

Received: 2014.09.10
Accepted: 2015.06.30
Published: 2015.09.20

Oddziaływanie związków dezynfekcyjnych na komórki bakteryjne w kontekście bezpieczeństwa higieny i zdrowia publicznego*

Disinfectants - bacterial cells interactions in the view of hygiene and public health

Marta Książczyk¹, Eva Krzyżewska², Bożena Futoma-Kołoch¹,
Gabriela Bugla-Płoskońska¹

¹ Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, Uniwersytet Wrocławski

² Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, we Wrocławiu

Streszczenie

W ostatnich latach zwiększyło się zużycie środków dezynfekcyjnych, np. triclosanu w gospodarstwach domowych, obiektach opieki zdrowotnej, zakładach produkcji żywności i hodowli zwierząt. Dezynfekcja chemiczna, z wykorzystaniem wielu biocydów stanowi podstawowy sposób kontroli i zwalczania szkodliwych mikroorganizmów, zwłaszcza o fenotypie wielolekooporności. Odpowiedzią drobnoustrojów na działanie biocydów jest wykształcenie mechanizmów adaptacyjnych warunkujących zmniejszoną wrażliwość na związki biobójcze. Niektóre mikroorganizmy odznaczają się naturalną opornością na czynniki chemiczne lub wykształcają przystosowania polegające na: modyfikacji ultrastruktury osłon komórkowych (lipopolisacharydy, błonowe kwasy tłuszczowe), nadekspresji pomp efflux (aktywnego wyrzutu związków toksycznych z komórki bakterii), represji biosyntezy poryn, enzymatycznej inaktywacji biocydu lub zmiany miejsc docelowego działania (target). Fenomen zmniejszonej wrażliwości komórek drobnoustrojów na związki chemiczne, w tym środki dezynfekujące jest intensywnie badany. W badaniach prowadzonych w warunkach *in vitro* nad ekspozycją szczepów bakteryjnych m.in. *Salmonella* Typhimurium na stężenia subinhibitorowe biocydów (triclosan, czwartorzędowe związki amoniowe) uzyskano selekcję wariantów opornych na te biocydy i jednocześnie na barwniki akrydynowe i antybiotyki. Izolaty szczepów *Bacillus subtilis* i *Micrococcus luteus* wyizolowane z urządzeń do dezynfekcji zawierających dwutlenek chloru, wykazywały oporność na dwutlenek chloru oraz na inne substancje utleniające: kwas nadoctowy i nadtlenek wodoru. Oddziaływanie związków chemicznych, w tym środków dezynfekcyjnych na mikroorganizmy może stanowić poważne zagrożenie dla bezpieczeństwa sanitarno-higienicznego i zdrowia publicznego, co może doprowadzić do wzrostu i rozprzestrzeniania się lekooporności wśród bakterii patogennych.

Słowa kluczowe: biocydy • środki dezynfekcyjne • oporność bakterii

* Publikacja współfinansowana przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego. Mgr Marta Książczyk i dr Bożena Futoma-Kołoch są stypendystkami Projektów «Akademia Rozwoju - kluczem wzmocnienia kadr polskiej gospodarki» współfinansowanych przez Unię Europejską ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

Summary

In recent years, the use of biocides has increased rapidly. One common example is triclosan, with wide application in households as well as medical and industrial fields, especially food industry and animal husbandry. Chemical disinfection is a major mean to control and eliminate pathogenic bacteria, particularly those with multidrug resistance (MDR) phenotype. However, exposition to biocides results in an adaptive response in microorganisms, causing them to display a wide range of resistance mechanisms. Numerous microorganisms are characterized by either natural resistance to chemical compounds or an ability to adapt to biocides using various strategies, such as: modification of cell surface structures (lipopolisaccharide), membrane fatty acids), over-expression of efflux pumps (a system for active transport of toxic compounds out of bacterial cell), enzymatic inactivation of biocides or altering biocide targets. For instance, it was shown that in vitro exposition of *Salmonella* Typhimurium to subinhibitory concentration of biocides (triclosan, quaternary ammonium compounds [QACs]) resulted in selection of variants resistant to tested biocides and, additionally, to acridine dyes and antibiotics. *Bacillus subtilis* and *Micrococcus luteus* strains isolated from chlorine dioxide containing disinfection devices were found to be resistant to chlorine dioxide and also to other oxidizing compounds, such as peracetic acid and hydrogen peroxide. Interaction between chemical compounds, including disinfectants and microbial cells, can create a serious threat to public health and sanitary-hygienic security. This phenomenon is connected with factor risk that intensify the probability of selection and dissemination of multidrug resistance among pathogenic bacteria.

Keywords: biocides • disinfectants • bacterial resistance

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1170051>

Word count: 4456

Tables: 3

Figures: 2

References: 61

Adres autorki: mgr Marta Książczyk, Zakład Mikrobiologii, Instytut Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego ul. Przybyszewskiego 63/77, 51-148 Wrocław; e-mail: marta.ksiazczyk@uni.wroc.pl

Wykaz skrótów: **Da** – Dalton; **EDTA** – kwas etylenodiaminotetraoctowy (ethylenediaminetetraacetic acid); **GHP** – dobra praktyka higieniczna (good hygiene practice); **GMP** – dobra praktyka produkcyjna (good manufacturing practice); **HACCP** – system analizy zagrożeń i krytycznych punktów kontrolnych (hazard analysis and critical control points); **LPS** - lipopolisacharyd (lipopolisaccharide); **OM** – błona zewnętrzna (outer membrane); **OMP** – białko błony zewnętrznej (outer membrane protein); **PTM** – siła protonomotoryczna (proton motive force); **QACs** – czwartorzędowe związki amoniowe (quaternary ammonium compounds).

WPROWADZENIE

Obecnie cywilizacja ludzka stoi w obliczu ciągle pogłębiającego się zjawiska antybiotykooporności bakterii jako skutku nadmiernego i nieprawidłowego stosowania leków przeciwdrobnoustrojowych. Zjawisko lekooporności bakterii bardzo łatwo i szybko rozprzestrzenia się w środowisku. Potencjalnie bakterie patogenne mogą wykazywać oporność względem wszystkich leków przeciwdrobnoustrojowych stosowanych w celach terapeutycznych. Podstawową metodą kontroli patogennych mikroorganizmów w: przemyśle, obiektach opieki zdrowotnej (szpitale), obiektach hodowli zwierząt i gospodarstwach domowych, niepolegającą na antybiotykoterapii, jest stosowanie chemicznych środków

o właściwościach biobójczych w procesach dezynfekcji bądź sterylizacji chemicznej. Związki te stosowane prawidłowo, działają bójczo lub hamująco na wzrost bakterii, wirusów jak i grzybów, zapobiegając rozprzestrzenianiu się potencjalnie patogennych mikroorganizmów. Obecnie powszechnie dostępnych jest wiele preparatów zawierających w swoim składzie substancje czynne działające przeciwdrobnoustrojowo. Również środki higieny osobistej, takie jak żele myjące do twarzy czy pasty do zębów oraz kosmetyki mają dodatek związków o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, np. triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorofenoksyfenol) fenoksyfenol). Ekspozycja bakterii na działanie związków dezynfekcyjnych stanowi dla komórek bakteryjnych presję selekcyjną, która może spowodować przystoso-

wywanie się bakterii do warunków stresowych. Bakterie w odpowiedzi na działanie substancji bakteriobójczych czy bakteriostatycznych, dążą do przetrwania w niekorzystnych warunkach. W związku z tym powstają obawy czy stosowanie środków biobójczych jest całkowicie bezpiecznym dla środowiska sposobem kontroli mikroorganizmów. Istnieje ryzyko, że pod wpływem działania biocydów bakterie mogą się stawać odporne nie tylko na dany związek, ale na szeroki zakres substancji przeciwdrobnoustrojowych w tym antybiotyków. W pracy omówiono mechanizmy oddziaływań na komórki bakteryjne związków chemicznych stosowanych do mycia i dezynfekcji. Opisano także zmiany adaptacyjne jakie występują w komórkach mikroorganizmów w odpowiedzi na ekspozycję na toksyczne związki chemiczne. Interakcje między substancjami biobójczymi a bakteriami ukazano w aspekcie potencjalnych zagrożeń i konsekwencji dla zdrowia publicznego oraz bezpieczeństwa sanitarno-higienicznego.

PODSTAWOWE DEFINICJE I TERMINOLOGIA DOTYCZĄCA ŚRODKÓW BIOBÓJCZYCH

Pojęcia takie jak biocyd, środek dezynfekcyjny, detergent czy nawet pojęcie antybiotyku są niekiedy błędnie używane, jako podobne bądź synonimiczne.

Biocydy to termin wywodzący się z języka greckiego, będący połączeniem dwóch słów gr. *bios* - życie oraz *cedare* - zabijać. Biocydy to związki chemiczne pochodzenia syntetycznego lub naturalnie występujące w przyrodzie, które są używane do zwalczania organizmów szkodliwych w wyniku interakcji biologicznych lub chemicznych [16]. Jest to termin o szerokim znaczeniu, obejmujący wiele grup związków chemicznych (np. alkohole, fenol i jego pochodne, kwasy organiczne, aldehydy, związki utleniające) o różnicowanym zakresie aktywności biologicznej, przeznaczeniu i przydatności w poszczególnych sektorach przemysłu, zdrowia publicznego i życia codziennego.

