvojem rezistence na antibiotika, které jsou nyní považovány za významné nebezpečí pro klinickou praxi. Hlavní příčinou tohoto problému bylo a stále je rozšířené nesprávné používání a předepisování antibiotik v klinické i veterinární medicíně (Gilbert & McBain 2003).

Antibiotika byla poprvé použita v klinických studiích ve 40. letech 20. století, ačkoli sulfonamidy syntetizovány a používány ještě dříve. Po penicilinu byly vyvinuty streptomycin a další aminoglykosidy, jako jsou aminocyklitoly, tetracykliny, chloramfenikol, makrolidy, polosyntetické beta-laktamy, glykopeptidy, linkosamidy, 4-chinolony a diaminopyrimidiny (Russel 2002).

Rezistence vůči antimikrobiálním látkám se dá rozdělit na dva typy – přirozenou a získanou.

**Přirozená rezistence** je vlastnost bakteriálního druhu nebo vrozená schopnost snížení účinnosti antibiotika prostřednictvím špatné propustnosti vnější membrány (buněčné membrány a peptidoglykan) pro určité typy molekul nebo přítomnosti efluxních systémů, které snižují koncentraci intracelulárního antibiotika tím, že jsou schopny částečně nebo zcela dostat

antibiotikum ven z buňky (Blair et al. 2015). Dále některé druhy bakterií mohou produkovat enzymy deaktivující antibiotika. Například *Pseudomonas aeruginosa* vykazuje rezistenci vůči řadě antibiotik jako aminoglykosidy, chinolony a beta-laktamy. Mimo přirozené vnitřní rezistence, která zahrnuje nízkou propustnost vnější membrány, expresi efluxních pump a produkci enzymů inaktivujících antibiotika, je *P. Aeruginosa* schopna i adaptivní rezistence, která se projevuje tvorbou biofilmu v plicích infikovaných pacientů, kde biofilm slouží jako difúzní bariéra omezující přístup antibiotik k bakteriálním buňkám. Kromě toho se v biofilmu mohou tvořit perzistující buňky odolné vůči více lékům, které jsou schopné přežít útok antibiotik; tyto buňky jsou odpovědné za prodloužené a opakující se infekce u pacientů s *P. aeruginosa* (Pang et al. 2019).



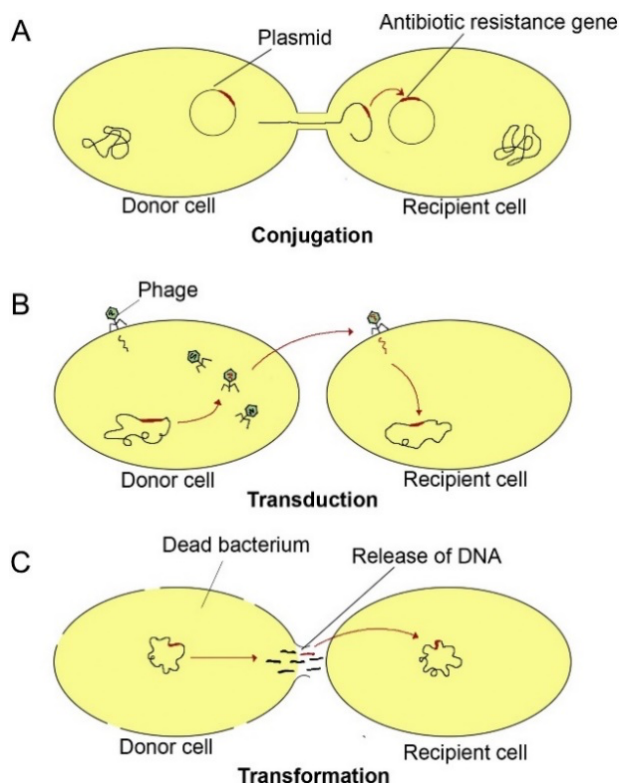
Obrázek č.1: Schematické znázornění mechanismů vnitřní rezistence na antibiotika u *P. Aeruginosa* (Pang et al. 2019).

**Získaná rezistence.** Bakterie mohou získat rezistenci na antibiotika mutačními změnami nebo získáním genů rezistence prostřednictvím horizontálního přenosu genů, kdy dochází k přenosu krátkého úseku DNA mezi jednotlivými bakteriemi stejného druhu nebo dokonce mezi různými druhy (obrázek č.1) (Pang et al. 2019).

Antibiotická rezistence se neomezuje pouze na konkrétní typ antibiotika. Může odkazovat na řadu chemicky nesouvisejících látek, kterým nebyla buňka nikdy vystavena současně a mít „multidrug resistance“ (MDR). Exprese efluxní pumpy AcrAB-TolC v *Enterobacteriaceae* je nutná pro výběr mutantů rezistentních na fluorochinolony s mutovanými cíli v různých gramnegativních bakteriích, jako je *Salmonella* nebo *Campylobacter*, dva hlavní potravinové patogeny. Pokud jsou kombinovány tyto mechnismy, poskytují bakteriím vysoký stupeň rezistence vůči chinolonům. Podobné synergie byly nedávno identifikovány pro makrolidy u kampylobaktera a další příklady mohou být s beta-laktamy a polymyxiny u *Enterobactericeae* (Piddock 2006; Davin-Regli et al. 2008).

Získaná rezistence v důsledku chromozomální mutace a selekce se nazývá vertikální evoluce nebo vertikální genový přenos, protože výhoda je poskytnuta bakteriální linii. Frekvence spontánních mutací pro rezistence na streptomycin u *E.coli* se vyskytuje s šancí přibližně  $10^{-9}$ . Zatímco mutace je vzácný výskyt, rychlý růst bakterií a absolutní počet

dosažených buněk znamená, že to netrvá dlouho, než se u populace vyvine rezistence. Proto geny rezistence přeneseny replikací DNA přímo do následujících generací (Todar 2011).



