

Paulina OLESIAK*, Longina STĘPNIAK**

Politechnika Częstochowska, Instytut Inżynierii Środowiska
ul. Brzeźnicka 60a, 42-200 Częstochowa
e-mail: * paulina_olesiak@interia.eu
** stepniak@is.pcz.czyst.pl

Skuteczność wybranych związków dezynfekcyjnych wobec przetrwalników *Bacillus*

Badano wpływ trzech często stosowanych w antyseptyce i dezynfekcji związków: kwasu nadoctowego, nadtlenu wodoru w stężeniu 5 i 30% oraz aldehydu glutarowego na przetrwalniki bakterii. Kwas nadoctowy stanowił główny składnik preparatu komercyjnego pod nazwą Steridial P. Natomiast aldehyd glutarowy stosowano w postaci preparatu handlowego o nazwie Lysoformin 3000. Skuteczność dezynfektantów badano wobec przetrwalników bakterii z rodzaju *Bacillus*: *B.subtilis*, *B.mycoides* oraz *B.cereus*. Endospory, czyli przetrwalniki, są formami bakterii, które pozwalają im przeżyć skrajnie niekorzystne dla nich warunki, takie jak: suszę, wysoką temperaturę czy działanie środków dezynfekcyjnych. Zawdzięczają to odmiennej od komórek wegetatywnych budowie. Wykazano, że testowane związki są bardzo silnymi biocydami. Działanie sporobójcze wobec badanych szczepów obserwowano po trzydziestominutowej ekspozycji na każdy z testowanych związków.

Słowa kluczowe: dezynfekcja, endospory, *B.subtilis*, *B.mycoides*, *B.cereus*

Wstęp

Dezynfekcja jest procesem fizycznym lub chemicznym, mającym na celu zabicie lub zahamowanie wzrostu form wegetatywnych drobnoustrojów znajdujących się poza organizmem człowieka. Natomiast pod pojęciem sterylizacji rozumie się usuwanie ze środowiska wszystkich form drobnoustrojów, w tym także przetrwalników [1]. Dezynfekcja jest powszechnie wykorzystywana w uzdatnianiu wody, w utrzymaniu sterylności w szpitalach, przemyśle farmaceutycznym i spożywczym [2-4]. W tym celu można stosować wiele substancji, różniących się jednak skutecznością oraz selektywnością działania. Dla skuteczności procesu dezynfekcji ważny jest więc wybór odpowiedniego dezynfektanta. Gotowe środki dezynfekcyjne są często mieszaniną różnych substancji. Uważa się także, że w celu skutecznego prowadzenia procesu dekontaminacji należy używać preparatów zawierających kilka substancji aktywnych. Skuteczność dezynfekcji zależy przede wszystkim od stężenia roztworu używanego do procesu, czasu jego działania oraz rodzaju mikroorganizmów, wobec których ma zastosowanie. Na efektywność działania dezynfektantów wpływają także czynniki zewnętrzne, takie jak: temperatura,

pH, wilgotność czy obecność substancji organicznych. Ważne jest również, by przestrzegano zasad podanych przez producenta, dotyczących zarówno sporządzania, jak i przechowywania środków dezynfekcyjnych [2, 4-7].

Dobry dezynfektant powinien charakteryzować się dwoma podstawowymi cechami: skutecznością wobec mikroorganizmów oraz odpornością na niekorzystne warunki środowiska. Do tych pierwszych można zaliczyć wysoką aktywność wobec wszystkich drobnoustrojów oraz niepowodowanie oporności nawet przy długim stosowaniu. Do drugich natomiast należą: stabilność w wodzie (nawet twardej) oraz w obecności substancji organicznych, długa trwałość, dobra rozpuszczalność w wodzie, niepowodowanie przebarwień ani korozji na stosowanych powierzchniach. Dodatkowo substancje te powinny być bezwonne i nie mogą powodować reakcji alergicznych skóry i błon śluzowych. Ze względu na ochronę środowiska powinny charakteryzować się szybką i łatwą biodegradowalnością oraz brakiem toksyczności wobec organizmów żywych. Z ekonomicznego punktu widzenia istotna jest ich relatywnie niska cena [2, 4-7]. Do dezynfektantów mających szerokie spektrum działania należą głównie związki zawierające aktywny tlen w swojej budowie oraz aldehydy. Do pierwszej grupy należy kwas nadoctowy, który w ostatnich latach stosowany jest powszechnie w różnych gałęziach przemysłu czy szpitalach. Inne związki wykorzystywane na szeroką skalę to m.in. alkohole, czwartorzędowe związki amoniowe, detergenty, chlorowce czy związki kompleksujące [8].