W myśl Ustawy Nr 175, poz. 1433 z dnia 13.09. 2002 r. o produktach biobójczych preparaty dezynfekcyjne (nazywane zamiennie środkami dezynfekcyjnymi lub dezynfektantami) są przeznaczone do stosowania na powierzchniach abiotycznych określa się mianem produktów biobójczych: „Produkt biobójczy - substancja czynna lub preparat zawierający co najmniej jedną substancję czynną, w postaciach w jakich są dostarczone użytkownikowi, przeznaczony do niszczenia, odstraszania, unieszkodliwiania, zapobiegania działaniu lub kontrolowania w jakikolwiek inny sposób organizmów szkodliwych przez działanie chemiczne lub biologiczne” [58].

Natomiast biobójcze substancje czynne są określone jako „substancje lub mikroorganizmy, w tym także wirusy i grzyby, zwalczające lub wywierające działanie ogólne lub specyficzne na organizmy szkodliwe” [58]. Cytowana Ustawa nr 175, poz. 1433 z dnia 13.09. 2002 r. o produk-

tach biobójczych zawiera klasyfikację produktów biobójczych na 23 grupy w zależności od ich przeznaczenia i miejsca docelowego stosowania.

Ustawa Prawa Farmaceutycznego nr 126, poz. 1381 z dnia 06. 09. 2011 roku, dotyczy natomiast produktów przeznaczonych do dezynfekcji skóry, określonych jako produkty lecznicze: „(...) Produktem leczniczym jest substancja lub mieszanina substancji, przeznaczona do zapobiegania lub leczenia chorób występujących u ludzi lub zwierząt, lub podawana człowiekowi lub zwierzęciu w celu postawienia diagnozy lub w celu przywrócenia, poprawienia czy modyfikacji fizjologicznych funkcji organizmu ludzkiego lub zwierzęcego; pojęcie produktu leczniczego nie obejmuje dodatków paszowych (...)” [57].

Antyseptyki to substancje aktywne biologicznie stosowane w celu eliminacji bądź hamowania namnażania się mikroorganizmów w tkankach, na błonach śluzowych czy skórze i niewykazujące szkodliwego działania na organizmy wyższe [17].

Środki dezynfekcyjne i antyseptyczne, zgodnie z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia Dz.U.05.11.86, z dnia 30.12.2004 r., są czynnikami chemicznymi: „(...) to każdy pierwiastek lub związek chemiczny, w postaci własnej lub w mieszaninie, w stanie w jakim występuje w przyrodzie, lub w stanie w jakim jest wytwarzany, stosowany lub uwalniany w środowisku pracy, w tym podczas usuwania go w postaci odpadów, w czasie każdej pracy, niezależnie od tego, czy jest albo nie jest wytwarzany celowo lub jest albo nie jest wprowadzany do obrotu” [47].

Innym terminem związanym z dezynfekcją jest pojęcie detergentu, czyli związku czyszczącego i myjącego, który umożliwia usuwanie zabrudzeń z różnych powierzchni stałych. Detergenty to związki powierzchniowo czynne obniżające napięcie powierzchniowe na granicy faz [15].

Leki przeciwdrobnoustrojowe to termin obejmujący związki terapeutyczne stosowane w leczeniu chorób infekcyjnych, hamujące namnażanie się lub powodujące eliminację drobnoustrojów patogennych z organizmu pacjenta. Do leków przeciwdrobnoustrojowych należą leki przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i przeciwwirusowe. Aktywność względem bakterii wykazują dwie podstawowe grupy leków:

- antybiotyki – substancje pochodzenia naturalnego, będące wtórnymi metabolitami mikroorganizmów, wykazujące działanie bójcze lub statyczne względem innych drobnoustrojów, np. penicylina. Wyróżnia się także antybiotyki półsyntetyczne powstające poprzez modyfikację chemiczną antybiotyków naturalnych np. półsyntetyczne pochodne penicyliny [52],
- chemioterapeutyki - to substancje o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, stosowane w leczeniu chorób

infekcyjnych, powstające w wyniku syntezy chemicznej i nieposiadające odpowiednika w przyrodzie, np. sulfonamidy [52].

Często terminy: antybiotyki i chemioterapeutyki są stosowane zamiennie. Wspólną, charakterystyczną cechą tych dwóch grup związków jest tzw. selektywna toksyczność, co oznacza, że dane leki działają specyficznie na patogenne drobnoustroje (hamując ich wzrost lub eliminując je w organizmach wyższych) niepowodując uszkodzeń komórek żywiciela [36,51].

ŚRODKI DEZYNFEKCYJNE, BIOCYDY, ANTYBIOTYKI I CHEMIOTERAPEUTYKI - RÓŻNICE I PODOBIENSTWA W AKTYWNOŚCI PRZECIWDROBNOUSTROJOWEJ

Stosowane w życiu codziennym środki dezynfekcyjne są grupą związków, należących do różnych klas chemicznych, obejmujące m.in.: alkohole, aldehydy, związki utleniające, czwartorzędowe związki amoniowe, które wykazują aktywność przeciwdrobnoustrojową i są wykorzystywane w procesie dezynfekcji chemicznej. Komercyjnie dostępne preparaty dezynfekcyjne mogą zawierać jeden związek chemiczny lub ich mieszaninę, co zwiększa zakres działania i skuteczność preparatu. Środki dezynfekcyjne mogą wykazywać zarówno działanie bakteriostatyczne jak i bakteriobójcze, co zależy przede wszystkim od użytego stężenia danej substancji. Ze względu na zawartość różnych klas związków chemicznych, poszczególne środki dezynfekcyjne różnią się między sobą mechanizmem oddziaływań na mikroorganizmy, zakresem działania przeciwdrobnoustrojowego, toksycznością dla organizmów wyższych i szkodliwym wpływem na abiotyczne elementy środowiska [15,20,46]. Mimo to najczęściej końcowy efekt szkodliwego działania różnych środków dezynfekcyjnych na komórki bakteryjne jest podobny i skutkuje eliminacją bądź zahamowaniem namnażania się drobnoustrojów na dezynfekowanych obiektach czy powierzchniach nieożywionych [30,52]. Środki dezynfekcyjne działają wielopoziomowo na komórki drobnoustrojów, ich aktywność jest skierowana na wiele miejsc docelowych [44]. W wysokich stężeniach (około 5-8%) triclosan działa bakteriobójczo, oddziałując na błonę cytoplazmatyczną i cytoplazmę komórkową. Natomiast w niskich stężeniach (około 0,05%) działa bakteriostatycznie inhibując biosyntezę kwasów tłuszczowych przez wiązanie się z bakteryjną reduktazą białka przenoszącego grupę enolowo-acylową [29]. Ponadto dostępne komercyjnie preparaty dezynfekcyjne są często złożonymi mieszaninami, zawierającymi kilka substancji aktywnych (np. alkohol etylowy, glutraldehyd, czwartorzędowe związki amoniowe, związki chloru, związki utleniające), o różnej reaktywności chemicznej, co zwiększa skuteczność działania przeciwdrobnoustrojowego [52].

Natomiast antybiotyki i chemioterapeutyki stosowane powszechnie w terapii chorób infekcyjnych wykazują precyzyjne działanie farmakologiczne na ściśle określone miejsce docelowe w komórkach drobnoustrojów

[18]. Selektywna toksyczność danych leków wynika ze swoistego zaburzenia procesów metabolicznych lub działania na elementy komórkowe patogenów, które nie występują w organizmie żywiciela (np. synteza peptydoglikanu) [11].

INTERAKCJE BIOCYD - BAKTERIA

Mechanizm działania przeciwdrobnoustrojowego biocydów jest ściśle zależny od ich struktury chemicznej i właściwości fizykochemicznych (tj. wielkość cząsteczek, rozpuszczalności substancji, zdolności do dysocjacji i jonizacji) oraz właściwości biochemicznych (tj. rodzaj wiązań chemicznych i grup funkcyjnych, właściwości utleniających i alkilujących). Najpierw zachodzi wstępna adsorpcja cząsteczek związku do powierzchni komórki bakterii, a następnie przenikanie i akumulacja substancji wewnątrz komórki drobnoustroju, do poziomu wystarczającego do uzyskania efektu toksycznego. Sam etap penetracji biocydu zależy zarówno od właściwości fizykochemicznych jak i budowy osłon komórkowych, których jedną z podstawowych funkcji jest ochrona przed toksyczną aktywnością substancji chemicznych [14]. Dlatego też poziom skuteczności przeciwdrobnoustrojowej różnych klas związków chemicznych względem poszczególnych grup mikroorganizmów jest zróżnicowany. W tabeli 1 przedstawiono skuteczność biobójczą związków chemicznych stosowanych w dezynfekcji (np. alkohole, aldehydy, biguanidyny, fenole, związki chloru, związku jodu, związki utleniające, czwartorzędowe związki amoniowe, metale ciężkie) względem poszczególnych grup mikroorganizmów, tj. bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, a także wobec spor bakteryjnych, komórek grzybów, wirusów lipofilnych i hydrofilnych [13].