Obrázek č.2: Mechanismy horizontálního přenosu genů. Horizontální mechanismy přenosu zahrnují konjugaci, transdukcii a transformaci. (A) Konjugace je proces, který přenáší DNA přímým fyzickým kontaktem mezi buňkou dárce a buňkou příjemce. (B) Transdukcce je přenos DNA z jedné bakterie na druhou bakteriofágy. (C) Při transformaci bakterie přijímají volné fragmenty DNA uvolněné do prostředí a začleňují ji do svého vlastního genomu (Pang et al. 2019).

Jedním z nejvíce studovaných mechanismů je bakteriální rezistence na KAS. Dle Russel (2002) kationtové látky (kvartérní amoniové kationy, chlorhexidin, diamidiny, akridiny) a triclosan byly spojeny se sběrem a přežitím bakterií s nízkou úrovní rezistence vůči antibiotikům. Předpokládá se, že chronologický výskyt determinantů *qacA* a *qacB* v klinických izolátech *Staphylococcus aureus* se shoduje s nástupem a používáním kationtových biocidů.

U stafylokoků byla zjištěna rezistence na kationtové biocidy, včetně chlorhexidinu, KAS, akridinů a diamidinů. Rezistence byla kódována několika determinanty, z nichž nejdůležitější je genová rodina *qacA / B*, tuto rezistenci kóduje (Russel 2002). Většina izolátů rezistentních na KAS rezistentní kvůli přítomnosti jedné nebo více efluxních pump. Tyto pumpy jsou kationtově exportní proteiny vázané na membránu závislé na protonové síle kationtů, které patří buď do hlavní rodiny transportních proteinů, nebo do skupiny proteinů s malou odolností proti více lékům. Řada z nich byla identifikována u grampozitivních bakterií (např. *qacA*, *qacB*, *smr*, *qacG* a *qacH*) a gramnegativních bakterií (např. *emrE*, *qacE* a *qacEΔ1*) (Chapman 2003).

## 4 Metodika

### 4.1 Materiál

Rezistence vybraných kmenů bakterií byla provedena *in vitro*.

#### 4.1.1 Pomůcky

Zkumavky  
Injekční stříkačky  
Stojan na zkumavky  
Jednorázové rukavice

#### 4.1.2 Přístroje

Denzitometr McFarland typ DEN-1 od výrobce Biosan  
Vodní lázeň

Pro určení koncentrace bakterií a jejich rezistenci na dezinfekční prostředek byl použit denzitometr McFarland typ DEN-1, který je založen na měření optické hodnoty v rozsahu 0,3 – 5,0 McFarland při 600 nm.

#### 4.1.3 Chemikálie

Wilkins-Chalgren anaerobe broth (Oxoid)  
SAVO (koncentrace chlornanu sodného 4,7 g/100 g)  
Destilovaná voda

#### 4.1.4 Použité kmeny bakterií

*Escherichia coli* 055 (sbírkový kmen)  
*Salmonella* sp. (izolát z masa)  
*Bacillus cereus* (izolát z kakaového prášku)  
*Serratia marcescens* DSM30121 (sbírkový kmen)  
Živna médie

Tabulka 3: Složení Wilkins-Chalgren anaerobního bujonu

Látka	gram/litr
Pepton	10
Želatinový pepton	10
Kvasničný extrakt	5
Glukóza	1
Chlorid sodný	5
L-arginin	1
Pyrohroznan sodný	1
Menadion	0.0005
Hemín	0.005



pH medií:  $7,2 \pm 0,2$

Bylo rozpuštěno 33 g půdy v 1 litru destilované vody. Následně byla provedena sterilizace v autoklávu při teplotě 121 °C po dobu 15 minut. Připravená půda byla rozlita do zkumavek.

#### 4.1.5 Dezinfekční prostředek

Pro praktickou část této práce byl použit dezinfekční prostředek značky Savo. Savo je tekutý dezinfekční přípravek efektivní na dezinfekci povrchů a užitkové vody. Obsahuje chlornan sodný NaClO (4,7 g/100 g), který je účinný proti bakteriím, virům, řasám a houbám. Doporučené množství na dezinfekce povrchu (podlaha, sanitární předmět nebo keramika) 1 l přípravků na 9 l vody na 30 min. Předměty, které podléhají styku s potravinami nutno po 30 minutách opláchnout vodou.

## 4.2 Metodika

Cílem testování bylo stanovení účinnosti dezinfekčního prostředků o různé koncentrace aktivních látek, a porovnat vzorky na získání odolnosti proti dezinfekčnímu prostředků u různých kmenů.

### 4.2.1 Příprava vzorku

Do zkumavek s médiem bylo přidáno 0,1 ml bakteriálního kmene (Tabulka 4) a ihned poté zvolené množství (Tabulka 5) dezinfekčního přípravku Savo. Zkumavky byly označeny a inkubovány ve vodní lázni při 37 °C po dobu 6 hodin. V průběhu inkubace byla každých 30 min změřena optická denzita pomocí denzitometru McFarland typ DEN-1.

Tabulka 4: Bakteriální kmeny

Číslo zkumavky	Bakterie
1-3	<i>Escherichia coli</i>
4-6	<i>Salmonella</i>
7-9	<i>Bacillus cereus</i>
10-12	<i>Serratia marcescens</i>

Tabulka 5. Koncentrace NaClO v jednotlivých inokulačních dávkách

Název zkumavky	Inokulační dávka NaClO (mg/g)				
	2 ml	0,2 ml	0,02 ml	0,002 ml	0 (kontrola)
A	94	-	0,94	-	-
B	-	9,4	-	0,094	-
C	-	-	-	-	-

#### 4.2.2 Vyhodnocení

Pro výpočet specifické růstové rychlosti byly vybrány 1.hodina a 3.hodina, následně byl vypočítán průměr u stejných koncentrací kmenu ± směrodatná odchylka.