Poniżej opisano dwie grupy związków dezynfekcyjnych, które testowano wobec spór *Bacillus*. Ich wybór nie był przypadkowy. Związki utleniające, jak nadtlenek wodoru czy kwas nadoctowy, są stosowane w przemysłowym oczyszczaniu wody pitnej. Natomiast aldehyd glutarowy, jako jedyny środek nieutleniający, jest uznawany za wysoce skuteczny i o szerokim spektrum działania na formy vegetatywne oraz przetrwalne bakterii, wirusy oraz grzyby.

Pierwszą grupą testowanych dezynfektantów są związki nadtlenowe. Należą do nich m.in. nadtlenek wodoru, kwas nadoctowy czy nadsiarczan potasu. Ważną cechą tej grupy związków jest zdolność niszczenia form nie tylko vegetatywnych, ale przede wszystkim przetrwalnych. Dodatkowo działają one nie tylko na bakterie, ale także na wirusy, prątki gruźlicy i grzyby. Kolejną ich zaletą jest fakt, że mikroorganizmy nie nabywają na nie odporności. Najpowszechniej używanym związkiem jest kwas nadoctowy. Zasada jego działania polega na:

- utlenianiu grup -SH białek do mostków disiarczkowych,
- utlenianiu podwójnych wiązań występujących w błonie komórkowej [1, 4, 9].

Mechanizm niszczenia drobnoustroju polega na uwalnianiu aktywnego tlenu, który niszczy zarówno białka, jak i tłuszcze czy kwasy nukleinowe [9]. Kwas nadoctowy składa się z kwasu octowego, tlenu, wody i bez obaw może być stosowany w przemyśle spożywczym, nawet w warunkach, gdy płukanie po dezynfekcji jest niemożliwe. Zaletą jest także jego całkowita biodegradowalność oraz dobra aktywność w niskich temperaturach. Wadą jest powodowanie korozji na metalowych powierzchniach części poddawanych dezynfekcji.

Drugą grupę związków reprezentuje aldehyd glutarowy. Ogólne działanie aldehydów polega na niszczeniu błon biologicznych poprzez denaturację białek oraz zaburzaniu metabolizmu. Dużą zaletą tych związków jest wysoka skuteczność działania mimo obecności zanieczyszczeń organicznych, natomiast wadą jest działanie drażniące na układ oddechowy. Przy używaniu tych związków wymagane są środki ostrożności [8, 9]. Aldehyd glutarowy, jako najczęściej używany z tej grupy, stosowany jest powszechnie do sterylizacji tworzyw, które nie mogą być wyjaławiane przez podwyższoną temperaturę. Jest toksyczny i z tego względu nie może być stosowany w przemyśle spożywczym. Najsilniej działa przy $\text{pH} = 7,5\div 8,5$. Jego działanie poza tym przedziałem pH może być nawet do 36 razy słabsze. W obecności zanieczyszczeń organicznych działa nieznacznie słabiej. Jest przechowywany w temperaturze pokojowej. Bakterie gram-dodatnie, gram-ujemne, grzyby i wirusy są wrażliwe na aldehyd glutarowy, natomiast spory bakterii i prątki gruźlicy są średnio wrażliwe. Przykład preparatu zawierającego ten aldehyd to Lysoformin 3000 [9].