Na podstawie przedstawionej tabeli 1 wnioskuje się, że największą aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazują substancje utleniające, aldehydy oraz związki jodu i chloru, działające zarówno na bakterie Gram-ujemne, Gram-dodatnie w tym prątki, spory bakteryjne, grzyby oraz wirusy. Natomiast biguanidyny wykazują aktywność tylko względem bakterii Gram-ujemnych oraz niektórych bakterii Gram-dodatnich, przy czym nie działają na prątki. Podobne działanie przeciwdrobnoustrojowe jak biguanidyny mają czwartorzędowe związki amoniowe oraz metale ciężkie, będące aktywne względem bakterii Gram-ujemnych, niektórych bakterii Gram-dodatnich oraz niektórych grzybów. Rycina 1 obrazuje malejący poziom naturalnej oporności na środki antyseptyczne i dezynfekcyjne (m.in. alkohole, związki chloru, czwartorzędowe związki amoniowe, biguanidyny) poszczególnych mikroorganizmów, ich postaci przetrwalnych, pierwotniaków, wirusów oraz prionów. Największą naturalną oporność na związki biobójcze wykazują priony, a następnie spory bakteryjne, prątki oraz formy przetrwalne pasożytniczych pierwotniaków. Natomiast najniższym poziomem oporności naturalnej czyli największą wrażliwością na biocydy charakteryzują się wirusy lipofilne oraz nieco bardziej odporne na

Tabela 1. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa związków chemicznych stosowanych w środkach dezynfekcyjnych, na podstawie [38,54]

| Związki chemiczne | Aktywność biobójcza* | | | | | | |
|---------------------------------|----------------------|-----------------------------|--------|------------------|--------|------------------|-------------------|
| | Bakterie | | Prątki | Spory bakteryjne | Grzyby | Wirusy lipofilne | Wirusy hydrofilne |
| | Gram-ujemne | Gram-dodatnie (bez prątków) | | | | | |
| Alkohole | +++ | +++ | + | - | + | ++ | -/+ |
| Aldehydy | +++ | +++ | -/+ | + | ++ | ++ | + |
| Biguanidy | +++ | + | - | - | -/+ | -/+ | - |
| Fenole | +++ | +++ | + | - | -/+ | ++ | - |
| Związki chloru | +++ | +++ | -/+ | ++ | + | ++ | -/+ |
| Związki jodu | +++ | +++ | ++ | -/+ | ++ | ++ | ++ |
| Substancje utleniające | +++ | +++ | + | ++ | +++ | +++ | ++ |
| Czwartorzędowe związki amoniowe | +++ | + | - | - | + | -/+ | - |
| Metale ciężkie (w tym srebro) | +++ | ++ | - | - | + | -/+ | - |

*Aktywność wobec danej grupy mikroorganizmów, na podstawie właściwości chemicznych związków:

+++ bardzo dobra, ++ dobra, + dostateczna, +/- ograniczona lub zmienna, - brak aktywności

związki toksyczne bakterie Gram-dodatnie (nie uwzględniając prątków).

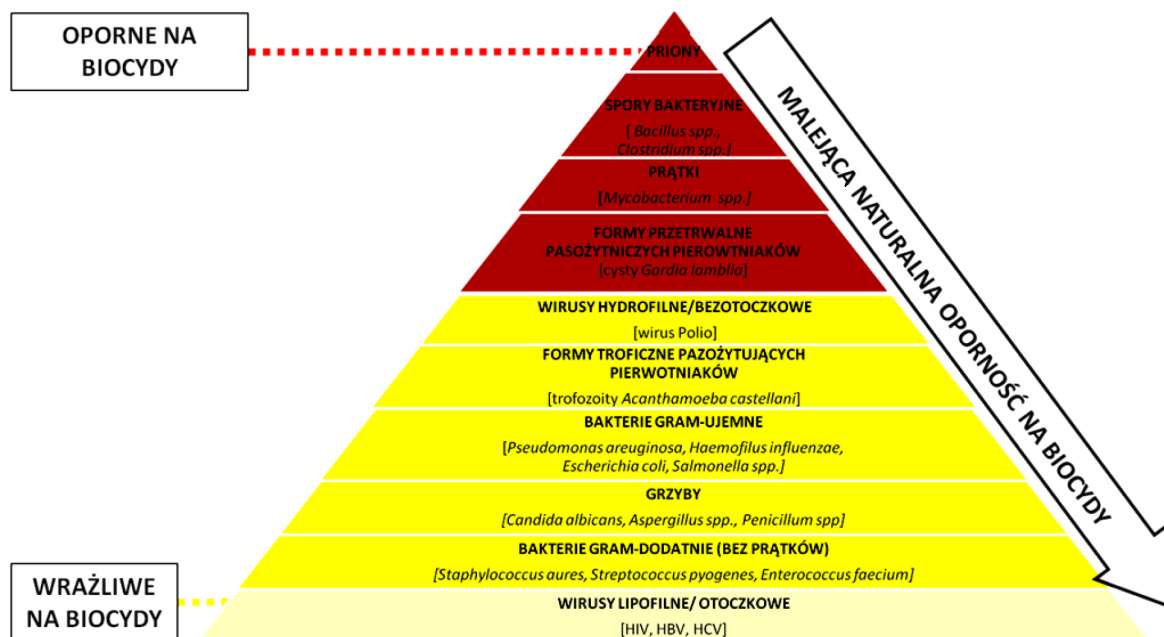
Zdolność związków biobójczych do penetracji osłon komórkowych zależy od wielkości cząsteczek oraz właściwości hydrofobowych lub hydrofilowych substancji stosowanych jako środki dezynfekcyjne. Związki chemiczne o charakterze hydrofilowym, np. kationowe związki powierzchniowo czynne o niskiej masie cząsteczkowej (< 600 Da) zazwyczaj swobodnie przenikają przez błonę zewnętrzną bakterii Gram-ujemnych przez poryny (hydrofilowe, białkowe kanały przebijające ścianę komórkową, wypełnione wodą) [5,13]. Substancje o większej masie cząsteczkowej lub lipofilowej strukturze (np. aldehydy, fenol i jego pochodne) mają utrudnione przenikanie do wnętrza komórki bakteryjnej [25]. Grupa kationowych związków, jak np. czwartorzędowe sole amoniowe czy biguanidyny, wykazują właściwości „promowania”, ułatwiającego własnego wnikania do komórek bakteryjnych. Substancje te destabilizują błonę komórkową bakterii, czyniąc ją bardziej przepuszczalną dla swoich własnych cząsteczek [24]. Penetracja związków, zwłaszcza o dużej masie cząsteczkowej, powoduje zaburzenia stabilności i przepuszczalności błon cytoplazmatycznych, czego konsekwencją jest wyciek drobnocząsteczkowych składników komórkowych (np. zasad purynowych i pirymidynowych, niektórych jonów i fosforanów) z cytoplazmy na zewnątrz komórki bakteryj-

nej. Na tym etapie działania środków dezynfekcyjnych nie dochodzi od razu do śmierci komórek bakteryjnych, ale najczęściej zostają zahamowane podziały komórkowe całej populacji bakterii lub jej części [30,44,52].

MECHANIZMY DZIAŁANIA BIOCYDÓW WZGLĘDEM ŚCIANY KOMÓRKOWEJ, BŁONY CYTOPLAZMATYCZNEJ BAKTERII

Aktywność środków dezynfekcyjnych jest skierowana na struktury, które odpowiadają za utrzymanie ogólnej integralności i funkcjonalności komórki, elementami tymi są: ściana komórkowa, błona cytoplazmatyczna oraz cytoplazma. W tych obszarach komórkowych zachodzi wiele podstawowych dla komórki bakteryjnej, złożonych reakcji biochemicznych, w związku z czym środki dezynfekcyjne działające na te struktury, jednocześnie wpływają na dane procesy [14,52].

Biocydy mogą zakłócić biosyntezę struktury ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych na skutek wiązania jonów magnezu, które stabilizują lipopolisacharyd (LPS). Usunięcie jonów Mg^{2+} przez związki chelatujące, takie jak EDTA powoduje uwalnianie z komórek pęcherzyków błonowych zawierających LPS i zmianę przepuszczalności błony zewnętrznej bakterii [60]. Chlorheksydyna czy aldehydy (np. glutaraldehyd lub formaldehyd) wiążą się nieodwracalnie z LPS i peptydoglikanem. Pod wpływem działania chlorheksydyny następuje deformacja



Ryc. 1. Schemat poziomu naturalnej wrażliwości na biocydy (środki antyseptyczne i dezynfekcyjne) poszczególnych grup mikroorganizmów, ich form przetrwałych oraz prionów. Informacje zebrano na podstawie badań doświadczalnych [41,44]

ściany komórkowej, powstają pęcherze, wpuklenia jej struktury, co prowadzi do śmierci komórki bakteryjnej, podobnie jak w przypadku działania aldehydu [41,56].