Získané hodnoty optické denzity byly dosazeny do vzorce pro výpočet specifické růstové rychlosti ( $\mu$ ):

$$\mu = \frac{\ln x - \ln x_0}{t - t_0}$$

kde  $x$  = stonásobek optické denzity v čase  $t$  a  $x_0$  = stonásobek optické denzity v čase  $t_0$ .

Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny programem Statgraphics Centurion XV (StatPoint).

## 5 Výsledky

Tabulka 6: Specifická růstová rychlost testovaných kmenů bakterií

Kmen	Koncentrace NaClO (mg/g)				
	94	9,4	0,94	0,094	0 (kontrola)
<i>Escherichia coli</i>	0,15 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,08 ± 0,06 <sup>a</sup>	1,15 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,06 ± 0,05 <sup>b</sup>	0,88 ± 0,23 <sup>b</sup>
<i>Salmonella</i>	0,06 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,10 <sup>a</sup>	1,29 ± 0,11 <sup>b</sup>	1,24 ± 0,02 <sup>b</sup>	1,17 ± 0,05 <sup>b</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	0,01 ± 0,03 <sup>a</sup>	0,01 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,30 ± 0,01 <sup>b</sup>	1,37 ± 0,15 <sup>b</sup>	1,31 ± 0,11 <sup>b</sup>
<i>Serratia marcescens</i>	0,05 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,29 <sup>b</sup>	1,39 ± 0,10 <sup>b</sup>	1,04 ± 0,31 <sup>b</sup>

Horní indexy (a,b) značí statisticky významné rozdíly ( $P < 0,05$ ) mezi jednotlivými koncentracemi.

Z výsledků je zřejmé, že čím vyšší koncentrace NaClO, tím vyšší citlivost bakterií. Všechny kmeny při koncentraci 94 a 9,4 mg/g NaClO vykazovaly citlivost vůči použitému dezinfekčnímu prostředku Savo. Oproti tomu koncentrace 0,94 a 0,094 mg/g NaClO byly příliš nízké a testované kmeny vůči těmto koncentracím byly rezistentní, což bylo potvrzeno statistickým vyhodnocením na hladině významnosti  $P = 0,05$ , kdy se koncentrace 94 a 9,4 mg/g významně lišily ( $P < 0,05$ ) od kontroly (0 mg/g) a naproti tomu koncentrace 0,94 a 0,094 mg/g se od kontroly nelišily.

## 6 Diskuse

Dezinfekční prostředky se používají v potravinářském průmyslu ke snížení zátěže a prodloužení trvanlivosti potravinářských výrobků, čímž se snižuje přenos choroby. Prostředky na bázi halogenu jsou jedním z nejpoužívanějších v provozu. Chlor je silným oxidantem, který inhibuje enzym bakterií, a tím vede k nevratné oxidaci SH skupiny a zničí buněčnou aktivitu (viz. 3.5.3) (Gerald & Russell 1999).

Cílem praktické části této práce bylo porovnat účinnost DP na odlišné kmeny bakterií. Výsledky účinnosti NaClO při koncentracích u 4 mikroorganismů uvedeny na tabulce 6. DP s obsahem chlornanu sodného byl účinný na všech testovaných bakteriích. Byla pozorována vysoká účinnost prostředků po 1. a 5 hodinách kontaktu ve vysokých koncentracích (94 a 9,4 mg/g). V potravinářském průmyslu MO nejsou v kontaktu s DP po dobu 5 hodin, jak bylo testováno v této práci, proto není jasně jaká by byla účinnost DP po 5 nebo 15 minutách působení (Iñiguez-Moreno et al. 2017), avšak ze získaných výsledků se dá vyvodit jaké koncentrace zabraňují množení testovaných kmenů.

Z výsledků této práce vyplývá, že koncentrace NaClO ve formě přípravku Savo doporučená výrobcem k domácímu použití (1 litr do 9 litrů vody) je dostatečná pro inhibici testovaných kmenů bakterií.

Účinnost dezinfekční aktivity může být ovlivňována mnoha faktory. Gramnegativní bakterie jsou odolnější proti antiseptikům a dezinfekčním prostředkům, než nesporeující grampozitivní bakterie. Na základě výsledků NaClO byl vysoko efektivní již v koncentraci 0,0094 % i proti gramnegativním bakteriím *Salmonella* sp., *Serratia marcescens*. Avšak všechny kmeny ukazovaly stejné hodnoty jako u kontroly při koncentracích 0,94 a 0,094 mg/g. Důvodem mohla být nedostatečná koncentrace nebo doba.

Ve studii Gomes et al. (2001) byly *in vitro* testovány NaClO (5,25%) a chlorhexidin v kapalně formě (0,2%, 1% a 2%) proti bakterii *Enterococcus faecalis*. Navzdory skutečnosti, že všechny testované látky měly antibakteriální účinnost, doba usmrcení *E. faecalis* se lišila v závislosti na dávce a formě látky mezi látkami NaClO a chlorhexidinu. Další studie zjistila, že NaClO (5,25%) pro zabíjení mikroorganismu (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotellaintermedia*) stačí několik sekund (Vianna et al. 2004). Tyto výsledky jsou v souladu s výsledky této práce, ve které použité koncentrace NaClO 9,4 % a 0,94 % rovněž inhibovaly růst testovaných bakterií.

