

576.85.095.1

## STUDIUM VLIVU OCHRANNÉHO PROSTŘEDÍ NA PŘEŽÍVÁNÍ MIKROORGANISMŮ

Podplukovník MUDr. Bohumil TICHÁČEK, CSc.

Obecné otázky přežívání byly podrobně rozebrány v samostatném souborném přehledu (1). Při přežívání bakterií ve volné přírodě z hlediska biologických bojových prostředků přistupuje zde ještě další okolnost, že totiž odolnost a schopnost přežívání mikroorganismů v terénu může být záměrně zvýšena. Již v r. 1908 stanovil FICKER pořadí různých médií, počínaje mlékem, jakožto nejvýhodnějším pro přežívání; dále je to sérum, bujón, sliny, destilovaná voda a fyziologický roztok. Dnes bývají nejčastěji navrhovány: želatina, škrob, pepton, mucin (4, 6, 7, 12). Rosebury (12) doporučuje různé kombinace prostředí podle druhu použitého mikroba. Např. pro malleus glycerin a bujón, pro brucellu směs dextrinu s různými produkty štěpení bílkovin apod. V pokusech se Serratii se mu nejlépe osvědčila 2% želatina a 2% glycerin. Naylor a Smith (9) doporučují želatinu a thiomocovinu, Annear (cit. 4) pepton, celulózu, natriumalbuminát. Z méně obvyklých prostředí pak byly zkoušeny různé oleje, s nejlepším výsledkem např. mandlový olej, vhodný pro brucelly (8), nebo filtrační starých kultur, v nichž byl nalezen faktor, chránící vysušené buňky (3). Z krystaloidů glukóza a laktóza (5, 7), Record, Taylor (11) dávají přednost směsi cukr — pepton před samotným cukrem či samotným peptonem. Fry a Greaves (5) propagují směs bujón, sérum a 7,5% glukóza pro širokou škálu mikroorganismů. Benedict a spol. (1) prověřovali stabilizační účinek urey, dextranu, mucinu aj. v procesu zasušení *Serratia marcescens*. Dobře chránila urea a její deriváty.

Ve své práci jsme se zaměřili na jeden z úseků celé složité problematiky přežívání mikroorganismů. Pokusili jsme se zkonkretizovat obecné závěry o prodloužení přežívání mikroorganismů chráněných organickými látkami tak, aby byly získány časové hodnoty, umožňující přesněji posoudit závažnost mikrobiální kontaminace a ověřit si, do jaké míry pak bude použité ochranné vehikulum ovlivňovat odolnost mikroorganismů vůči některým dezinfekčním prostředkům. (Tato druhá dezinfekční část je zpracována samostatně.)

### Materiál a metodika

V předpokusech jsme se zaměřili především na upřesnění jednotlivých fází metodického postupu. Ve snaze zvolit nejvhodnější nosiče zárodků a základní suspenzní média provedli jsme řadu srovnávacích pokusů. Jako nosiče zárodků jsme prověřovali čtverečky filtračního papíru, hedvábná vlákna, drátěné jezdcy a skleněné kuličky. Při výběru nejvhodnějších nosičů jsme přihlíželi nejen k délce přežívání na jednotlivých nosičích, k rozdílu mezi sus-

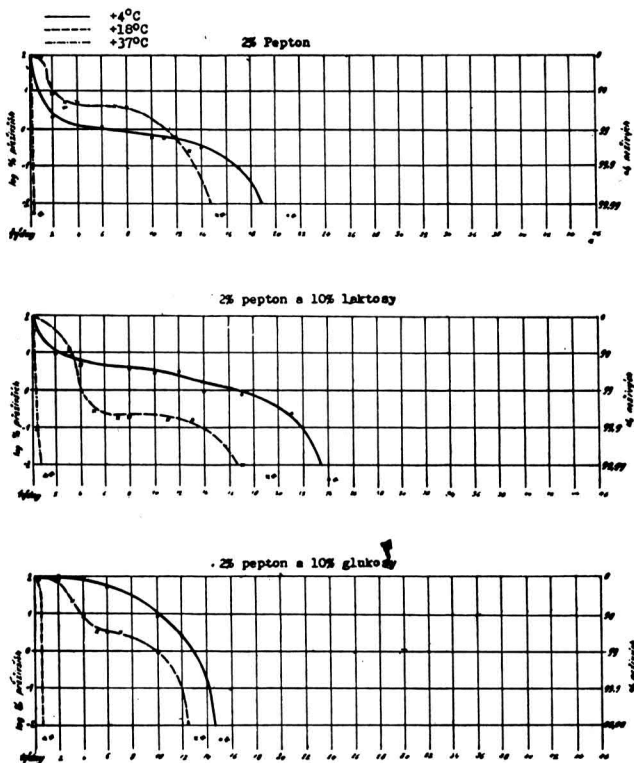
penzemi ve fyziologickém roztoku a destilované vodě, ale i k technickým možnostem při pracovní manipulaci, neboť jsme počítali s tím, že ve vlastních pokusech budeme muset pracovat s velkými kvanty nosičů, aby výsledky byly průkazné, technika jednoduchá a snadno standardizovatelná.