Na poziomie błony cytoplazmatycznej zachodzą liczne interakcje między fosfolipidami, białkami enzymatycznymi i białkami strukturalnymi, utrzymujące wewnątrzkomórkową homeostazę, prawidłowy transport i metabolizm komórkowy [14,35]. Oprócz zaburzeń przepuszczalności błony cytoplazmatycznej, środki dezynfekcyjne mogą powodować aktywację enzymów autolitycznych i indukować powstawanie wolnych rodników [14]. W błonie cytoplazmatycznej zachodzą główne procesy związane z pozyskiwaniem energii, a biocydy, takie jak fenol i jego pochodne, zaburzają transbłonowy transport protonów, czyli siłę protonomotoryczną (proton motive force, PTM) w poprzek błony cytoplazmatycznej. Następuje zaburzenie oksydacyjnej fosforylacji, syntezy ATP i zahamowanie transportu różnych substratów poprzez błonę cytoplazmatyczną [1].

Biocydy, których cząsteczki przedostaną się do cytoplazmy komórek bakteryjnych wchodzi w interakcje z białkami, kwasami nukleinowymi, powodując zaburzenie prawidłowego przebiegu procesu replikacji, czy procesu oddychania komórkowego. Związki utleniające, do których należą: nadtlenek wodoru, kwas podchloryny, kwas nadoctowy i inne, powodują utlenianie grup tiolowych reszt cysteinowych, które determinują strukturę i funkcję białek. Reszty cysteiny często się znajdują w miejscach aktywnych wielu enzymów bakteryjnych, jak np. dehydrogenaz, w związku z czym te oraz inne ważne dla komórki bakteryjnej enzymy są inaktywowane przez związki utleniające [9]. Związki z grupy aldehydów

oraz tlenek etylenu reagują z grupami funkcyjnymi białek, takimi jak: sulfhydrylowymi, aminowymi i karboksylowymi, powodując nieodwracalną alkilację białek i tym samym modyfikację ich struktury [44]. Inne biocydy: fenol i jego pochodne, czwartorzędowe sole amoniowe, chlorheksydyna, chlorowcopochodne, jod i jego pochodne, metale ciężkie (srebro, miedź) oraz związki utleniające powodują denaturację białek, prowadząc stopniowo do koagulacji cytoplazmy i śmierci komórki bakteryjnej [39]. Denaturacja białek cytosolowych wynika z uszkodzenia wiązań i oddziaływań stabilizujących strukturę białkowe, np. mostków disiarczkowych, wiązań wodorowych, oddziaływań hydrofobowych i wiązań jonowych [35,44].

Barwniki akrydynowe (proflawina) uszkadzają materiał genetyczny mikroorganizmów przez wiązanie się z DNA na zasadzie interkalacji, uniemożliwiając tym samym prawidłowy proces replikacji i transkrypcji [35]. Także czwartorzędowe związki amoniowe mogą oddziaływać z kwasami nukleinowymi powodując ich precipitację [12]. Formaldehyd reaguje z zasadami pirydynowymi i purynowymi, powodując pojedyncze mutacje skutkujące zmianą ekspresji genów bakteryjnych [38].

Najbardziej istotne mechanizmy działania związków dezynfekcyjnych na drobnoustroje z podziałem na rodzaj oddziaływań (reakcje chemiczne, interakcje o charakterze jonowym oraz oddziaływanie fizyczne), przedstawiono w tabeli 2. Na ryc. 2 przedstawiono schematycznie miejsca docelowego działania wybranych związków chemicznych w komórce bakteryjnej. W zależności od klasy chemicznej biocydów są obserwowane interakcje z komórkami bakteryjnym o charakterze che-

micznym (np. kwas nadoctowy, formaldehyd, proflawina); oddziaływań jonowych (np. czwartorzędowe sole amoniowe, biguanidyny); oddziaływań fizycznych (np. fenol i alkohole alifatyczne).

ODPOWIEDŹ BAKTERII NA CZYNNIKI NIEKORZYSTNE - MECHANIZMY OPORNOŚCI BAKTERII NA BIOCYDY

Stres działający na mikroorganizmy jest pojmowany jako odchylenie od optymalnych warunków wzrostowych, czego rezultatem jest spadek tempa wzrostu. Czynniki stresowe działające na mikroorganizmy mogą spowodować zmianę ekspresji genów, a to może skutkować syntezą białek, które nie są wytwarzane w optymalnych warunkach wzrostu [50]. Bakterie poddane działaniu biocydów, wykształcają liczne adaptacje, które warunkują tolerancję lub oporność drobnoustroju na szeroki zakres związków szkodliwych [55]. Najwięcej dowodów na istnienie zjawiska oporności bakterii na biocydy pochodzi z badań prowadzonych *in vitro*. Także z miejsc praktycznego stosowania biocydów są izolowane mikroorganizmy o zmniejszonej wrażliwości na związki chemiczne, np.:

- szczep *Mycobacterium chelonae* wyizolowany z myjki endoskopu zawierającej preparat dezynfekcyjny wykazywał oporność na glutaraldehyd w stężeniu 2%;
- szczep *Acinetobacter faecalis* wyizolowany z powierzchni na których pozostały resztki środków dezynfekcyjnych zawierających fenol wykazywał oporność na dany związek w stosunku do szczepu dzikiego [45].

Populację mikroorganizmów można określić, jako oporną na biocydy, gdy stężenie biocydu zalecane przez producenta do użytku (in-use concentration) lub stężenie, które wykazuje działanie bójcze lub statyczne względem innych szczepów, nie eliminuje danego drobnoustroju [50].

Zmniejszona podatność bakterii na biocydy może być warunkowana przez wewnętrzne, mechanizmy oporności komórki bakteryjnej (intrinsic resistance) lub nabyte mechanizmy oporności (acquired resistance) wraz z ruchomymi elementami genetycznymi (np. plazmidy, transpozony, fagi) bądź wytworzona jako skutek mutacji. Za główne mechanizmy zmniejszonej wrażliwości na biocydy uważa się: zmianę ultrastruktury osłon komórkowych: LPS, błonowe kwasy tłuszczowe (destabilizacja i utrata LPS ze ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, zmiana proporcji ilości kwasów tłuszczowych nasyconych do nienasyconych) nadekspresja pomp efflux, represja biosyntezy poryn, enzymatyczną inaktywację biocydu, zmianę miejsc docelowego działania [22,44]. Oporność naturalna stanowi wrodzoną cechę danej grupy mikroorganizmów lub może być wykształcona w wyniku zmian adaptacyjnych. Niekiedy nawet ten sam rodzaj mechanizmu zwiększonej oporności bakterii na biocydy, może mieć zróżnicowane uwarunkowania i stanowić konsekwencje następujących procesów:

zmian fenotypowych, zmian indukowanych czynnikami stresowymi, zmian chromosomalnych, zmian plazmidowych. W pracy skoncentrowano się na dwóch obszarach związanych z zagadnieniem oporności na biocydy: naturalnym brakiem wrażliwości mikroorganizmów na biocydy oraz opornością jako wynikiem procesów adaptacyjnych będących odpowiedzią bakterii na działanie szkodliwych związków chemicznych.