Zdá se, že antimikrobiální aktivita NaClO je ovlivňována akumulací nedisociované kyseliny chlorné (HClO) v roztoku. Jak už bylo řečeno počáteční baktericidní aktivita HClO je způsobena oxidačním účinkem na sulfhydrylové skupiny bakteriálních enzymů a následným blokováním životně důležitých enzymů (Vianna et al. 2004).

Biofilmy jsou uskupení mikroorganismů, které přisedají k povrchům a obalují se v hydratovaných extracelulárních polymerních látkách (hlavními složkami polysacharidy, proteiny, nukleové kyseliny atd.). Bakterie v biofilmu jsou odolnější vůči DP než planktonní bakterie a účinnost DP může se měnit v různých stádiích růstu biofilmů (Shi & Zhu 2009). Byly zkoumány účinku NaClO i na biofilmy. Podle Spatt et al. (2001) chlornan byl sodný účinný proti biofilmům bakterií *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus*

*intermediateus* a *Enterococcus faecalis* po 1 hodině kontaktu. Aktivita látky byla určena druhem a délkou působení.

Antimikrobiální účinnost chlornanů sodného může se měnit při různých teplotách. Při každém zvýšení teploty o 5 °C v rozmezí 5-60 °C se podle dosud testovaných taxonů baktericidní rychlosti roztoků chlornanu sodného více než zdvojnásobily (Zehnder 2006). Ukázalo se, že 1% roztok NaOCl při 45 °C má stejný potenciál k odstranění lidských zubů buničiny jako 5,25% roztok při 20 °C (Sirtes et al. 2005). Teplota lázně, při které byly inkubovány bakterie stanovila 37 °C. Tento faktor mohl by taky ovlivňovat aktivitu chlornanů sodného, a tím by mohla být i snížena doba působení. Z toho vzniká, že teplota vody, která se používá pro smíšení NaClO má vliv na účinek a dobu vlivu.

Je známo, že účinnost DP obsahující chlornan sodný závisí na koncentraci chlóru a pH. Vysoké pH NaClO narušuje integritu cytoplazmatické membrány, což má za následek trvalou enzymatickou inhibici, biosyntetické změny buněčného metabolismu a degradaci fosfolipidů (Estarela et al. 2002).

V práci Owoseni & Okoh (2017) byla zkoumána životaschopnost bakterií *Citrobacter* a letální dávka chlóru. Bakterie rodu *Citrobacter* byly inaktivovány při letální dávce 0,75 a 1,0 mg/l za 30 minut. Avšak při doporučené koncentraci chlóru 0,5 mg/l po dobu 30 minut bylo zjištěno že bakterie je tolerantní. Baktericidní aktivita chlóru se zvýšila při vyšších dávkách, kromě toho existovala silná korelace mezi inaktivací bakterií a prodloužením doby kontaktu. V této práci je vidět že při navýšení koncentrace NaClO 9,4 mg/g oproti 0,94 mg/g došlo ke zvýšení citlivosti u bakterií.

V dalších studiích byla pozorována regenerace salmonely po dezinfekci vody chlorem. Výsledky ukázaly, že po dezinfekci chlorem vždy existuje šance na opětovný růst v recyklované vodě. Salmonela byla více rezistentní oproti indikátorovým bakteriím, jako jsou koliformní bakterie a enterokoky. Bakteriální reaktivace a opětovný růst nastal pravděpodobněji po expozici nižšími dávkami chlóru a rozsah reaktivace postupně klesal se zvyšující dávkou chlóru. Ve srovnání s koliformními bakteriemi a enterokoky měla salmonela vysokou míru opětovného růstu a reaktivace, s 2% opětovným růstem i po 69 (mg min)/l chlorace a 24 hodinovém skladování ve tmě. Tato zjištění naznačují, že chlorace (ošetření chlorem) ovlivňuje výběr patogenních bakterií rezistentních na chlór a že opětovný růst patogenních bakterií po chloraci v recyklované vodě s dlouhou retenční dobou může ohrozit veřejné zdraví během opětovného použití odpadních vod (Li et al. 2013).

## 7 Závěr

Další část byla věnována rezistenci proti dezinfekčním prostředkům u vybraných mikroorganismů, popsány typy rezistence.

Cílem práce bylo je popsat různé typy dezinfekčních prostředků používaných v potravinářství a jejich vliv na mikroorganismy. V literární rešerši byly vysvětleny důležité definice ze sféry sanitace, druhy a zásady dezinfekce. Podrobněji byly rozebrány chemické látky, typy a jejich účinky na mikroorganismy. V rámci praktické části byl proveden i menší pokus ověřující citlivost čistých bakteriálních kultur na vybraný dezinfekční prostředek. Hypotézou bylo, že citlivost bakterií se bude lišit v závislosti na rodovou příslušnost jednotlivých druhů. Na základě zjištěných výsledků můžeme tvrdit, že hypotéza nebyla potvrzena. Citlivost bakterií se nelišila v závislosti na rodovou příslušnost jednotlivých druhů. Všechny testované kmeny byly rezistentní na stejné koncentrace chlornanu sodného.

