

## Metodické možnosti pro testování účinnosti sanitačních roztoků vůči rizikovým mikroorganismům

Irena Němečková, Jana Smolová, Šárka Havlíková a kol.

### Výběr sanitačních roztoků

- ▶ sanitační roztoky – směsi látek – know-how jejich výrobců
- ▶ výběr sanitačních roztoků na základě dialogu mezi (mlékárenským) podnikem a dodavatelem „chemie“
- ▶ důvody změny sanitačních roztoků
  - ▶ ekonomické/obchodní
  - ▶ provozní kontrola hygieny – zhoršující se trend
  - ▶ výskyt perzistentních zdravotně nebo technologicky rizikových mikroorganismů
  - ▶ prevence adaptace mikroorganismů
  - ▶ prevence pomnožování rezistentních mikroorganismů (zejména dezinfekce)

## Složení sanitačních roztoků

- alkalické čištění  
(rozpuštění organických nečistot – bílkoviny, tuk, ..., biofilmy)
  - NaOH, KOH
- kyselé čištění  
(rozpuštění minerálních usazenin – podkladu pro biofilm)
  - HNO<sub>3</sub>
  - (kys. amidosírová, citronová, fosforečná, ...)
- dezinfekce (usmrcení mikroorganismů)
  - aktivní chlor (NaClO, chloramin)
  - aktivní kyslík (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, kys. peroctová, perboritany)
  - povrchově aktivní látky (kvartérní amoniové soli, alkylpolyglykosidy, alkylaminoxidy, ...)
  - ...

## Povrchově aktivní látky (= tenzidy)

- součást čisticích a dezinfekčních roztoků (též úklidové chemie, pracích prášků, mycí kosmetiky, atd.)
- hromadí se na fázovém rozhraní – vlastnosti:
  - detergenční (čištění povrchů)
  - antiredepoziční (proti zpětnému usazování nečistot)
  - pěnotvorné
  - emulgační
  - antimikrobiální
- přírodního původu
  - saponiny (glykosidické l., hořká chuť luštěnin, čaje, česneku, ...)
  - soli žlučových kyselin (odolné *Enterobacteriaceae*, probiotika)
- syntetické – z tuků nebo ropných produktů

## Povrchově aktivní látky

- ▀ část hydrofobní – alifatický nebo aromatický uhlovodík
- ▀ část hydrofilní – udává funkční vlastnosti
- ▀ anionické
  - ▀ mýdlo  $R-COONa$
  - ▀ alkylsulfáty  $R-SO_4Na$
  - ▀ alkylbenzensulfonáty  $R-benzen-SO_3Na$
- ▀ kationické
  - ▀ kvartérní amoniové soli  $R-N(CH_3)_3Cl$
- ▀ amfoterní (v kys. prostředí kationt, v alk. aniont)
  - ▀ betainy  $R-N(CH_3)_2-CH_2COOH$
  - ▀ aminoxidy  $R_3-N-O$
- ▀ neionické
  - ▀ oxyethylenované mastné alkoholy

Metody testování účinnosti  
sanitačních roztoků  
vůči rizikovým mikroorganismům

## Standardní metody

- ČSN EN 1276 (2010) – baktericidní účinek  
a ČSN EN 1650 + A1 (2013) – fungicidní účinek
  - referenční kmeny (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus*, *E. hirae*, *C. albicans*, *A. niger*) v definovaném fyziologickém stavu dávkovány do testovaného roztoku ve vodě definovaných vlastností
  - po uplynutí doby působení roztok zneutralizován a stanoveny přeživší MO (desítkové ředění, membránová filtrace)
  - vhodné pro definované porovnání účinnosti sanitačních roztoků, např. pro obchodní styk

## Difuzní agarové metody

- posouzení antimikrobiálního účinku roztoků
- jednoduchá metoda s variabilním uspořádáním
  - roztoky dávkovány vpichem/do komůrek/na discích
  - různé složení a koncentrace roztoků, stanovení minimálních inhibičních koncentrací
  - prakticky libovolný kultivovatelný mikroorganismus (sbírkový kmen, izolát)
- certifikovaná metodika SVS/2015/129869-G
  - pro perzistentní plísně
  - antifungální účinek
  - hodnocení smáčivosti plísně za podmínek sanitace

## Difuzní agarové metody – příklad

- ▶ 10 izolátů kvasinek z mlékárenských vzorků  
(*D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *Rhodotorula*, *Candida*, *Pichia*, *Torulasporea*, *Kazachstania*,...)
- ▶ koncentrace: doporučená, 1/2, 2x
- ▶ dezinfekční roztoky
  1. alkylnpolyglykosidy (+ diaminy; + chlornan a hydroxidy)
  2. peroxidy (samostatně nebo + alkálie a aminoxidy)
  3. chlornany (nadužívání Sava a spol.)
- ▶ čisticí roztoky
  1. alkálie
  2. kyseliny (nejméně účinná kys. amidosírová)