Kvantitativní zjišťování počtu zárodků na nosičích jsme prováděli 10minutovým vytřepáváním nosičů do fyziologického roztoku na Kahnově třepače, vyočkováním a obvyklým přepočtem. Opíraje se o předchozí zkušenosti (14), podle nichž vždy zbude po vytřepání určitý, někdy dosti značný počet zárodků na nosiči, provedli jsme posouzení jednotlivých nosičů i z tohoto hlediska. V předběžných pokusech zůstávalo po jednom 10minutovém třepání nejvíce zárodků na hedvábných vláknech (až na 95%) a na filtračních papírkách (80%). Vyřadili jsme je proto z dalších pokusů. Na drátěných jezdcích a skleněných kuličkách zůstávalo po vytřepání vždy mnohem menší procento zárodků (od 1,36% do 18,25%). Při volbě mezi kuličkami a drátěnými jezdcy jsme se rozhodli pro skleněné kuličky. Přežívání na nich bylo delší, výsledky jednoznačnější a po úpravě jednoduchých stojanů z děrovaného plechu jsme měli možnost sušit a uchovávat kontaminované kuličky libovolně dlouho v dostatečných počtech při velmi jednoduché manipulaci (15). Přitom jsme si vědomi, že délka přežívání, zjištěná v jednotlivých pokusech, nemůže být obecně aplikovatelná na ostatní mikroby. Ukázkou rozdílnosti rezistence *E. coli* různého původu, zaschlé v suspenzi v destilované vodě, podává tabulka 1. Rozdíl se pohybovaly od 0—9 dnů.

Jako základní pracovní kmen pro první část pokusů jsme zvolili *Salmonella enteritidis*, izolovanou z akutního onemocnění č. prot. 1095 E. S tímto pracovním kmenem jsme zopakovali základní metodické pokusy s vytřepáváním. Výsledky potvrdily naši dosavadní zkušenost, že s prodloužováním doby vytřepávání nad 10 minut se počty uvolněných živých zárodků začínají zmenšovat. Pro vlastní pokusy jsme tedy zvolili 10minutové vytřepávání. Výsledky zjišťování, kolik zůstane zárodků na kuličce po prvním až třetím 10minutovém vytřepávání, jsou tyto: pro náš pracovní kmen a námi užívané kuličky získáme kalkulovat, že prvním vytřepáním získáme  $776\,000 \pm 286\,000$  živých zárodků, druhým vytřepáním získáme  $6375 \pm 3403$  živých zárodků a třetím vytřepáním získáme 32 živých zárodků (statistická chyba přesahuje 100%). Z těchto výsledků vyplývá, že po prvním a základním vytřepání zbude na kuličce pouze 0,824% živých zárodků, což opět potvrzuje výhodnost skleněných kuliček jako nosičů. Všechny kuličky měly mechanicky zdrsňený povrch, aby ulpívání suspenzi na jejich povrchu bylo stejnoměrnější než u kuliček hladkých. Po standardizaci dalšího metodického postupu, hlavně ve způsobu sušení a uchovávání kuliček, ve způsobu kvantitativního vyočkování vytřepků, volbě kultivačního média a způsobu hodnocení výsledků obvyklým počítáním kolonií ve zředění, jež dalo počty od 50 do 150 kolonií na 1 plotně, jsme přistoupili k základním pokusům. Jako média jsme použili: destilovanou vodu, 2% želatinu, 2% želatinu s 10% glukózy, 2% želatinu s 10% laktózy, 2% pepton, 2% pepton s 10% glukózy a 2% pepton s 10% laktózy. Aby mohl být prakticky posuzován význam odchylek, jež se pochopitelně zvěčšovaly v konečných fázích přežívání, byl zvolen takový způsob grafického zpracování výsledků, při němž byly vynášeny logaritmy procenta přeživších v závislosti s časem. Kvantitativní rozdíly v průběhu přežívání je tedy možno s potřebným stupněm exaktnosti posuzovat jen k hodnotám rovným nule u log % přeživších. Při této hranici se pohybovaly odchylky od 5 do 77%.