## 8 Použitá literatura

- AARESTRUP, F. M., Y. AGERSO and P. GERNER-SMIDT, 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. **37**(2). ISSN 07328893. Available at: doi:10.1016/S0732-8893(00)00130-9
- AMINOV, Rustam I. and Roderick I. MACKIE, 2007. *Evolution and ecology of antibiotic resistance genes* [online]. 2007. ISSN 03781097. Available at: doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00757.x
- AWODELE, O., P. M. EMEKA and H. C. AGBAMUCHE, 2007. The antimicrobial activities of some commonly used disinfectants on *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *African Journal of Biotechnology* [online]. **6**(8), 987–990. ISSN 16845315. Available at: doi:10.4314/ajb.v6i8.57021
- BARBOSA, Teresa M. and Stuart B. LEVY, 2000. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resistance Updates* [online]. **3**(5). ISSN 13687646. Available at: doi:10.1054/drup.2000.0167
- BENON, Asiimwe B., Kiguli JULIET, Majalija SAMUEL, Kansiime CATHERINE, Sunday BENJAMIN, Mahero MICHAEL and Rwego B. INNOCENT, 2018. Health workers' knowledge of zoonotic diseases in an endemic region of Western Uganda. *Zoonoses and Public Health* [online]. **65**(7). ISSN 18632378. Available at: doi:10.1111/zph.12509
- BERNARDI, Angélica Olivier, Andrieli STEFANELLO, Marcelo Valle GARCIA, Gilson PARUSSOLO, Raquel Facco STEFANELLO, Camila Brombilla MORO and Marina Venturini COPETTI, 2018. Efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry. *LWT* [online]. **97**. ISSN 00236438. Available at: doi:10.1016/j.lwt.2018.06.037
- BERRY, Elaine D. and Catherine N. CUTTER, 2000. Effects of acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 on efficacy of acetic acid spray washes to decontaminate beef carcass tissue. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **66**(4). ISSN 00992240. Available at: doi:10.1128/AEM.66.4.1493-1498.2000
- BESTER LINDA A. and ESSACKSABIHA Y., 2010. *Antibiotic resistance via the food chain: Fact or fiction?* [online]. 2010. ISSN 00382353. Available at: doi:10.4102/sajs.v106i9/10.281
- BEUCHAT, Larry R. and Jee Hoon RYU, 1997. Produce Handling and Processing Practices. *Emerging Infectious Diseases* [online]. **3**(4), 459–465. ISSN 10806040. Available at: doi:10.3201/eid0304.970407
- BJORLAND, Jostein, Terje STEINUM and Bjørg KVITILE, 2005. Widespread distribution of disinfectant resistance genes among staphylococci of bovine and caprine origin in Norway. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **43**(9). ISSN 00951137. Available at: doi:10.1128/JCM.43.9.4363-4368.2005

- BLAIR, Jessica M.A., Mark A. WEBBER, Alison J. BAYLAY, David O. OGBOLU and Laura J.V. PIDDOCK, 2015. *Molecular mechanisms of antibiotic resistance* [online]. 2015. ISSN 17401534. Available at: doi:10.1038/nrmicro3380
- BOCKSTAEL, Katrijn and Arthur AERSCHOT, 2009. Antimicrobial resistance in bacteria. *Open Medicine* [online]. 4(2). ISSN 2391-5463. Available at: doi:10.2478/s11536-008-0088-9
- CARPENTIER, Brigitte and O. CERF, 1993. *Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry* [online]. 1993. ISSN 13652672. Available at: doi:10.1111/j.1365-2672.1993.tb01587.x
- CERAGIOLI, Mara, Maarten MOLS and Roy MOEZELAAR, 2010. Comparative transcriptomic and phenotypic analysis of the responses of bacillus cereus to various disinfectant treatments. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 76(10). ISSN 00992240. Available at: doi:10.1128/AEM.03003-09
- CIUSA, Maria Laura, Leonardo FURI and Daniel KNIGHT, 2012. A novel resistance mechanism to triclosan that suggests horizontal gene transfer and demonstrates a potential selective pressure for reduced biocide susceptibility in clinical strains of Staphylococcus aureus. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 40(3). ISSN 09248579. Available at: doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.04.021
- CRANE, S. R., J. A. MOORE, M. E. GRISHER and J. R. MINER, 1983. Bacterial pollution from agricultural sources - a review. *Transactions - American Society of Agricultural Engineers* [online]. 26(3), 858-872. ISSN 0001-2351. Available at: doi:10.13031/2013.34036
- CZECHOWSKI M. H. and BANNER M., 1992. Control of biofilms in breweries through cleaning and sanitizing. *Technical-Quarterly,-Master-Brewers'-Association-of-the-Americas*. 1992; 29(3): 86-88 ; 8 ref. 29.
- Danish & Food Council Agriculture. Statistics 2011 Pigmeat. 2012. Available from [http://www.agricultureandfood.dk/~media/lf/Tal%20og%20analyser/Aarsstatistikker/Stistik%20s%20vin/2012/LF\\_STATISTICS\\_PIGMEAT\\_2012\\_A5\\_UK\\_REV.ashx](http://www.agricultureandfood.dk/~media/lf/Tal%20og%20analyser/Aarsstatistikker/Stistik%20s%20vin/2012/LF_STATISTICS_PIGMEAT_2012_A5_UK_REV.ashx) (accessed May 2013).
- DAVIN-REGLI, Anne, Jean-Michel BOLLA, Chloe JAMES, Jean-Philippe LAVIGNE, Jacqueline CHEVALIER, Eric GARNOTEL, Alexander MOLITOR and Jean-Marie PAGES, 2008. Membrane Permeability and Regulation of Drug Influx and Efflux; in Enterobacterial Pathogens. *Current Drug Targets* [online]. 9(9). ISSN 13894501. Available at: doi:10.2174/138945008785747824
- DENYER, Stephen P., W. BARRY HUGO and Valerie D. HARDING, 1985. *Synergy in preservative combinations* [online]. 1985. ISSN 03785173. Available at: doi:10.1016/0378-5173(85)90166-8
- DUPUY, Bruno and Abraham L. SONENSHEIN, 1998. Regulated transcription of Clostridium difficile toxin genes. *Molecular Microbiology* [online]. 27(1). ISSN 0950382X. Available at: doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00663.x