Nie każdy z używanych środków jest skuteczny wobec wszystkich drobnoustrojów czy ich form, zasiedlających dany obszar (wodę czy różnego rodzaju powierzchnię) [9]. Istnieją mikroorganizmy lub ich formy, które są bardzo odporne na działanie czynników dezynfekcyjnych. Należą do nich przetrwalniki bakterii, zwane endosporami [5]. Budowa spory różni się znacznie od budowy komórki wegetatywnej. Najważniejszą częścią spór są osłony komórkowe, które stanowią aż 50% suchej masy całego przetrwalnika. To właśnie obecność tych tworów zapewnia endosporom taką „nienaruszalność”. Osłony są zbudowane przede wszystkim z białek zawierających duże ilości cysteiny. Endospory są formami bardzo odwodnionymi, woda stanowi tylko 15% całej komórki. W porównaniu z komórką wegetatywną przetrwalniki mają także o prawie połowę więcej białek i 75% węglowodanów mniej. W ogóle nie posiadają β -hydroksymaślanu, stanowiącego do 1/3 s.m. komórek wegetatywnych [5, 10]. W budowie endospory występują duże ilości kwasu dipikolinowego (DPA-dipicolinic acid), związanego głównie z jonami wapnia, ale także innymi pierwiastkami dwuwartościowymi. Kompleksy Ca^{2+} DPA mogą stanowić do 10% s.m. całej spory. DPA jest komponentem endospory, który najliczniej występuje i jest najczęściej izolowany z płaszczka. Związek ten nie występuje w komórkach wegetatywnych, a odpowiada za oporność przetrwalników na promieniowanie UV od 5 do 50 razy większą (w zależności od szczepu) niż w przypadku form wegetatywnych. Za mniejszą wrażliwość na promieniowanie ultrafioletowe odpowiadają także białka z rodziny SASP (small amid-soluble proteins). Zmieniają one strukturę DNA, usztywniając i prostując ją poprzez nasycenie tymi właśnie biomolekułami na zewnętrznej stronie helisy. Białka te są obecne tylko w sporach, a podczas kiełkowania ulegają zniszczeniu [10].

Wyjątkową oporność spór w porównaniu z bakteriami posiadającymi otoczki, bez otoczek oraz gram-ujemnymi pałeczkami wobec dezintegracji ultradźwiękami udowodnili Bień i wsp. [11]. Skuteczność tej metody dezynfekcji była od kilku do kilkunastu razy mniejsza wobec spór niż pozostałych form bakterii. Potwierdzono, że obniżona skuteczność dezintegracji ultradźwiękami jest uzależniona od szcze-

gólnej budowy przetrwalnika. Skuteczność ultradźwięków badano także wobec bakterii przyjętych jako wskaźniki w kontroli sanitarnej procesu dezynfekcji, tj.: bakterii z grupy *coli*, bakterii mezofilnych i psychrofilnych. Wykazano, że stosowanie pola ultradźwiękowego intensyfikuje działanie środków chemicznych - ozonu i ditlenku chloru, co pozwala na skrócenie czasu ekspozycji w polu ultradźwiękowym oraz zmniejszenie dawek dezynfekcyjnych reagentów chemicznych [12].

Bakteriami najczęściej występującymi w środowisku zarówno wodnym, jak i glebowym, wytwarzającym endospory, są: *B.subtilis*, *B.mycooides* oraz *B.cereus* [13]. Bakterie należące do rodzaju *Bacillus* to aż 215 różnych gatunków zróżnicowanych w swojej budowie zarówno pod względem morfologicznym, jak i biochemicznym. Jest to wynikiem różnych udziałów zasad G+C w genomie poszczególnych szczepów [5]. Do podstawowych cech, które pozwalają zaliczyć dane bakterie do tej grupy, należą: gram-dodatnia budowa, wzrost w warunkach tlenowych, obecność rzęsek na powierzchni komórki [14]. Bakterie te nie mają dużych wymagań wzrostowych, dzięki czemu można je spotkać niemalże wszędzie. Najczęściej izoluje się je z wody, gleby, ale są spotykane też w takich miejscach, jak: piasek Sahary, głębiny morskie czy gorące źródła gejzerów [13]. Cechą niewątpliwie wspólną dla wszystkich gatunków należących do rodzaju *Bacillus* jest zdolność tworzenia przez nie spór w warunkach dla nich niedogodnych, zagrażających ich wzrostowi czy przeżyciu. Endospory są zatem dla nich „kapsułami ratunkowymi,” w przypadku gdy w środowisku brak jest pokarmu czy pojawiają się czynniki toksyczne - np. przy wydzielaniu antybiotyków przez mikroorganizmy sąsiednie. Zdolność formowania tych kapsuł jest uwarunkowana genetycznie. Aby sporulacja mogła być zainicjowana, muszą być uruchomione geny odpowiedzialne za nią, a inne (odpowiedzialne za czynności życiowe form wegetatywnych) zostają wyciszone. Sam proces jest regulowany przez 6 białek regulatorowych, zwanych czynnikami σ [5, 13]. Pomimo tak dużego znaczenia sterylizacji, dezynfekcji i antyseptyki wobec przetrwalników istnieje niewiele prac dotyczących działania dezynfektantów na formy przetrwalne. Dlatego celem pracy była ocena działania powszechnie stosowanych dezynfektantów na formy przetrwalne trzech gatunków laseczek z rodzaju *Bacillus* najczęściej izolowanych ze środowiska.