## Účinnost odstraňování biofilmů

- ▶ biofilm nakultivovat, zapůsobit sanitačními roztoky a detekovat zbytky biofilmu
- ▶ na mikrotitračních destičkách - screening
  - ▶ barvení krystalovou violetí
  - ▶ detekce vizuálně, spektrofotometricky
  - ▶ možné interakce plastu s roztoky
  - ▶ bez mechanického působení (turbulentní proudění)
- ▶ dynamické modelové systémy
  - ▶ skleněné či nerezové destičky s upraveným povrchem
  - ▶ průtočná cela nebo baňka na třepačce
  - ▶ rozbor stěrů různých typů, barvení krystalovou violetí
- ▶ volba kultivačního média, podmínek kultivace biofilmu a režimu proplachů

## Účinnost odstraňování biofilmů – příklad

- ▀ biofilm 10 izolátů kvasinek (viz výše), kultivace v BHI, 25 °C/3 dny
- ▀ působení: kyseliny, alkálie 60 °C/10 min, dezinfekce 20 °C/20 min
- ▀ účinnost
  1. alkalické čisticí roztoky
  2. dezinfekce dle pH
  3. kyselé čisticí roztoky

## Vliv roztoků na tvorbu biofilmu

- ▀ silně biofilmující (*Y. lipolytica* 10S, *T. delbrueckii* KM1, *B. pumilus* R34, *S. maltophila* 1/1 GK CIP), slabě biofilmující (*D. hansenii* N6 a 21Z, *B. mojavensis* R24, *S. epidermidis* R25)
- ▀ BHI + sanitační roztoky od 0,01 do 1,5 %
- ▀ 3 dny při optimální teplotě
- ▀ některé dezinfekce – interakce
- ▀ kyseliny a alkálie (čisticí i dezinfekční)
- ▀ v nižších koncentracích stimulace tvorby biofilmu, ve vyšších inhibice – kritické koncentrace látkově specifické
  - ▀ nejúčinnější kys. fosforečná (ve všech koncentracích úplná inhibice kvasinek, cca od 0,5 % inhibice bakterií)
  - ▀ kys. peroctová (silně antimikrobiální) – pracovní koncentrace 0,1-1,0 %, inhibice tvorby biofilmů od 0,5->1,5 %

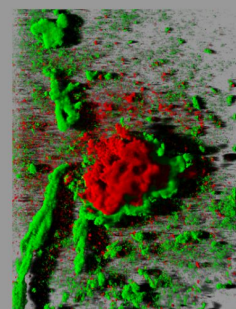
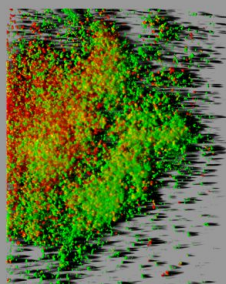
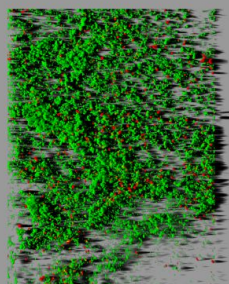
## Konfokální mikroskopie

(spolupráce Ing. Hana Míchová Turoňová, VŠCHT)

- ▶ kultivace v BHI s přidavkem sanitačních roztoků na destičkách  $\mu$ CLEAR® Chimney well
- ▶ barvení LIVE/DEAD® kit
  - ▶ Syto 9 barví všechny buňky + eDNA
  - ▶ propidium jodid projde jen do poškozených buněk
  - ▶ buňky: živé – zelené, poškozené – žluté, mrtvé – červené
- ▶ konfokální laserový scannovací mikroskop s rotujícím diskem, zvětšení 10x, z-krok 1  $\mu$ m
- ▶ analýza obrazu – Imaris 7.6.4. – objem biomasy nebo celková plocha struktury biofilmu

## Konfokální mikroskopie

- různá rychlost stárnutí biofilmu (*D. hansenii* N6 více živých b., *Y. lipolytica* 10S více poškozených b.)
- příklad velkého množství eDNA (*S. epidermidis* R25)



## Závěr

- ▶ jednotlivé roztoky při sanitaci se navzájem doplňují
  - ▶ alkálie – rozpouštějí organické nečistoty, včetně biofilmů
  - ▶ kyseliny – rozpouštějí minerální usazeniny jakožto podkladovou vrstvu biofilmů
  - ▶ dezinfekce – usmrcují přítomné buňky
- ▶ pozor
  - ▶ dezinfikovat jen vyčištěné a opláchnuté povrchy
  - ▶ dodržovat frekvenci výměny sanitačních roztoků
  - ▶ přiměřeně čistit sanitační zařízení
  - ▶ přiměřeně rotovat aktivní látky
  - ▶ dodržovat správné koncentrace roztoků
  - ▶ omezit kontaminaci provozu roztoky

Děkuji Vám za pozornost....

[nemeckova@milcom-as.cz](mailto:nemeckova@milcom-as.cz)

Tato práce vznikla s finanční podporou NAZV dle rozhodnutí MZE-RO1418 a jako součást projektu QK1710156 v programu ZEMĚ