- EFSA, 2010. Revision of the joint AFC/BIOHAZ guidance document on the submission of data for the evaluation of the safety and efficacy of substances for the removal of microbial surface contamination of foods of animal origin intended for human consumption. *EFSA Journal* [online]. **8**(4). ISSN 18314732. Available at: doi:10.2903/j.efsa.2010.1544
- EL-MAHMOOD, A. M. and J. H. DOUGHARI, 2009. Bacteriological examination of some diluted disinfectants routinely used in the Specialist Hospital Yola, Nigeria. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **3**(5), 185–190. ISSN 19960816.
- ESTRELA, Carlos, Cyntia R.A. ESTRELA, Eduardo Luis BARBIN, Júlio César E. SPANÓ, Melissa A. MARCHESAN and Jesus D. PÉCORÁ, 2002. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian Dental Journal* [online]. **13**(2). ISSN 0103-6440. Available at: doi:10.1590/S0103-64402002000200007
- EVROPSKÝ PARLAMENT A RADA EVROPSKÉ UNIE. 2003. NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1831/2003 [online]. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:32003R1831&from=CS> (accessed May 2021).
- FLEMMING BAGER, Valeria BORTOLAIA and Johanne ELLIS-IVERSEN, 2016. *DANMAP 2015 - Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark* [online]. Available at: doi:ISSN 1600-2032
- FRANK, Joseph F. and Rose A. KOFFI, 1990. Surface-adherent growth of listeria monocytogenes is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and Heat. *Journal of Food Protection* [online]. **53**(7), 550–554. ISSN 19449097. Available at: doi:10.4315/0362-028X-53.7.550
- GILBERT, Peter and Andrew J. MCBAIN, 2003. *Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance* [online]. 2003. ISSN 08938512. Available at: doi:10.1128/CMR.16.2.189-208.2003
- GOMES, B. P.F.A., C. C.R. FERRAZ, M. E. VIANNA, V. B. BERBER, F. B. TEIXEIRA and F. J. SOUZA-FILHO, 2001. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* [online]. **34**(6). ISSN 01432885. Available at: doi:10.1046/j.1365-2591.2001.00410.x
- GOSLING, RJ, 2018. A review of cleaning and disinfection studies in farming environments. *Livestock* [online]. **23**(5). ISSN 2053-0862. Available at: doi:10.12968/live.2018.23.5.232
- GRAHAM, Jay P., Lance B. PRICE and Sean L. EVANS, 2009. Antibiotic resistant enterococci and staphylococci isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. *Science of the Total Environment* [online]. **407**(8). ISSN 00489697. Available at: doi:10.1016/j.scitotenv.2008.11.056
- HAMMERUM, Anette Marie, Lars Bogø JENSEN and Frank Møller AARESTRUP, 1998. Detection of the satA gene and transferability of virginiamycin resistance in *Enterococcus*

- faecium from food-animals. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **168**(1). ISSN 03781097. Available at: doi:10.1016/S0378-1097(98)00433-9
- HANSEN, Lars Hestbjerg, Lars Bogø JENSEN and Heidi Iskou SØRENSEN, 2007. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. **60**(1). ISSN 03057453. Available at: doi:10.1093/jac/dkm167
- HARRIS, L. J., J. N. FARBER and L. R. BEUCHAT, 2003. Outbreaks associated with fresh produce: Incidence, growth, and survival of pathogens in fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. **2**(1 SUPPL.), 78–141. ISSN 15414337. Available at: doi:10.1111/j.1541-4337.2003.tb00031.x
- CHAPMAN, John S., 2003. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. In: *International Biodeterioration and Biodegradation* [online]. ISSN 09648305. Available at: doi:10.1016/S0964-8305(03)00044-1
- IÑIGUEZ-MORENO, Maricarmen, María Guadalupe AVILA-NOVOA, Elizabeth IÑIGUEZ-MORENO, Pedro Javier GUERRERO-MEDINA and Melesio GUTIÉRREZ-LOMELÍ, 2017. Antimicrobial activity of disinfectants commonly used in the food industry in Mexico. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* [online]. **10**. ISSN 22137173. Available at: doi:10.1016/j.jgar.2017.05.013
- JAGLIC, Zoran, Dana ČERVINKOVÁ and Hana VLKOVÁ, 2012. Bacterial biofilms resist oxidising agents due to the presence of organic matter. *Czech Journal of Food Sciences* [online]. **30**(2). ISSN 12121800. Available at: doi:10.17221/214/2011-cjfs
- JOHN A. TROLLER, 2012. *Sanitation in food processing*. B.m.: Academic Press.
- KÄFERSTEIN, F. K., 2003. Actions to reverse the upward curve of foodborne illness. *Food Control* [online]. **14**(2), 101–109. ISSN 09567135. Available at: doi:10.1016/S0956-7135(02)00017-8
- KJELDGAARD, Jette, Marianne T. COHN, Pat G. CASEY, Colin HILL and Hanne INGMER, 2012. Residual antibiotics disrupt meat fermentation and increase risk of infection. *mBio* [online]. **3**(5). ISSN 21507511. Available at: doi:10.1128/mBio.00190-12
- KOLUMAN, Ahmet and Abdullah DIKICI, 2013. *Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: Status quo and global trends* [online]. 2013. ISSN 1040841X. Available at: doi:10.3109/1040841X.2012.691458
- KÜMMERLE, Nicole, Heinz Hubert FEUCHT and Paul Michael KAULFERS, 1996. Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: Characterization of resistance gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **40**(10). ISSN 00664804. Available at: doi:10.1128/aac.40.10.2276
- LANDERS, Timothy F., Bevin COHEN and Thomas E. WITTUM, 2012. *A review of antibiotic use in food animals: Perspective, policy, and potential* [online]. 2012. ISSN 14682877. Available at: doi:10.1177/003335491212700103