Tab. 3

Přežívání *Salmonella enteritidis* v ochranných vehikulech při různých teplotách

ukázala želatina s glukózou, nejlepší želatina s laktózou, nedosáhly však takového účinku jako média obsahující pepton.

*Staphylococcus pyogenes*: ochranný účinek základů s peptonem se nijak neliší od základů s želatinou. V obou případech je však kvalitativně nejlepší přežívání, je-li přítomna laktóza (11–13 týdnů), na druhém místě je samotný koloid (10 týdnů), na posledním pak koloid s glukózou (8–9 týdnů).

*Streptococcus faecalis*: v prodloužení životaschopnosti se opět projevila jako nejlepší želatina s laktózou. V tomto případě bylo přežívání prodlouženo 4krát. Mezi samotnou želatinou a samotným peptonem nebyl zaznamenán žádný rozdíl.

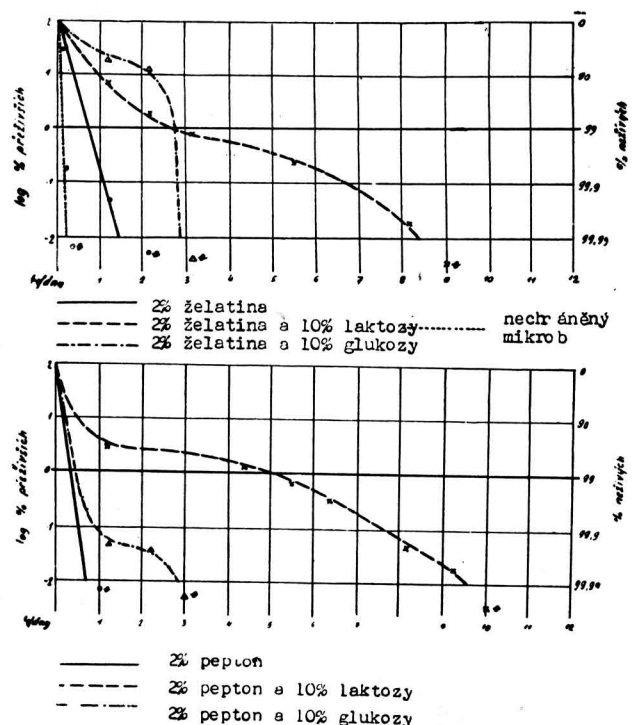
*Bacillus megatherium*: suspenze spor v destilované vodě zaschlá na testovacích kuličkách vykazala po 14 týdnech 95% pokles počtu životaschopných jedinců. Chráněné spory bez ohledu na ochranné médium přežívají však v zmenšeném počtu 30 týdnů.

Kromě určitých zvláštností, projevujících se odlišným průběhem křivek přežívání u jednotlivých druhů mikrobů, je možno nalézt jeden obecný rys. Téměř ve všech případech maximálního prodloužení přežívání byla přítomna laktóza, často laktóza ve spojení s želatinou, i když jinak nebyl zaznamenán nápadnější rozdíl v jejich ochranném účinku. Pokud se např. jevil u *E. coli* lepší pepton než želatina, bylo to spíše jen v konečných fázích přežívání.