ZMNIJSZONA WRAŻLIWOŚĆ NA BIOCYDY JAKO NATURALNA CECHA MIKROORGANIZMÓW

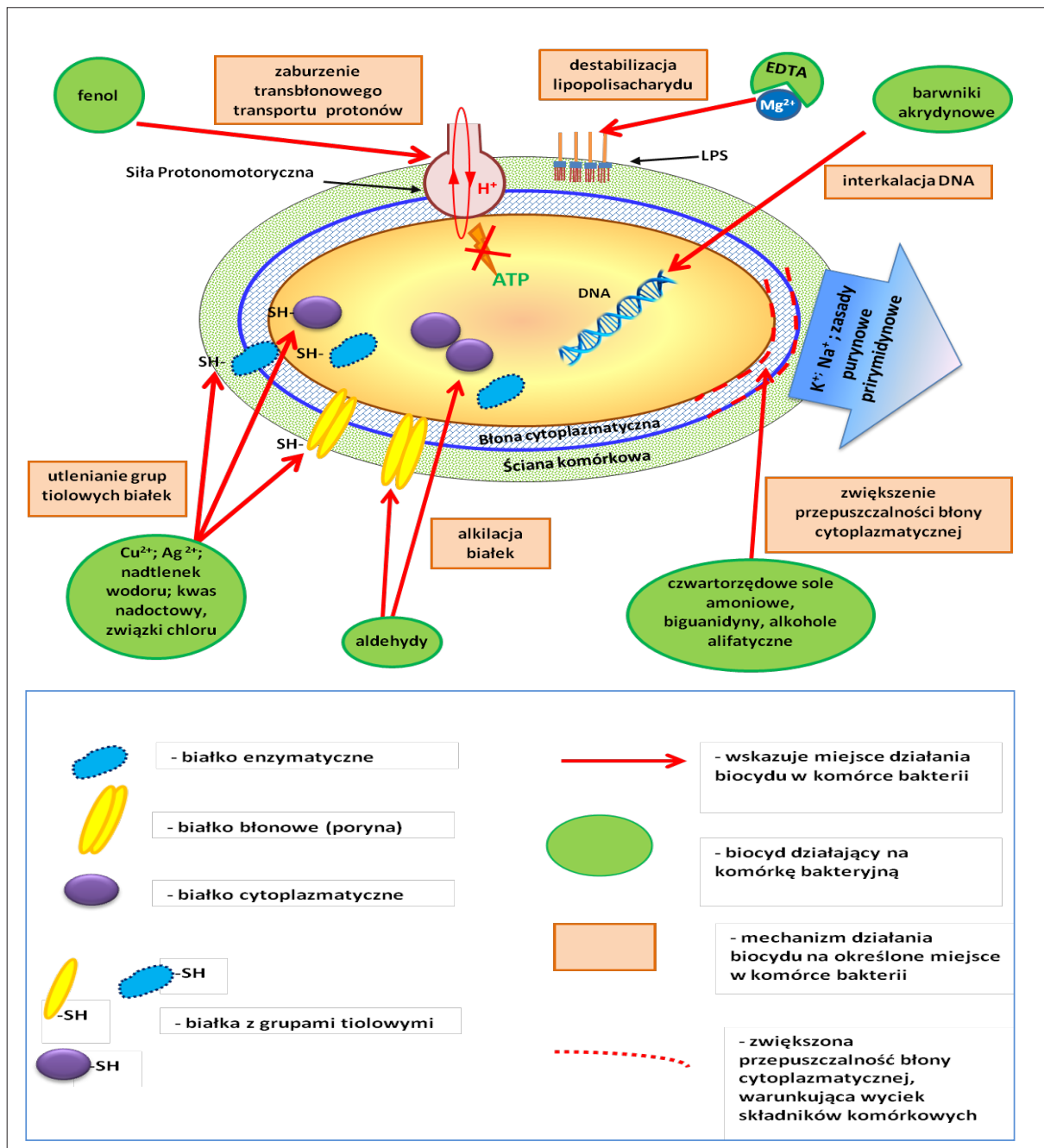
Niektóre grupy mikroorganizmów (bakterie Gram-dodatnie (np. prątki) jak i bakterie Gram-ujemne) mogą mieć specyficzne cechy zapewniające ochronę przed szkodliwymi czynnikami chemicznymi. Wybrane przykłady naturalnej oporności mikroorganizmów oraz ich form przetrwalnych na biocydy przedstawiono w tabeli 3 [8,17]. Bakterie Gram-ujemne odznaczają się naturalnie większą odpornością na działanie szkodliwych czynników zewnętrznych w porównaniu do bakterii Gram-dodatnich, w tym charakteryzują się zdecydowanie mniejszą wrażliwością na przeciwbakteryjne działanie biocydów [49]. Bakterie Gram-ujemne zawierają zewnętrzną błonę (outer membrane, OM) bogatą w LPS oraz liczne białka OMPs (outer membrane proteins), która tworzy nieprzepuszczalną barierę, utrudniającą penetrację niektórych biocydów np. czwartorzędowych związków amoniowych, biguanidyny. W porównaniu do bakterii Gram-ujemnych, ściana komórki bakterii Gram-dodatnich z grubą warstwą peptydoglikanu wykazuje dużą wytrzymałość mechaniczną, lecz jest jednocześnie stosunkowo łatwo przepuszczalna i nie tworzy skutecznej ochrony przed dyfuzją biocydów i antybiotyków [53]. Naturalną zmniejszoną wrażliwość na szeroki zakres dezynfektantów wykazują mikobakterie, czyli prątki, co wynika z dużej zawartości lipidów i dużej woskowości ściany komórkowej (szkielet mikroarabionogalaktanu) [49]. Oporność prątków na biocydy jest zależna od zawartości lipidów, która jest zmienna w obrębie poszczególnych gatunków tej grupy drobnoustrojów. Szczepy *Mycobacterium phlei*, o małej zawartości lipidów są bardziej podatne na działanie czwartorzędowych związków amoniowych niż *M. tuberculosis* o większej zawartości lipidów w błonie [7]. Należy także nadmienić o naturalnej oporności przetrwalników bakteryjnych (spor) na działanie czynników chemicznych i fizycznych [27,52]. Spory pozostają niewrażliwe na działanie wielu biocydów np. fenolu, alkoholi, QACs, związków organicznych rtęci, które są bardzo toksyczne względem wegetatywnych komórek bakterii. Zaledwie kilka klas związków chemicznych, takich jak aldehydy, tlenek etylenu czy związki utleniające wykazują działanie sporobójcze [48].

ADAPTACJE FENOTYPOWE BAKTERII WARUNKUJĄCE ZMNIJSZONĄ WRAŻLIWOŚĆ NA ŚRODKI DEZYNFEKCYJNE

Fenotyp oporności na biocydy ekspresjonowany przez bakterie może się znacząco zmieniać pod wpływem takich bodźców jak: utrudniona dostępność składników odżywczych i tlenu, faza wzrostu w jakiej znajdują się

Tabela 2. Mechanizmy oddziaływań wybranych związków chemicznych stosowanych jako środki dezynfekcyjne z potencjalnymi miejscami w komórkach bakterii oraz spodziewany efekt działania przeciwdrobnoustrojowego, na podstawie [14]

| Grupa chemiczna związków o danej aktywności przeciwdrobnoustrojowej | Miejsce docelowego działania biocydu w komórce | Efekt aktywności przeciwdrobnoustrojowej | Mechanizm działania |
|--|--|--|--|
| Interakcje biocydu ze strukturami mikroorganizmów o charakterze reakcji chemicznych | | | |
| Sole, metale ciężkie, związki rtęci, związki utleniające: nadtlenek wodoru, kwas nadoctowy, związki chloru | Białka cytoplazmatyczne, błonowe, lub enzymatyczne zawierające grupy tiolowe | Inhibicja, zaburzenie reakcji metabolicznych | Utlenianie grup tiolowych białek |
| Aldehydy: glutaraldehyd, formaldehyd, chloroacetamid | Białka, DNA, RNA i inne składniki komórki, zawierające w swojej strukturze grupy: aminowe, amidowe, iminowe, karboksylowe, tiolowe | Zaburzenie procesów metabolicznych, uszkodzenie materiału genetycznego zahamowanie replikacji i transkrypcji, uszkodzanie zewnętrznych osłon komórkowych, hamowanie transportu komórkowego | Alkilacja |
| EDTA | Dwuwarstwa fosfolipidowa, błona zewnętrzna bakterii Gram- ujemnych, błona cytoplazmatyczna | Zaburzenie struktury i przepuszczalności błon biologicznych - wyciek drobnocząsteczkowych komponentów komórkowych, zahamowanie podziałów komórkowych i procesów metabolicznych | Chelatacja jonów stabilizujących strukturę błony |
| Barwniki akrydynowe: proflawina | DNA | Uszkodzenia materiału genetycznego, zahamowanie replikacji i transkrypcji, zahamowanie podziałów komórkowych | Interkalacja dwuniciowej struktury DNA |
| Interakcje biocydu ze strukturami mikroorganizmów o charakterze oddziaływań jonowych | | | |
| Czwartorzędowe sole amoniowe, biguanidyny | Błona cytoplazmatyczna, białka (w tym enzymy) związane z błoną komórkową | Zaburzenie przepuszczalności błony i transportu błonowego, zahamowanie procesów oddechowych, koagulacja cytoplazmy | Oddziaływania elektrostatyczne z fosfolipidami |
| Interakcje biocydu ze strukturami mikroorganizmów o charakterze oddziaływań fizycznych | | | |
| Fenol, kwasy organiczne | Błona cytoplazmatyczna | Zaburzenie przepuszczalności błony cytoplazmatycznej, zahamowanie procesów oddechowych, zaburzenie procesu pozyskiwania energii | Penetracja i zaburzenie struktury dwuwarstwy fosfolipidowej błony i przemieszczenie jej komponentów, zaburzenia procesów przebiegających w obrębie błony |
| Alkohole alifatyczne | Błona cytoplazmatyczna | Zmiana przepuszczalności i uszkodzenia błony komórkowej, zaburzenie procesów metabolicznych | Niszczenie struktury fosfolipidów; denaturacja białek |



Ryc. 2. Wybrane miejsca docelowego działania (target) związków chemicznych stosowanych jako biocydy w komórce bakteryjnej, na podstawie [8,13,14,40]

bakterie oraz występowanie mikroorganizmów w postaci biofilmów. Bakterie w odpowiedzi na ograniczony dostęp składników odżywczych oraz wchodzące w stacjonarną fazę wzrostu wykazują zwiększoną oporność na różnego rodzaju związki przeciwdrobnoustrojowe. Przyczyną tego zjawiska są prawdopodobnie modyfikacje w powierzchniowych osłonach komórkowych, np. nadprodukcja białek powierzchniowych lub wytwarzanie otoczek polisacharydowych [23]. W odpowiedzi na stres selekcyjny, jakim jest ekspozycja bakterii zwłaszcza na niskie, subinhibitorowe stężenia biocydów może nastąpić wykształcenie mechanizmów warunkujących zmniejszoną wrażliwość na dane

związki. Działanie biocydów w niskich stężeniach na mikroorganizmy indukuje dwa podstawowe mechanizmy oporności: nadekspresję pomp efflux (głównie u bakterii Gram-ujemnych) oraz wytwarzanie przez bakterie enzymów inaktywujących biocydy [6,23]. Modyfikacje nabyte w procesie adaptacyjnym zazwyczaj nie są przekazywane komórkom potomnym i najczęściej zanikają lub zmniejszają się po usunięciu czynnika selekcyjnego. Jednak niekiedy zmiany adaptacyjne mogą mieć rozległy, globalny wpływ na komórkę bakteryjną prowadząc do trwałych zmian morfologicznych, modyfikacji procesów metabolicznych czy fizjologicznych [10,22,45].