1. Metodyka badań

Do badań nad skutecznością dezynfekcji wobec przetrwalników bakterii użyto następujących szczepów:

- *Bacillus subtilis* ATCC 6633,
- *Bacillus mycooides* ATCC 8896,
- *Bacillus cereus* ATCC 128276.

Badania przeprowadzono na następujących podłożach:

- TSA (o składzie: trypton 15,0 g; pepton sojowy 5,0 g; NaCl 5,0 g; agar 15,0 g; woda 1000 ml) [15];

- TSB (o składzie: trypton 17,0 g; pepton sojowy 3,0 g; NaCl 5,0 g; K₂HPO₄ 4,0 g; woda 1000 ml) [15];
- TSB z neutralizatorem (o składzie: trypton 17,0 g; pepton sojowy 3,0 g; NaCl 5,0 g; K₂HPO₄ 4,0 g; tween 80 10,0 g; lecytyna 1,0 g; histydyna L 0,5 g; Na₂S₂O₃ 2,5 g; woda 1000 ml) [15-17].

Jako środki dezynfekcyjne wybrano:

- kwas nadoctowy - pod handlową nazwą Steridial P (o składzie: kwas nadoctowy 1%; kwas octowy; nadtlenek wodoru);
- nadtlenek wodoru w stężeniu 30 i 5%;
- aldehyd glutarowy - jako preparat handlowy o nazwie Lysoformin 3000 (o składzie: aldehyd glutarowy 9,5 g; glioksal 7,5 g; chlorek didecyldimetyloamonowy 9,6 g).

Badania rozpoczęto od spłukania skosu agarowego z odpowiednim szczepem bakterii 10 ml jałowej soli fizjologicznej. Następnie inokulum przelano w płomieniu palnika do pustej sterylnej probówki i poddano ją mieszaniu z zastosowaniem urządzenia wortex w celu rozbicia ewentualnych skupień komórek. Kolejnym etapem była inaktywacja form wegetatywnych, która polegała na umieszczeniu inokulum w łaźni wodnej w temperaturze 72°C na okres 10 minut. Tak uzyskane endospory bakterii przenoszono do 9 ml każdego testowanego dezynfektanta w ilości 1 ml na okres 30, 60, 120 i 180 minut. Po danym czasie działania dezynfektanta przenoszono inokulum (1 ml) do podłoża z neutralizatorem (9 ml) na okres 30 minut. Ostatni etap polegał na zrobieniu serii rozcieńczeń dziesiętnych w płynnym podłożu TSB oraz posiewie po 0,1 ml metodą płytek tartych na stałe podłoże TSA. Po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 28°C liczono wyrosłe kolonie. Analogicznie postępowano w przypadku każdego szczepu oraz każdego dezynfektanta. Wszystkie badania w stosunku do każdego dezynfektanta, jak również szczepu wykonano trzykrotnie.

2. Wyniki i dyskusja

Bakterie z rodzaju *Bacillus* są specyficznymi mikroorganizmami ze względu na możliwość wytwarzania przetrwalników w niekorzystnych dla siebie warunkach. Formy przetrwalne, ze względu na odmienną budowę niż formy wegetatywne - wysokie odwodnienie komórki, uszczelnienie ściany komórkowej, wytworzenie dużej ilości ciepłoopornych białek, sprawiają ogromne problemy z ich dekontaminacją [5]. Spośród wielu substancji bakteriobójczych nie wszystkie są aktywne, a nawet jeśli są, to nie zawsze w odpowiednim stopniu działają biobójczo na przetrwalniki, tak jak na formy wegetatywne [6]. Stosowanie na skażone środowisko nieodpowiednich środków czy stężeń sprzyja powstawaniu form opornych na ich działanie [7, 14, 18].

W przeprowadzonych badaniach nad wpływem związków dezynfekcyjnych na formy przetrwalne bakterii z rodzaju *Bacillus* nie stwierdzono zróżnicowania w re-

akcji zarówno między poszczególnymi szczepami, jak i w reakcji poszczególnych związków.