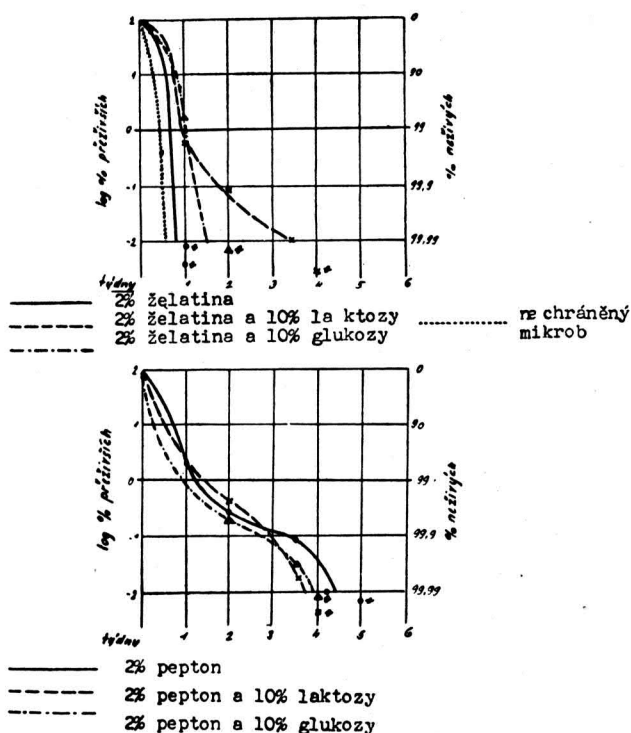
## Diskuse

Výhody volby skleněných kuliček jako test nosičů vyplynuly z předpokusů. Zbývá ještě otázka, do jaké míry mohou skleněné kuličky samy ovlivňovat přežívání mikrobů. V první řadě je to otázka inertnosti skla. Ve srovnání s ostatními materiály, jako kov, dřevo, biologický materiál apod. je možno jistě považovat sklo za poměrně inertní. Přitom je ovšem třeba vědět o rozdílech, vyplývajících ze složení různých druhů skel. Tak např. Taylor a Collins (3) zjistili, že tzv. české sklo stimuluje růst, zatímco pyrexové a křemičité sklo je inaktivní. Jiná je otázka uvolňování zárodků obklopených ochranným koloidem. Naše zkušenosti potvrdily, že rezidua na kuličkách jsou v přítomnosti želatiny či peptonu poněkud větší než u zárodků nechráněných. Výsledky se však vyrovnaly při vytřepávání do fyziologického roztoku, zahřátého na 40 °C. Skutečnost, že při vytřepávání zůstávalo na kuličkách prakticky zanedbatelné procento mikrobů ve srovnání s ostatními materiály, vyplývá z toho, že mikroby zasychaly jen na povrchu, při vytřepávání nebylo třeba nic přidávat, aby se zvýšilo uvolňování mikrobů, takže ztráty i traumatizace byly minimální. Culloch (4) upozorňuje na traumatizační účinek třepání v prostředí s tuhými částicemi. Na životnost bakterií má vliv i vzdušnění a míchání, k němuž dochází při pracovní manipulaci (2). Významná je také teplota, při níž bylo prováděno zasychání. Největší úbytek mikrobů během zasychání byl zaznamenán při

Tab. 4

Přežívání *Serratia marcescens* v ochranných vehikulech při 18 °C

Tab. 5

Přežívání *Escherichia coli* v ochranných vehikulech při 18 °C

ukládání do termostatu, nejšetnější bylo zasychání při pokojové teplotě.

Jestliže bylo dosahováno prakticky u všech prověřovaných mikrobů nejdelšího přežívání při spojení koloidní složky s cukrem, v našem případě s laktózou, třeba obrátit pozornost k možnému mechanismu ochrany při koncepci koloid (bílkovina) a cukr. Record a Taylor (11) studovali tyto vztahy. Vycházejí z toho, že bakterie je obklopena tenkou plazmatickou membránou, jež je podepřena vnějším silnějším, permeabilnějším buněčným valem. Tento val je permeabilní pro monosacharidy, disacharidy či trisacharidy, ne však pro proteiny a částečně hydrolyzované proteiny, jež jsou složkou bujónu, peptonu apod. Bílkovinný val tvoří pak jakousi osmotickou protiváhu cukrů, jež proniknou pod vnější permeabilní membránu a tím se zmenšuje riziko ruptury. Powel (10) toto studoval v mikrokomůrce na *E. coli*, zasušené v různých roztocích cukrů. Zjišťoval vysoké procento sférických forem, kdy cukr vnikl mezi buněčný val a plazmatickou membránu.