Tabela 3. Przykłady naturalnej oporności mikroorganizmów oraz ich form przetrwanych na biocydy, wynikającej ze zmniejszonej przepuszczalności osłon powierzchniowych, na podstawie [8,49]

| Grupa mikroorganizmów oraz ich form przetrwanych | Cechy warunkujące zmniejszoną przepuszczalność osłon powierzchniowych dla toksycznych związków |
|--|---|
| Prątki | Woskowata ściana komórkowa dzięki dużej zawartości kwasów tłuszczowych |
| Przetrwalniki bakteryjne | Złożona struktura budowy osłon powierzchniowych spor (płaszcz, cortex) |
| Bakterie Gram-ujemne | Błona zewnętrzna (OM) ściany komórkowej zawierająca lipopolisacharydy (LPS) i białka błony wewnętrznej (OMPs) |
| Bakterie Gram-dodatnie | Niektóre gatunki lub szczepy bakterii Gram-dodatnich mogą zawierać otoczki cukrowe lub wydzielac ochronną warstwę śluzu |

Stan fizjologiczny drobnoustrojów w znaczący sposób wpływa na efektywność działania biocydów [61]. Foley wykazał, że bakterie wchodzące w stacjonarną fazę wzrostu znajdują się w fazie uśpienia, podobnie jak spory wykazują zwiększoną oporność na czynniki fizyczne i chemiczne [19]. W warunkach niedoboru składników pokarmowych, następuje zmiana fazy wzrostu bakterii z ekspotencjalnej do spowolnionego wzrostu, z czym skorelowany jest często wzrost oporności na czynniki chemiczne [40]. Także mikroorganizmy namnażające się wewnątrz komórek żywiciela, wytwarzają fenotyp zwiększonej oporności umożliwiając im przetrwanie w niesprzyjającym środowisku. *Legionella pneumophila*, namnażająca się w makrofagach, wykazuje nawet 1000-krotny wzrost oporności na biocydy (biguanidyny, izotiazol, czwartorzędowe związki amoniowe) i antybiotyki, w porównaniu do komórek z hodowli *in vitro* [2]. Inną postacią adaptacji fenotypowej warunkującej zmniejszoną wrażliwość na biocydy jest wytwarzanie zewnętrzkomórkowych otoczek śluzowych. Szczep *Staphylococcus epidermidis* wydzielający śluzową otoczkę wykazywał zwiększoną oporność na antybiotyki w porównaniu do szczepu niemającego takiej zdolności [17,26].

Znakomitym przykładem na to jak zmiany fizjologiczne bakterii wpływają na ich wrażliwość na związki chemiczne jest tworzenie biofilmu bakteryjnego. W biofilmie, który ma postać trójwymiarowego konsorcjum, przytwierdzonego do powierzchni stałej (biotycznej lub abiotycznej), komórki bakterii tworzą mikrokolonie zanurzone w zewnętrzkomórkowym, polisacharydowym matrix. Wielopoziomowa struktura biofilmów, duże zagęszczenie mikroorganizmów sprawia, że komórki bakteryjne w zależności od umiejscowienia i zajmowanej pozycji w biofilmie mogą wykazywać zróżnicowane właściwości fizjologiczne [22]. Komórki w głębszych partiach są narażone na warunki mniejszego stężenia tlenu, niedoboru składników odżywczych, nagromadzenia metabolitów i znajdują się w fazie spowolnionego wzrostu i uśpienia metabolicznego. Taka populacja bakterii wykazuje tym samym obniżoną wrażliwość na działanie substancji przeciwdrobnoustrojowych. Natomiast bakterie zasiedlające powierzchniowe warstwy biofilmów,

mające optymalne warunki wzrostu wykazują fenotyp zbliżony do komórek w postaci planktonicznej i są wrażliwe na działanie biocydów [4]. Bakterie w głębszych warstwach błon biologicznych, wykazują wzmoczone wytwarzanie polisacharydów zewnątrzkomórkowych i różnych enzymów hydrolitycznych oraz zwiększoną biosyntezę pomp efflux [22]. Ponadto, ze względu na polisacharydową macierz, dyfuzja biocydów jest utrudniona w obrębie biofilmów, przez co związki biobójcze nie docierają do wszystkich mikroorganizmów w odpowiednio wysokich stężeniach. Związki chemiczne mogą wchodzić w reakcje ze składnikami matrix i ulegać tym samym modyfikacji lub inaktywacji. Przypuszcza się, że w głębszych warstwach błon biologicznych, może zachodzić selekcja szczepów opornych na substancje biobójcze [21,22].

MODYFIKACJA BŁONOWYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH, JAKO ODPOWIEDŹ BAKTERII NA EKSPOZYCJĘ NA BIOCYDY

Modyfikacja składu lipidów błonowych jest częstą odpowiedzią bakterii na działanie substancji toksycznych. Stanowi jeden z głównych mechanizmów zapewniających utrzymanie integralności i prawidłowe funkcjonowanie błon cytoplazmatycznych. Przypuszcza się, że zmniejszona wrażliwość na biocydy może się wiązać z modyfikacjami błonowej frakcji lipidów, które mają na celu „uszczelnienie” błony komórkowej [10]. Zaobserwowano nadprodukcję błonowych, hydroksylowanych kwasów tłuszczowych przez szczepy *Pseudomonas aeruginosa* w odpowiedzi na działanie czwartorzędowych związków amoniowych [43]. Innym przykładem jest ekspozycja szczepów *Escherichia coli* na etanol i aceton, która skutkowałą zwiększeniem się udziału nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonie komórkowej. Natomiast hodowla tego samego szczepu *E. coli* w obecności chloroformu i benzenu doprowadziła do zwiększonej syntezy nienasyconych, błonowych kwasów tłuszczowych [28]. Ekspozycja szczepów *Cronobacter sakazakii* na podwyższoną temperaturę, skutkowałą zmianą składu kwasów tłuszczowych w błonie (wzrost zawartości kwasu mirystynowego i palmitynowego) i wzrostem oporności tych wariantów szczepów na czwartorzędowe związki amoniowe [37].

ENZYMATYCZNA INAKTYWACJA BIOCYDÓW

Niektóre bakterie są odporne na biocydy przez powodowanie ich degradacji lub modyfikacji z użyciem odpowiednich enzymów, czego rezultatem jest utrata toksycznego działania danej substancji [45]. Niekiedy wytwarzanie enzymów powodujących unieczynnienie biocydów może być naturalną cechą danej grupy bakterii bądź warunkowana plazmidowo. Najpowszechniej znanym przykładem jest enzymatyczna redukcja toksycznych metali ciężkich dzięki wytwarzanym przez bakterie enzymom redukującym metale do mniej toksycznych postaci utlenowanych [8]. Przykładem są bakterie *Desulfovibrio desulfuricans* i *Desulfobulbus rhabdiformis* [42] redukujące żelazo, miedź i cynk, które są niewrażliwe na wysokie letalne dla innych mikroorganizmów stężenia tych metali, tj. Fe (400 mg/l), Zn (150 mg/l) i Cu (80 mg/l). Mikroorganizmy tlenowe są wyposażone w enzymy, które neutralizują toksyczne produkty uboczne powstające w czasie procesu oddychania tlenowego. Katalaza i peroksydaza chronią komórki bakterii przed toksyczną aktywnością nadtlenu wodoru, a dysmutaza ponadtlenkowa zabezpiecza przed szkodliwym działaniem wysoce reaktywnych rodników ponadtlenkowych [23]. Innym przykładem jest inaktywacja enzymatyczna formaldehydu przez *Pseudomonas putida* oraz pałeczki *Enterobacteriaceae*, które mogą nabywać plazmid zawierający gen *adhC* kodujący dehydrogenazę formaldehydu [22,34]. Przypuszcza się, że pod wpływem czynnika stresowego jakim jest działanie danych związków toksycznych w komórkach bakteryjnych może dojść do indukcji ekspresji odpowiednich enzymów rozkładających i unieszkodliwiających biocydy [45].

NIEPRAWIDŁOWE PROCEDURY DEZYNFEKCYJNE JAKO ŹRÓDŁO ZAGROZEŃ ZDROWOTNYCH I HIGIENICZNO-SANITARNYCH

Utrzymanie odpowiedniej czystości i higieny w przemyśle ma fundamentalne znaczenie przy produkcji i obrocie żywnością. Mycie i dezynfekcja należą do najważniejszych składowych Dobrej Praktyki Produkcyjnej - GMP (good manufacturing practice) Dobrej Praktyki Higienicznej - GHP (good hygiene practice). Według Ustawy nr 171, poz. 1225 o bezpieczeństwie żywności i żywienia z dnia 25 sierpnia 2006 r. [59] GMP to działania, które muszą być podjęte i które muszą być spełnione, aby produkcja żywności oraz materiałów i wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością odbywała się w sposób zapewniający bezpieczeństwo żywności zgodnie z jej przeznaczeniem. Dobra Praktyka Higieniczna odnosi się natomiast do działań, które muszą być podjęte i warunków higienicznych, które muszą być spełnione i kontrolowane na wszystkich etapach produkcji lub obrotu, aby zapewnić bezpieczeństwo żywności. Zgodnie z tymi wymogami prawnymi każdy zakład zajmujący się produkcją, przetwarzaniem lub wprowadzaniem żywności do obrotu ma obowiązek wdrożyć i stosować zasady GMP/GHP oraz System Analizy Zagrożeń i Krytycznych Punktów Kontroli - HACCP (hazard analysis and critical control points).