Steridial P, którego głównym składnikiem jest 1% kwas nadoctowy, działał sporobójczo w stosunku do wszystkich trzech testowanych szczepów już po 30-minutowym kontakcie (tab. 1). Jak podaje również Krzywicka i wsp. [9], kwas nadoctowy jest skutecznym środkiem wobec wszystkich form, nie tylko bakterii, ale także grzybów, wirusów oraz prątków gruźlicy, a dodatkowo jest toksyczny już w niskich stężeniach i przy krótkim czasie kontaktu [9]. W badaniach Mizak nad wpływem kwasu nadoctowego na spory *B.anthraxis* wykazano, że formy te giną po 120 minutach pod wpływem 5% kwasu nadoctowego. Natomiast zastosowanie 3% kwasu nadoctowego wydłużyło czas całkowitej redukcji do 180 minut [17]. Taki sam wynik otrzymali Jonem i Turnbull [cyt. za 17]. Efekt bójczy 3 i 5% kwasu nadoctowego na spory *B.anthraxis* występuje po odpowiednio 180 i 120 minutach. Natomiast odmienne wyniki w badaniach skuteczności 5% kwasu nadoctowego na *B.anthraxis* otrzymali Hussaini i Ruby [cyt. za 17]. Całkowity efekt sporobójczy wykazali już po 20 minutach. Taki rezultat uzyskali także Baldry oraz Manche [cyt. za 17]. Pastuszewska i wsp., badając kwas nadoctowy jako główny składnik Agrosterilu 110 SL, wykazali, że w ciągu 30 sekund, w obecności albuminy wołowej, przy stężeniach 0,5 oraz 0,25% kwas nadoctowy powoduje redukcję liczby kolonii bakterii *C.michiganensis* o 5 rzędów wielkości. Zmniejszenie stężenia do 0,1 i 0,05% w tych samych warunkach spowodowało odpowiednio: redukcję mniejszą niż 10^5 -krotnie oraz brak redukcji [19]. Według Staniszewskiej i wsp., aktywność kwasu nadoctowego jest wprost proporcjonalna do temperatury. W badaniach prowadzonych metodą zawieszinową kwas nadoctowy działa biobójczo w czasie 15÷30 minut już w stężeniu 0,1%. W badaniach preparatu składającego się z kwasu nadoctowego i nadtlenu wodoru metodą nośnikową czas redukcji spór *B.subtilis* i *B.cereus* wydłużył się do 11 godzin. Spowodowane jest to szybką dezaktywacją substancji biobójczych na bazie aktywnego tlenu oraz obecnością w środowisku zanieczyszczeń organicznych [14].

Tabela 1

Wpływ kwasu nadoctowego na przetrwalniki poszczególnych gatunków bakterii z rodzaju *Bacillus*

Kwas nadoctowy	Kontrola log jtk	Czas ekspozycji, min			
		30	60	120	180
<i>B.subtilis</i>	2,0	0	0	0	0
<i>B.mycoides</i>	2,2	0	0	0	0
<i>B.cereus</i>	2,1	0	0	0	0

Podobnie silnym dezynfektantem okazał się 30% nadtlenek wodoru. W przeprowadzonych badaniach spory *B.subtilis*, *B.mycoides* i *B.cereus* zostały całkowicie zabite już po 30-minutowej ekspozycji (tab. 2). Odmienne wyniki w badaniach

nad sporami *B.anthraxis* uzyskała Mizak, która obserwowwała redukcję liczby spór o jeden rząd wielkości po 5-minutowej ekspozycji na 30% nadtlenek wodoru, a po 60 minutach kolejną redukcję także o jeden rząd wielkości. Dopiero 180-minutowa ekspozycja pozwoliła całkowicie zabić przetrwalniki *B.anthraxis* [17]. Obniżenie stężenia nadtlenku wodoru do 26% powodowało redukcję liczby spór *B.subtilis* w ciągu 11 minut o 4 log. Przy tym samym stężeniu, ale ze zwiększoną temperaturą do 76°C, zabicie wszystkich przetrwalników obserwowano już po 30 sekundach [14]. W przeprowadzonych badaniach 5% nadtlenkiem wodoru uzyskano taką samą wrażliwość wszystkich trzech testowanych szczepów (tab. 3). Liczba spór *B.subtilis*, *B.mycoides* i *B.cereus* została zredukowana całkowicie już po 30-minutowej ekspozycji. Zmniejszenie stężenia nadtlenku wodoru z 30 na 5% nie spowodowało obniżenia jego skuteczności wobec badanych szczepów. W badaniach Mizak z zastosowaniem 4% nadtlenku wodoru nie wykazano żadnej wrażliwości *B.anthraxis* na badany związek. Nawet 180-minutowa ekspozycja nie pozwoliła na zabicie spór, jedynie umożliwiła ich redukcję o 1 log (z 8 log) [17].