Všechny tyto závěry mohou vysvětlit, proč při našich pokusech nejdéle přežívaly mikroby v prostředí obsahujícím kombinaci bílkoviny a cukru. Skutečnost, že laktóza byla pro přežívání mikrobů příznivější než glukóza, by mohla např. souviset s různou velikostí molekul. Je též známo, že silné roztoky cukru mohou vykazovat bakteriostatický či baktericidní účinek, který je vyšší u cukrů s menší molekulovou vahou (4). Kromě toho však bude jistě záležet i na metabolických vztazích mezi jednotlivými cukry a

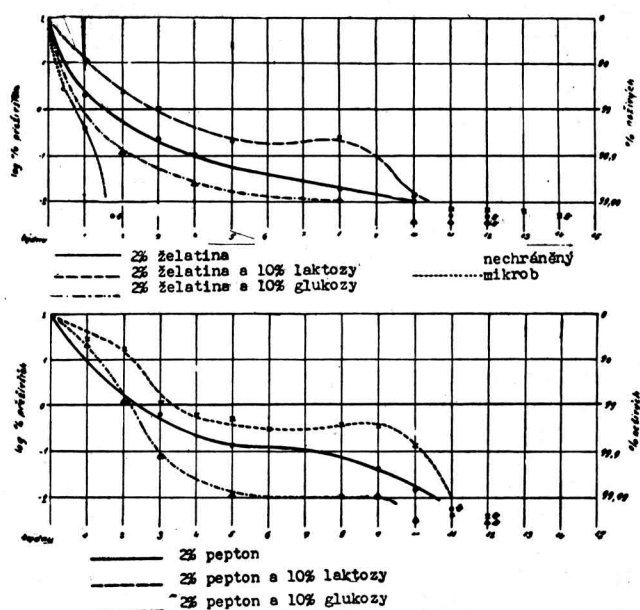
druhy mikrobů. Proto je asi stupeň ochrany u jednotlivých bakterií různý. Pro vysvětlení rozdílů mezi prodloužením přežívání a teplotou by však bylo třeba provést ještě hlubší studium metabolických procesů. Jestliže přežívají mikroby déle při nízkých teplotách, kdy dochází k útlumu metabolismu a jestliže se toto přežívání nedaří prodloužit ochrannými vehikuly v takovém stupni jako při teplotách vyšších, potvrzuje to jen rozhodující úlohu metabolických procesů přežívání.

## Závěry

Z výsledků naší práce vyplývají některá upřesnění obecných zkušeností o vlivu ochranného vehikula na přežívání bakterií:

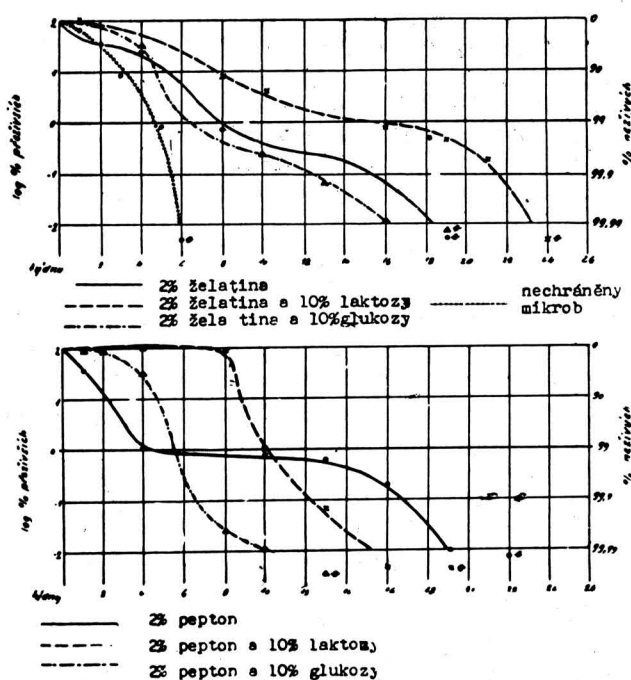
1. Vhodně zvoleným ochranným prostředím je možno mnohonásobně prodloužit doby přežívání mikrobů ve vnějším prostředí. Ochranný vliv se přitom projevuje nápadněji u vyšších teplot než při 4 °C, i když absolutní délky přežívání jsou při 4° větší.
2. Nebyl zaznamenán podstatný rozdíl v ochranném účinku peptonu a želatiny, avšak k nejdelšímu přežívání docházelo, byl-li některý z výše uvedených koloidů obohacen uhlovodany. 2% želatína nebo 2% pepton, obsahující 10 % laktózy, dávaly nejdelší křivky přežívání u sledovaných mikrobů.
3. U jednotlivých mikrobů byly však zaznamenány rozdíly v ochranném účinku médií na prodloužení přežívání za jinak stejných podmínek. Nechráněná *Serratia marcescens* hynula 3. den, chráněná 10. týden. Nechráněná *Escherichia coli* hynula 5. den, chráněná za