System HACCP identyfikuje, ocenia i kontroluje zagrożenia istotne z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności. Do najistotniejszych zagrożeń rozpatrywanych podczas analizy HACCP należą zagrożenia mikrobiologiczne związane z zanieczyszczeniem żywności przez drobnoustroje. W zależności od specyfiki przetwarzanego produktu należy się spodziewać w obiektach produkcyjnych różnych grup mikroorganizmów, np. bakterii z rodzaju *Clostridium* i *Listeria* [32]. Większość zagrożeń mikrobiologicznych można wyeliminować przez skuteczne stosowanie procedur mycia i dezynfekcji. Prawidłowe przeprowadzenie procesu mycia, a następnie dezynfekcji, wymaga uwzględnienia m.in. takich czynników jak rodzaj zanieczyszczeń, stopień zanieczyszczenia powierzchni, rodzaj powierzchni, rodzaj materiału, cykl produkcji oraz środki i urządzenia do mycia i dezynfekcji. Mycie i dezynfekcja powinny przebiegać w następujących etapach: usunięcie mechaniczne zanieczyszczeń widocznych gołym okiem; spłukanie zanieczyszczeń bieżącą wodą, mycie właściwe z zastosowaniem odpowiednich detergentów, spłukanie środków myjących, dezynfekcja za pomocą odpowiednich preparatów chemicznych, dokładne spłukanie wodą środka dezynfekcyjnego i osuszenie powierzchni, dezynfekcja metodami chemicznymi i/lub fizycznymi [31,32].

Wszelkie stosowane środki zarówno myjące jak i dezynfekujące powinny mieć atest lub świadectwo dopuszczenia do stosowania w przemyśle spożywczym. Powinny też być dostosowane do konkretnej branży spożywczej [32].

Do najczęściej występujących nieprawidłowości podczas dezynfekcji można zaliczyć [33]:

- przeprowadzenie procesu dezynfekcji bez wcześniejszego przeprowadzenia procesu mycia;
- użycie środka dezynfekcyjnego nieodpowiedniego do typu zanieczyszczenia mikrobiologicznego;
- stosowanie środków bez przestrzegania zasad zalecanych przez producenta;
- niedostateczny czas kontaktu między środkiem bakteriobójczym a dezynfekowaną powierzchnią;
- długotrwałe stosowanie w danym środowisku preparatu należącego do tej samej grupy związków chemicznych.

Największym zagrożeniem dla prawidłowego procesu dezynfekcji jest nieprawidłowe stężenie użytych środków biobójczych [31]. W praktyce biocydy są stosowane w bardzo dużych stężeniach, przewyższających dawkę letalną. Jednak istnieje duże ryzyko rozcieńczenia biocydu w czasie jego używania, np. przy nieprawidłowym sporządzaniu roztworu z koncentratu danego środka. Ponadto występowanie na dezynfekowanym obszarze materii organicznej, barier fizycznych, wody pozostałej po niepoprawnie przeprowadzonych procedurach mycia, mogą powodować rozcieńczenie lub inaktywację substancji aktywnych chemicznie. W konsekwencji zaistnienia wymienionych czynników bakterie mogą

być ekspozowane na działanie niskich, subinhibitorowych stężeń biocydów [3]. Okazuje się, że mikroorganizmy poddane długoterminowemu działaniu niewielkich stężeń związków toksycznych mogą się stawać odporne także na antybiotyki bez wcześniejszego kontaktu z danym lekiem. Jest to tzw. oporność krzyżowa, w której mechanizmy wytworzone wobec danej substancji szkodliwej warunkują równocześnie całkowity lub częściowy brak wrażliwości na inne substancje należące do tej samej lub zupełnie innej klasy związków chemicznych. Badania *in vitro* potwierdzają możliwość jednoczesnego nabywania przez bakterie oporności na antybiotyki i chemioterapeutyki. Ekspozycja *Salmonella* spp. na środek dezynfekcyjny zawierający czwartorzędowe sole amoniowe oraz formaldehyd i glutaraldehyd, pozwoliła uzyskać stabilne warianty *Salmonella* spp. o nadekspresji pomp efflu AcrAB-TolC oraz warianty *Salmonella* spp. o zmniejszonej wrażliwości na antybiotyki: ciprofloksacynę, chloramfenikol, tetracyklinę i ampicylinę w porównaniu do szczepu dzikiego [10]. Braoudaki i wsp. wykazali, że ekspozycja szczepu *E. coli* O157:H7 na subinhibitorowe stężenia triclosanu indukowała oporność krzyżową na triclosan i jednocześnie na antybiotyki: chloramfenikol, tetracyklinę, amoksyycylinę, trimetoprim, chlorek benzalkoniowy i chlorheksydynę [3]. Jeżeli zjawisko to zachodzi w miejscach powszechnego stosowania biocydów, np. czwartorzędowych związków amoniowych, może być źródłem generowania i rozprzestrzeniania się bakterii potencjalnie

patogennych o fenotypie wielolekooporności. Stanowi to poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego, gdyż szczepy odporne na biocydy i antybiotyki mogą wywoływać infekcje o zdecydowanie zawężonych możliwościach terapeutycznych.

PODSUMOWANIE

Wszelkiego rodzaju biocydy: środki dezynfekcyjne i antyseptyczne oraz konserwanty są obecnie stosowane w każdej dziedzinie sektora życia człowieka w znacznych ilościach, a ich użycie zazwyczaj nie podlega tak ścisłej kontroli jak w przypadku antybiotyków. Związki biobójcze należą do różnych klas chemicznych (np. aldehydy, alkohole, kationowe związki powierzchniowo czynne, związki utleniające, fenole) i ze względu na różny charakter i reaktywność chemiczną substancje te oddziałują z różnymi strukturami komórki bakteryjnej (np. błona cytoplazmatyczna, DNA). Bakterie jako grupa mikroorganizmów o dużych zdolnościach adaptacyjnych, wytwarzają w odpowiedzi na działanie biocydów odpowiednie mechanizmy warunkujące zmniejszoną wrażliwość (np. modyfikacje błonowych kwasów tłuszczowych, enzymatyczna inaktywacja biocydów). W związku z tym, iż jest duże prawdopodobieństwo wystąpienia omawianego fenomenu oporności bakterii na biocydy, konieczna jest edukacja z zakresu prawidłowych procesów sanitarno-higienicznych, co jest gwarancją bezpieczeństwa zdrowia publicznego.

PIŚMIENICTWO

- [1] Akiyama Y.: Proton-motive force stimulates the proteolytic activity of FtsH, a membrane-bound ATP-dependent protease in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002; 99: 8066-8071
- [2] Barker J., Brown M.R., Collier P.J., Farrell I., Gilbert P.: Relationship between *Legionella pneumophila* and *Acanthamoeba polyphaga*: physiological status and susceptibility to chemical inactivation. Appl. Environ. Microbiol., 1992; 58: 2420-2425
- [3] Braoudaki M., Hilton A.C.: Low level of cross-resistance between triclosan and antibiotics in *Escherichia coli* K-12 and *E. coli* O55 compared to *E. coli* O157. FEMS Microbiol. Lett., 2004; 235: 305-309
- [4] Brown M.R., Collier P.J., Gilbert P.: Influence of growth-rate on the susceptibility to antimicrobial agents: modification of the cell envelope and batch and continuous culture studies. Antimicrob. Agents Chemother., 1990; 34: 1623-1628
- [5] Brown M.R., Gilbert P., Klemperer R.M.: Influence of the bacterial cell envelope on combined antibiotic action. W: Antibiotic Interactions, red.: J.D. Williams. Academic Press, London 1980: 69-86
- [6] Buckley A.M., Webber M.A., Cooles S., Randall L.P., La Ragione R.M., Woodward M.J., Piddock L.J.: The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium plays a role in pathogenesis. Cell Microbiol., 2006; 8: 847-856
- [7] Chargaff E., Pangborn M.C., Anderson R.J.: The chemistry of the lipoids of tubercle bacilli. XXIII. Separation of the lipid fractions from the *Timothy bacillus*. J. Biol. Chem., 1931; 90: 45-55
- [8] Cloete T.E.: Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. Int. Biodeterior. Biodegradation, 2003; 51: 277-282
- [9] Collier P.J., Ramsey A.J., Austin P., Gilbert P.: Growth inhibitory and biocidal activity of some isothiazolone biocides. J. Appl. Bacteriol., 1990; 69: 569-577
- [10] Davin-Regli A., Pagès J.M.: Cross-resistance between biocides and antimicrobials: an emerging question. Rev. Sci. Tech., 2012; 31: 89-104
- [11] de Oliveira F.A., Brandelli A., Tondo E.C.: Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. New Microbiol., 2006; 29: 49-54
- [12] Del Sal G., Manfioletti G., Schneider C.: The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. Bio-techniques, 1989; 7: 514-520
- [13] Denyer S.P., Maillard J.Y.: Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. J. Appl. Microbiol., 2002; 92 (Suppl.): 35S-45S
- [14] Denyer S.P., Stewart G.S.: Mechanisms of action of disinfectants. Int. Biodeterior. Biodegradation, 1998; 41: 261-268
- [15] Dvorak G.: Disinfection 101. <http://www.cfsph.iastate.edu/Disinfection/Assets/Disinfection101.pdf> (20.07.2014)
- [16] Dyrektywa 98/8/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 16 lutego 1998 r. w sprawie wprowadzania do obrotu produktów biobójczych. <http://urpl.gov.pl/pb-akty-prawne> (20.07.2014)
- [17] Evans E., Brown M.R., Gilbert P.: Iron chelator, exopolysaccharide and protease production of *Staphylococcus epidermidis*: a comparative study of the effects of specific growth rate in biofilm and planktonic culture. Microbiology, 1994; 140: 153-157