Tabela 2

Wpływ nadtlenku wodoru (30%) na przetrwalniki poszczególnych gatunków bakterii z rodzaju *Bacillus*

Nadtlenek wodoru (30%)	Czas ekspozycji, min				
	Kontrola log jtk	30	60	120	180
<i>B.subtilis</i>	1,8	0	0	0	0
<i>B.mycoides</i>	2,2	0	0	0	0
<i>B.cereus</i>	2,4	0	0	0	0

Tabela 3

Wpływ nadtlenku wodoru (5%) na przetrwalniki poszczególnych gatunków bakterii z rodzaju *Bacillus*

Nadtlenek wodoru (5%)	Czas ekspozycji, min				
	Kontrola log jtk	30	60	120	180
<i>B.subtilis</i>	2,3	0	0	0	0
<i>B.mycoides</i>	2,3	0	0	0	0
<i>B.cereus</i>	2,0	0	0	0	0

Rozbieżności w cytowanych i otrzymanych wynikach badań mogą być spowodowane: odmienną metodą badawczą, odmiennym składem pożywek, obecnością obciążników podczas ekspozycji na dezynfektant, innym stężeniem oraz rodzajem testowanych substancji (w preparatach handlowych jest zwykle mieszanina związków, która wspomaga działanie biobójcze), pH, temperaturą oraz szczepem testowanych bakterii [14]. W porównywanych wynikach badań wykazano, że *B.cereus*

jest mniej wrażliwy na kwas nadoctowy niż *B.subtilis* [20]. Natomiast wobec aldehydu glutarowego w takich samych warunkach *B.cereus* jest mniej oporny niż *B.subtilis* [14]. Dodatkowo spory *B.anthraxis* są wyjątkowo odporne na działanie wszystkich czynników zewnętrznych [17, 21, 22].

W badaniach własnych nad sporamii *Bacillus* wykazano, że Lysoformin 3000 z aldehydem glutarowym jako główną substancją aktywną całkowicie redukuje liczbę przetrwalników laseczek wszystkich trzech szczepów już po 30-minutowej ekspozycji (tab. 4). Działanie Lysoforminu 3000 było tak samo skuteczne dla *B.subtilis*, *B.mycoides* i *B.cereus*. W pracy Pastuszevskiej i wsp. Lysoformin 3000 przy zakresie stężeń 0,05÷0,5% redukował liczbę kolonii *C.michiganensis* 100 000-krotnie. Inny związek - Agrigerm 2000 - także z aldehydem glutarowym jako substancją czynną redukował liczbę bakterii zdolnych do życia w takim samym stopniu i przy takim samym zakresie stężeń badanego preparatu [19].

Tabela 4

Wpływ aldehydu glutarowego na przetrwalniki poszczególnych gatunków bakterii z rodzaju *Bacillus*

Aldehyd glutarowy	Czas ekspozycji, min				
	Kontrola log jtk	30	60	120	180
<i>B.subtilis</i>	2,0	0	0	0	0
<i>B.mycoides</i>	2,6	0	0	0	0
<i>B.cereus</i>	2,3	0	0	0	0

Aldehyd glutarowy w stężeniu 2% redukuje liczbę spór *B.cereus* w czasie 15÷30 minut o 4 rzędy wielkości. Wobec *B.subtilis* jest mniej skuteczny i przy takim samym stężeniu redukuje liczbę przetrwalników podczas 30-minutowej ekspozycji już tylko o 1 log. Wzrost temperatury z pokojowej do 40°C powoduje zwiększenie redukcji endospór do 6 rzędów wielkości w czasie 30 minut. Natomiast 1,5% aldehyd glutarowy w obecności zanieczyszczeń organicznych w środowisku powoduje zabijanie spór *B.subtilis* dopiero po 8 godzinach. Wobec *B.cereus* nawet 10-godzinna ekspozycja jest nieskuteczna [14].