- LANGSRUD, S., T. MØRETRØ and G. SUNDHEIM, 2003. Characterization of *Serratia marcescens* surviving in disinfecting footbaths. *Journal of Applied Microbiology* [online]. **95**(1). ISSN 13645072. Available at: doi:10.1046/j.1365-2672.2003.01968.x
- LASSEN, C., Skarup, S., Mikkelsen, S. H., Kjoholt, J. 2001. Inventory of Biocides used in Denmark-Environmental Project No. 585 2001. The Danish Environmental Protection Agency. Available from <http://www2.mst.dk/udgiv/Publications/2001/87-7944-383-4/pdf/87-7944-384-2> (accessed May 2007).
- LEIKIN, J. B., & Paloucek, F. P. (2008). Chlorhexidine Gluconate: Poisoning and toxicology handbook. In *Informa* (pp. 183-184).
- LELIEVELD, H. L.M., 1985. Hygienic design and test methods. *International Journal of Dairy Technology* [online]. **38**(1), 14–16. ISSN 14710307. Available at: doi:10.1111/j.1471-0307.1985.tb00532.x
- LI, Dan, Siyu ZENG, April Z. GU, Miao HE and Hanchang SHI, 2013. Inactivation, reactivation and regrowth of indigenous bacteria in reclaimed water after chlorine disinfection of a municipal wastewater treatment plant. *Journal of Environmental Sciences* [online]. **25**(7). ISSN 10010742. Available at: doi:10.1016/S1001-0742(12)60176-4
- LI, Zihai and Pramod SRIVASTAVA, 2003. Heat-Shock Proteins. *Current Protocols in Immunology* [online]. **58**(1). ISSN 1934-3671. Available at: doi:10.1002/0471142735.ima01ts58
- LUECHTEFELD, N. A.W., M. J. BLASER and L. B. RELLER, 1980. Isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from migratory waterfowl. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. **12**(3), 406–408. ISSN 00951137. Available at: doi:10.1128/jcm.12.3.406-408.1980
- MAILLARD, J. Y., 2007. Bacterial resistance to biocides in the healthcare environment: should it be of genuine concern? *Journal of Hospital Infection* [online]. **65**(SUPPL. 2), 60–72. ISSN 01956701. Available at: doi:10.1016/S0195-6701(07)60018-8
- MARSHALL, Bonnie M. and Stuart B. LEVY, 2011. *Food animals and antimicrobials: Impacts on human health* [online]. 2011. ISSN 08938512. Available at: doi:10.1128/CMR.00002-11
- MATTILA-SANDHOLM, Tiina and Gun WIRTANEN, 1992. Biofilm formation in the industry: A review. *Food Reviews International* [online]. **8**(4). ISSN 8755-9129. Available at: doi:10.1080/87559129209540953
- MCDONNELL, G, G GRIGNOL and K ANTLOGA, 2002. Vapor phase hydrogen peroxide decontamination of food contact surfaces. *Dairy, Food and Environmental Sanitation*. **22**(11). ISSN 1043-3546.
- MCDONNELL, Gerald and A. Denver RUSSELL, 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. **12**(1). ISSN 1098-6618. Available at: doi:10.1128/CMR.12.1.147

- MCMAHON, M. Ann S., Jiru XU, John E. MOORE and Ian S. BLAIR, 2007. Environmental stress and antibiotic resistance in food-related pathogens. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **73**(1), 211–217. ISSN 00992240. Available at: doi:10.1128/AEM.00578-06
- MINISTERSTVO ZDRAVOTNICTVÍ, 2021. *Vyhláška č. 306 ze dne 12. září 2012 o podmínkách předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění a o hygienických požadavcích na provoz zdravotnických zařízení a ústavů sociální péče*. 2021.
- MOSTELLER, T. M. and J. R. BISHOP, 1993. Sanitizer Efficacy Against Attached Bacteria in a Milk Biofilm. *Journal of Food Protection* [online]. **56**(1), 34–41. ISSN 0362-028X. Available at: doi:10.4315/0362-028x-56.1.34
- MOYANE J. N., JIDEANI A. I. O. and AIYEGORO O. A., 2013. Antibiotics usage in food-producing animals in South Africa and impact on human: Antibiotic resistance. *African Journal of Microbiology Research* [online]. **7**(24), 2990–2997. ISSN 1996-0808. Available at: doi:10.5897/ajmr2013.5631
- NULTY, Karl Mc, Jan Mei SOON and Carol Anne WALLACE, 2016. *Antimicrobial resistance monitoring and surveillance in the meat chain: A report from five countries in the European Union and European Economic Area* [online]. 2016. ISSN 09242244. Available at: doi:10.1016/j.tifs.2016.09.010
- OMORUYI, M.I and M. I IDEMUDIA, 2011. Comparative Analysis Of The Antiseptic Properties Of Some Disinfectants On Bacteria And Fungi Of Public Health Importance Isolated From Barbings Clippers. *Journal of Asian Scientific Research*. **1**(2), 65–68.
- OWOSEN, Mojisola and Anthony OKOH, 2017. Assessment of chlorine tolerance profile of *Citrobacter* species recovered from wastewater treatment plants in Eastern Cape, South Africa. *Environmental Monitoring and Assessment* [online]. **189**(4). ISSN 0167-6369. Available at: doi:10.1007/s10661-017-5900-z
- PANG, Zheng, Renee RAUDONIS, Bernard R. GLICK, Tong Jun LIN and Zhenyu CHENG, 2019. *Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies* [online]. 2019. ISSN 07349750. Available at: doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013
- PHILLIPS, Ian, Mark CASEWELL and Tony COX, 2004. *Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data* [online]. 2004. ISSN 03057453. Available at: doi:10.1093/jac/dkg483
- PIDDOCK, Laura J.V., 2006. Multidrug-resistance efflux pumps - Not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology* [online]. **4**(8). ISSN 17401526. Available at: doi:10.1038/nrmicro1464
- RUSSELL, A. D., 2002. Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. In: *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* [online]. ISSN 02674440. Available at: doi:10.1046/j.1365-2672.92.5s1.12.x