- [18] Fàbrega A., Madurga S., Giralt E., Vila J.: Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb. Biotechnol.*, 2009; 2: 40-61
- [19] Foley I., Marsh P., Wellington E.M., Smith A.W., Brown M.R.: General stress response master regulator *rpoS* is expressed in human infection: a possible role in chronicity. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1999; 43: 164-165
- [20] Fraise A.P.: Historical Introduction. W: Russell, Hugo and Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, 4th Edition, red.: A.P. Fraise, P.A. Lambert, J.Y. Maillard. Blackwell Publishing, Oxford 2004: 3-7
- [21] Gilbert P., Allison D.G., Evans D.J., Handley P.S., Brown M.R.: Growth rate control of adherent bacterial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1989; 55: 1308-1311
- [22] Gilbert P., Allison D.G., McBain A.J.: Biofilms *in vitro* and *in vivo*: do singular mechanisms imply cross-resistance? *J. Appl. Microbiol.*, 2002; 92 (Suppl.): 98S-110S
- [23] Gilbert P., McBain A.J.: Potential impact of increased use of biocides in consumer products on prevalence of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2003; 16: 189-208
- [24] Gilbert P., Pemberton D., Wilkinson D.E.: Barrier properties of the Gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides. *J. Appl. Bacteriol.*, 1990; 69: 585-592
- [25] Gilbert P., Wright N.E.: Non-plasmidic resistance towards preservation of pharmaceutical products. W: Preservatives in the Food, Pharmaceutical and Environment Industries, red.: R.G. Board, M.C. Allwood, J.G. Banks. Blackwell Scientific, Oxford, 1987, 255-279
- [26] Gristina A.G., Hobgood C.D., Webb L.X., Myrvik Q.N.: Adhesive colonisation of biomaterials and antibiotic resistance. *Biomaterials*, 1987; 8: 423-426
- [27] Hawkey P.M.: Bacterial resistance. W: Russell, Hugo and Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, 4th Edition, red.: A.P. Fraise, P.A. Lambert, J.Y. Maillard. Blackwell Publishing, Oxford 2004: 191-204
- [28] Ingram L.O.: Changes in lipid composition of *Escherichia coli* resulting from growth with organic solvents and with food additives. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1977; 33: 1233-1236
- [29] Izydorczak M., Stefańska J.: Środek przeciwdrobnoustrojowy triclosan - działanie, zastosowanie i zagrożenia. *Biul. Wydz. Farm. AMW*, 2007; 2: 13-17
- [30] Janowiec M.: Mikrobiologia i serologia. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1988
- [31] Konieczny P., Szymański M., Kopiec D.: Mycie i detergenty w przemyśle spożywczym jako problem środowiskowy. *Przegl. Komunalny*, 2007; 2: 40-44
- [32] Kosek-Paszkowska K., Morzyk K.: Mycie i dezynfekcja jako czynniki eliminujące zagrożenia mikrobiologiczne w przemyśle spożywczym. *Laboratorium*, 2005; 2: 36-38
- [33] Koziróg A.: Dezynfekcja w zakładach produkujących żywność. Problemy mikrobiologiczne. *Przemysł Spożywczy*, 2012; 66: 18-20
- [34] Kümmerle N., Feucht H.H., Kaulfers P.M.: Plasmid-mediated formaldehyde resistance in *Escherichia coli*: characterization of resistance gene. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1996; 40: 2276-2279
- [35] Lambert P.A.: Mechanisms of action of biocides. W: Russell, Hugo and Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, 4th Edition, red.: A.P. Fraise, P.A. Lambert, J.Y. Maillard. Blackwell Publishing, Oxford 2004: 139-153
- [36] Lehne R.A.: Pharmacology for Nursing Care, Saunders/Elsevier, St. Louis 2013
- [37] Li P.T., Hsiao W.L., Yu R.C., Chou C.C.: Effect of heat shock on the fatty acid and protein profiles of *Cronobacter sakazakii* BCRC 13988 as well as its growth and survival in the presence of various carbon, nitrogen sources and disinfectants. *Food Microbiol.*, 2013; 36: 142-148
- [38] Loshon C.A., Genest P.C., Setlow B., Setlow P.: Formaldehyde kills spores of *Bacillus subtilis* by DNA damage and small, acid-soluble spore proteins of the α/β -type protect spores against this DNA damage. *J. Appl. Microbiol.*, 1999; 87: 8-14
- [39] Lucchini J.J., Corre J., Cremieux A.: Antibacterial activity of phenolic compounds and aromatic alcohols. *Res. Microbiol.*, 1990; 141: 499-510
- [40] Mah T.F., O'Toole G.A.: Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.*, 2001; 9: 34-39
- [41] Maillard J.Y.: Bacterial target sites for biocide action. *J. Appl. Microbiol.*, 2002; 92 (Suppl.): 16S-27S
- [42] Martins M., Faleiro M.L., Barros R.J., Veríssimo A.R., Barreiros M.A., Costa M.C.: Characterization and activity studies of highly heavy metal resistant sulphate-reducing bacteria to be used in acid mine drainage decontamination. *J. Hazard. Mater.*, 2009; 166: 706-713
- [43] Mastronicolis S.K., Arvanitis N., Karaliota A., Litos C., Stavroulakis G., Moustaka H., Tsakirakis A., Heropoulos G.: Cold dependence of fatty acid profile of different lipid structures of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.*, 2005; 22: 213-219
- [44] McDonnell G., Russell A.D.: Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999; 12: 147-179
- [45] Meyer B.: Does microbial resistance to biocides create a hazard to food hygiene? *Int. J. Food Microbiol.*, 2006; 112: 275-279
- [46] Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guidelines for Environmental Infection Control in Health-Care Facilities. http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/guidelines/eic_in_hcf_03.pdf (20.07.2014)
- [47] Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 września 2003 r. w sprawie kryteriów i sposobów klasyfikacji substancji i preparatów chemicznych. *Dziennik Ustaw* 2003; nr 171: poz. 1666. <http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU20031711666> (20.07.2014)
- [48] Russell A.D.: Mechanisms of bacterial resistance to biocides. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 1995; 36: 247-265
- [49] Russell A.D.: Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2003; 52: 750-763
- [50] Russell A.D.: Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infect. Dis.*, 2003; 3: 794-803
- [51] Scholar E.M, Pratt W.B.: The Antimicrobial Drugs. Oxford University Press, Oxford 2000
- [52] Stefańska J.: Substancje czynne środków dezynfekcyjnych – mechanizmy działania, oporność drobnoustrojów. *Mikrobiologia Medycyna*, 2000; 22: 17-24
- [53] Stickler D.J.: Bacterial resistance. W: Russell, Hugo and Ayliffe's Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization, 4th Edition, red. A.P. Fraise, P.A. Lambert, J.Y. Maillard. Blackwell Publishing, Oxford 2004: 154-168
- [54] Stobińska H., Brycki B., Gutarowska B., Żakowska Z., Kręgiel D.: Mycie i dezynfekcja w przemyśle. W: Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności, t.2, red.: Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2009, 411-434
- [55] Suller M.T., Russell A.D.: Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus. *J. Hosp. Infect.*, 1999; 43: 281-291
- [56] Tattawasart U., Hann A.C., Maillard J.Y., Furr J.R., Russell A.D.: Cytological changes in chlorhexidine-resistant isolates of *Pseudomonas stutzeri*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2000; 45: 145-152
- [57] Ustawa z dnia 6 września 2001 r. Prawo Farmaceutyczne. *Dzien-*

nik Ustaw 2001; nr 126 poz. 1381. <http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU20080450271> (20.07.2014)

[58] Ustawa z dnia 13 września 2002 r. o produktach biobójczych. Dziennik Ustaw 2002; nr 175; poz. 1433. <http://urpl.gov.pl/pb-akty-prawne> (20.07.2014)

[59] Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Ustawa Nr 171, poz. 1225. <http://isap.sejm.gov.pl/DetailsServlet?id=WDU20061711225> (20.07.2014)

[60] Vaara M.: Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiol. Rev.*, 1992; 56: 395-411

[61] Widmer A. F., Wiestner A., Frei R., Zimmerli W.: Killing of non-growing and adherent *Escherichia coli* determines drug efficacy in device-related infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1991; 35: 741-746

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.