Tab. 6

Přežívání *Staphylococcus pyogenes* v ochranných vehikulech při 18 °C

Tab. 7

Přežívání *Streptococcus faecalis* v ochranných vehikulech při 18 °C



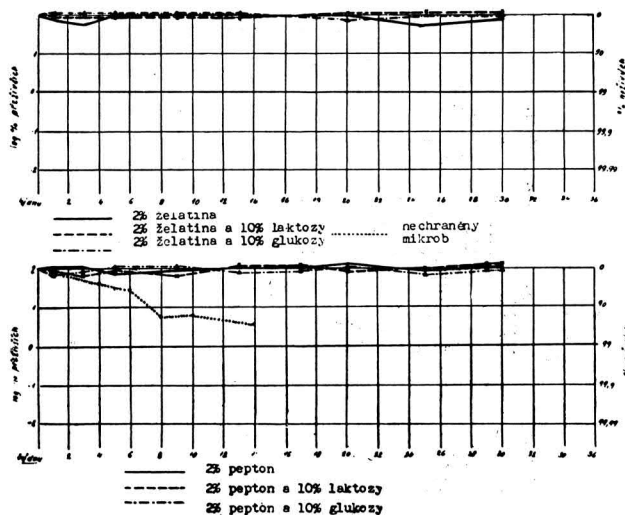
4 týdny. Nechráněný *Staphylococcus pyogenes* hynul 12. den, chráněný 13. týden. Nechráněný *Streptococcus faecalis* hynul 6. týden, chráněný 24. týden. Nechráněné spory *Bacillus megatherium* přežívaly po 14. týdnech v 5 % původního počtu, u chráněných spor trvá přežívání v původním nezměněném počtu 30. týden.

### Souhrn

Autor zjišťoval v dlouhodobých pokusech přežívání zasušených mikroorganismů ve vztahu k různým ochranným médiím a teplotě.

Tab. 8

Přežívání *Bacillus megatherium* v ochranných vehikulech při 18 °C



### Резюме

Автор в долгосрочных опытах изучал выживаемость засушенных микроорганизмов с учетом различных защитных сред и температуры.

### Summary

The author investigated in longterm examinations the surviving of dried microorganisms in relation to different protective mediums and temperature.

### Literatura

1. Benedikt a s.: Appl. Microbiol., 9, 256—262, 1961.
2. Bělohávek, Petera: seminář Úsol, 24. 2. 1961.
3. Bergmann a s.: J. Bact., 74, 1, 101, 1957.
4. Culloch: Disinfection and sterilization, London 1945.
5. Fry, Greaves: J. Hyg., 49, 2/3, 220, 1951.
6. Headlee: J. Inf. Dis., 48, 468, 1931.
7. Heller: J. Bact., 41, 109, 1941.
8. Lang, Dean: J. Inf. Dis., 55, 37, 1934.
9. Naylor, Smith: J. Bact., 52, 5, 565, 1946.
10. Powel: J. Roy. Micro. Soc., 75, 235, 1956.
11. Record, Taylor, ref. v NATURE, 26, 1960, 944.
12. Rosebury: Experimental air borne infection, 1947.
13. Taylor, Collins: The J. of Gen. Micro, 3, 1, 32—42, 1949.
14. Ticháček: Čs. EMI, 2, 137—142, 1961.
15. Ticháček: VZL, 5, 222—227, 1962.
16. Ticháček: Informační zpravodaj OIS, 1964.