- RUSSELL, A. D. and M. J. DAY, 1993. Antibacterial activity of chlorhexidine. *Journal of Hospital Infection* [online]. **25**(4). ISSN 01956701. Available at: doi:10.1016/0195-6701(93)90109-D
- SALEH, S., R. N.S. HADDADIN, S. BAILLIE and P. J. COLLIER, 2011. Triclosan - an update. *Letters in Applied Microbiology* [online]. **52**(2), 87–95. ISSN 02668254. Available at: doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02976.x
- SCENIHR, 2009. Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. *Report*. (19 January).
- SEILER, Claudia and Thomas U. BERENDONK, 2012. *Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture* [online]. 2012. ISSN 1664302X. Available at: doi:10.3389/fmicb.2012.00399
- SHI, Xianming and Xinna ZHU, 2009. Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science and Technology* [online]. **20**(9). ISSN 09242244. Available at: doi:10.1016/j.tifs.2009.01.054
- SCHWEIZER, Herbert P., 2001. Triclosan: A widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiology Letters* [online]. **202**(1). ISSN 03781097. Available at: doi:10.1016/S0378-1097(01)00273-7
- SIDHU, Maan Singh, Even HEIR, Truls LEEGAARD and Karianne WIGER, 2002. Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with  $\beta$ -lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **46**(9). ISSN 00664804. Available at: doi:10.1128/AAC.46.9.2797-2803.2002
- SIRTES, George, Tuomas WALTIMO, Marc SCHAETZLE and Matthias ZEHNDER, 2005. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *Journal of Endodontics* [online]. **31**(9). ISSN 00992399. Available at: doi:10.1097/01.don.0000153846.62144.d2
- SKOVGAARD, Sissel, Lene Nørby NIELSEN and Marianne Halberg LARSEN, 2013. Staphylococcus epidermidis Isolated in 1965 Are More Susceptible to Triclosan than Current Isolates. *PLoS ONE* [online]. **8**(4). ISSN 19326203. Available at: doi:10.1371/journal.pone.0062197
- SOUKUPOVÁ, V. Aktivní látky používané k dezinfekce. Available from <http://slideplayer.cz/slide/2751749> (accessed May 2021).
- SPRATT, D. A., J. PRATTEN, M. WILSON and K. GULABIVALA, 2001. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *International Endodontic Journal* [online]. **34**(4). ISSN 01432885. Available at: doi:10.1046/j.1365-2591.2001.00392.x
- TAUXE, R., H. KRUSE and C. HEDBERG, 1997. Microbial hazards and emerging issues associated with produce: A preliminary report to the National Advisory Committee on Microbiologic Criteria for Foods. In: *Journal of Food Protection* [online]. p. 1400–1408. ISSN 0362028X. Available at: doi:10.4315/0362-028X-60.11.1400

- THOMAS, Chris and David O'BEIRNE, 2000. Evaluation of the impact of short-term temperature abuse on the microbiology and shelf life of a model ready-to-use vegetable combination product. *International Journal of Food Microbiology* [online]. **59**(1–2). ISSN 01681605. Available at: doi:10.1016/S0168-1605(00)00290-7
- THOMPSON, E. T., 1986. The toxicity of a number of different bactericides to *Clavibacter michiganense* subsp. *michiganense* (Smith 1910) Jensen 1934 comb. nov. [basonym *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* (AL)] and to the tomato plant, *Lycopersicon esculentum*. *Journal of Applied Bacteriology* [online]. **61**(5). ISSN 13652672. Available at: doi:10.1111/j.1365-2672.1986.tb04307.x
- TODAR, Kenneth (Department of Bacteriology), 2011. Bacterial Resistance to Antibiotics (page 3) Antibiotic Method of resistance. In: *Todar's Online Textbook of Bacteriology*.
- TOURNAS, V. H., 2005. Spoilage of vegetable crops by bacteria and fungi and related health hazards. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. **31**(1), 33–44. ISSN 1040841X. Available at: doi:10.1080/10408410590886024
- VIANNA, Morgana Eli, Brenda P.F.A. GOMES, Vanessa Bellocchio BERBER, Alexandre Augusto ZAIA, Caio Cezar Randi FERRAZ and Francisco José DE SOUZA-FILHO, 2004. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics* [online]. **97**(1). ISSN 10792104. Available at: doi:10.1016/S1079-2104(03)00360-3
- VÍTOVÁ, Eva, 2004. *Hygiena potravin*. Brno: FCH VUT v Brně: VUT v Brně. ISBN ISBN 80-214-2680-2.
- VOTAVA, Miroslav, 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. B.m.: Brno: Neptun. ISBN ISBN 80-86850-00-5.
- WIRTANEN, G., M. SAARELA and T. MATTILA-SANDHOLM, 2000. *Biofilms - impact on hygiene in food industries*. 2000.
- ZEHNDER, Matthias, 2006. Root Canal Irrigants. *Journal of Endodontics* [online]. **32**(5). ISSN 00992399. Available at: doi:10.1016/j.joen.2005.09.014