Wszystkie testowane związki, tj.: kwas nadoctowy, nadtlenek wodoru oraz aldehyd glutarowy, już po 30-minutowym działaniu odpowiedniego dezynfektanta zabijały wszystkie przetrwalniki. W przypadku nadtlenu wodoru nawet zmniejszenie jego stężenia z 30 na 5% nie pogorszyło jego skuteczności.

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że powszechnie używane środki dezynfekcyjne są skuteczne wobec testowanych szczepów bakterii przetrwalnikujących. Związki nadtlenowe - w tym nadtlenek wodoru w stężeniu 5 i 30%

oraz kwas nadoctowy - są wysoce aktywne wobec endospór *Bacillus*. Podobne wyniki wobec nadtlenu wodoru i kwasu nadoctowego uzyskali Staniszewska i wsp. oraz Pastuszewska i wsp. Odmiennie wyniki uzyskała Mizak wobec *B.anthraxis*, testując nadtlenek wodoru w stężeniach 30, 26 oraz 4%, a także kwas nadoctowy. Rozbieżności w otrzymanych wynikach mogą być spowodowane szczególną opornością spór *B.anthraxis* na działanie środków chemicznych. W badaniach własnych autorów aldehyd glutarowy wykazywał podobne działanie do środków zawierających aktywny tlen. Potwierdzają to również wyniki otrzymane przez Pastuszkowską i wsp. Wykazano, że 30-minutowy czas kontaktu w celu prowadzenia skutecznej dekontaminacji jest wystarczający. Ponadto nie stwierdzono zróżnicowanego działania testowanych środków na poszczególne szczepy tego samego gatunku.

Wyniki przedstawionych badań uzasadniają kontrolę skuteczności wytypowanych związków dezynfekcyjnych przy zastosowaniu krótszych czasów ekspozycji.

Literatura

- [1] Adamiec M., Ciebada-Adamiec A., Chemiczne środki dezynfekcyjne, *Lekarz Rodzinny* 2007, 12, 6, 652-655.
- [2] Kowal A.L., Świdorska-Bróż M., Oczyszczanie wody. Podstawy teoretyczne i technologiczne, procesy i urządzenia, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2009.
- [3] Nawrocki J., Uzdatnianie wody. Procesy fizyczne, chemiczne i biologiczne, cz. I i II, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2010.
- [4] Kutrowska E., Kwas nadoctowy w nowoczesnych procesach dekontaminacji, *Zakażenia* 2005, 5, 4, 15-19.
- [5] Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., Mikrobiologia techniczna, tom 1, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2007.
- [6] Parnowska W., Środki odkażające - rola w profilaktyce i zwalczaniu zakażeń szpitalnych, *Farmacja Polska* 1998, 54, 15, 675-684.
- [7] Parnowska W., Znaczenie stosowania i badań skuteczności środków dezynfekcyjnych w profilaktyce zakażeń szpitalnych, *Postępy Nauk Medycznych* 2000, 3, 54-60.
- [8] Dzierżanowska D., Jeliaszewicz J., Zakażenia szpitalne, Wydawnictwo Alfa-media press, Bielsko-Biała 1999.
- [9] Krzywicka H., Bielicka A., Janowska J., Jaszczuk E., Tadeusiak B., Zastosowanie chemicznych środków dezynfekcyjnych w szpitalach, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1986.
- [10] Żakowska Z., Stobińska H., Mikrobiologia i higiena w przemyśle spożywczym, Wydawnictwo Naukowe Politechniki Łódzkiej, Łódź 2000.
- [11] Bień J., Stępnik L., Palutkiewicz J., Wójcik-Szwedzińska M., Pole ultradźwiękowe jako czynnik wspomagający proces dezynfekcji wody, *Dezynfekcja wody*, Konferencja Naukowo-Techniczna, Warszawa 1998.
- [12] Bień J., Stępnik L., Palutkiewicz J., Skuteczność dezynfekcji wody w polu ultradźwiękowym, *Ochrona Środowiska* 1995, 4, 59, 55-58.
- [13] Szewczyk E.M., Diagnostyka bakteriologiczna, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa 2005.
- [14] Staniszewska M., Rohm-Rodowald E., Jakimiak B., Działanie sporobójcze środków dezynfekcyjnych, *Zakażenia* 2006, 6, 5, 12, 14-17.
- [15] PN-EN 14347:2005 Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne - Podstawowe działanie sporobójcze - Metoda badania i wymagania (faza 1, etap 1).

- [16] PN-EN 1040:2000 Chemiczne środki dezynfekcyjne i antyseptyczne. Podstawowe działanie bakteriobójcze. Metoda badania i wymagania (faza 1).
- [17] Mizak L., Sporobójcza aktywność nadtlenu wodoru i kwasu nadoctowego wobec przetrwalników *Bacillus anthracis*, *Medycyna Doświadczalna i Mikrobiologia* 2005, 57, 437-442.
- [18] Chapman J.S., Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants, *International Biodeterioration and Biodegradation* 1998, 41, 241-245.
- [19] Pastuszewska T., Gryń G., Brusi R., Bakteriobójcze działanie chemicznych środków dezynfekcyjnych przeciwko *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*, sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka, *Progress in Plant Protection* 2007, 2, 47.
- [20] Hilgren J., Swanson K.M., Diez-Gonzales F., Cords B., Susceptibilities of *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and avirulent *Bacillus anthracis* sporesto liquid biocides, *Journal of Food Protection* 2009, 2, 72, 360-364.
- [21] Matras J., Bartoszcze M., *Bacillus anthracis*, *Postępy Mikrobiologii* 2000, 41, 1, 3-19.
- [22] Zaremba M.L., Bobrowski J., *Mikrobiologia lekarska*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001.

Activity of Selected Compounds against Spores of *Bacillus*

The effect of three frequently used in antyseptic and disinfection of: peracetic acid, hydrogen peroxide at a concentration of 5 and 30%, and glutaraldehyde. Peracetic acid was the main ingredient Steridial P, in addition to acetic acid and hydrogen peroxide. Hydrogen peroxide in the form of 5% is much stronger than what we use hydrogen peroxide to antiseptic wounds in our homes. However, glutaraldehyde has performed under the trade name as Lysoformin 3000. Disinfecting measures are an especially important role in maintaining cleanliness in hospitals but also in our homes. Also are needed in the pharmaceutical and grocery industry. Thanks it did reduce the incidence of some diseases, and sometimes eliminate them. Disinfectants allow us to fight drug-resistant strains of bacteria, which occur in hospitals. The effectiveness of disinfectants affected by many factors. Their role in our lives is invaluable. Disinfectants were used against bacterial spores of the genus *Bacillus*: *B. subtilis*, *B. mycoides* and *B. cereus*. *Bacillus*-genus bacteria occur everywhere: in water, air and soil are transferred along with objects, and air movements on human hands. So it's easy to get infected. Endospores are forms of bacteria that allow them to survive extremely unfavorable to them, conditions such as drought, high temperatures or the action of disinfectants. Construction differs significantly from the construction of cell vegetative. The most important part of spore is the cover, which represent up to 50% of the dry matter (d.m.) of the spore. It is the presence of these structures provides endospore such "integrity". Guards are constructed primarily of proteins containing large amounts of cysteine. Endospores are forms very dehydrated, the water is only 15% of all cells. Compared with cell vegetative, spores have also about almost half proteins more and 75% carbohydrates less. They do not have beta-hydroxybutyrate, which is to 1/3 d.m. cells vegetative. In construction there are large quantities of endospore dipicolinic acid (DPA), associated mainly with calcium ions, but also other divalent elements. Complexes of Ca^{2+} - DPA may constitute up to 10% d.m. all spores. DPA is the most frequently isolated from the mantle. This compound is not present in vegetative cells and spores is responsible for resistance to UV radiation from 5 to 50 times greater (depending on the strain) than vegetative forms. The lower sensitivity to ultraviolet radiation also correspond to protein family SASP (small amide-soluble proteins). They change the structure of DNA - stiffen and straighten - through the saturation of these biomolecules is on the outer side of the helix. These proteins are present only in spores, and are destroyed during germination.

Spore cell wall is much thicker, otherwise refracts light and is composed of many layers, so that is poorly permeable. It was shown that the tested compounds are very potent biocides. Sporicidal action against all tested strains was observed after a thirty-minute exposure to each of the tested.

Keywords: disinfectants, endospores, *B. subtilis*, *B. mycoides*, *B. cereus*