

HANNA KRZYWICKA, BARBARA TADEUSIAK, JOANNA JANOWSKA

CZYNNIKI MODELUJĄCE WRAŻLIWOŚĆ SPOR BAKTERII NA
DZIAŁANIE PARY WODNEJ W NADCIŚNIENIU

FACTORS MODULATING THE SENSITIVITY OF BACTERIAL SPORES TO STEAM
UNDER PRESSURE

Zakład Zwalczania Skażeń Biologicznych, Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
p.o. Kierownik: dr H. Krzywicka

*Zbadano wpływ składu podłoża hodowlanego i czasu hodowli na sporulację testowych szczepów *B. subtilis* i *B. stearothermophilus*. Określono wpływ wymienionych czynników oraz liczby spor na ich wrażliwość na działanie pary wodnej w nadciśnieniu.*

WSTĘP

Procesy sterylizacji od lat są stosowane w medycynie oraz wielu gałęziach przemysłu. W medycynie stanowią jeden z zasadniczych elementów profilaktyki zakażeń szpitalnych.

Trudno wyobrazić sobie współczesną chirurgię bez możliwości posługiwania się narzędziami wolnymi od drobnoustrojów. Pomimo ogromnego postępu w dziedzinie techniki i chemii, będących na usługach medycyny, procesy termiczne stanowią nadal podstawową metodę sterylizacji. Sprawność urządzeń sterylizujących kontrolowana jest czynnikami fizycznymi, proces wskaźnikami chemicznymi, a jego skuteczność testami biologicznymi [4, 5, 6, 8, 12, 22].

Do niedawna w niektórych krajach europejskich posługiwano się testami z ziemią ogrodową, zawierającymi sporujące bakterie charakteryzujące się małą wrażliwością na działanie ciepła w wysokich temperaturach.

Obecnie dominuje powszechnie dążenie do standaryzacji – w tej dziedzinie również. W związku z czym wprowadzane są, w różnych formach użytkowych, testy biologiczne zawierające spory bakterii o określonej wrażliwości na czynniki sterylizujące.

Uzyskanie drobnoustrojów charakteryzujących się określonym, stałym poziomem wrażliwości uwarunkowane jest:

- wrodzoną wrażliwością szczepu
- ujednoczeniem warunków wzrostu organizmów testowych przed przygotowaniem testów
- zastosowaniem jednakowej metody przygotowania testów
- ujednoczeniem warunków hodowli po poddaniu testów działaniu czynnika sterylizującego.

Wymienione parametry stanowiły i nadal stanowią temat licznych opracowań [1, 3, 12, 13, 17, 18, 19, 20, 22].

Do kontroli procesów dezynfekcji i sterylizacji termicznej stosowane są szczepy drobnoustrojów sporujących *Bacillus subtilis* i *Bacillus stearothermophilus*.

Celem pracy było określenie stopnia sporulacji drobnoustrojów hodowanych na różnych podłożach oraz zbadanie wpływu składu podłoży hodowlanych, czasu hodowli i liczby spor na tęćcie, na wrażliwość drobnoustrojów na działanie pary wodnej w nadciśnieniu.

MATERIAŁY I METODY

Organizmy testowe: *Bacillus subtilis* NCTC 3610, *Bacillus stearothermophilus* NCTC 8923.

Podłoża hodowlane, stosowane do przygotowania zawiesiny spor:

a) Pożywka manganowa: Bacto-tryptone 3 g, Bacto-peptone 6 g, chlorek manganowy 1 ppm, Bacto Nutrient Broth 1,5 g, ekstrakt drożdżowy 3,0 g, agar 25 g do 1000 cm³ wody destylowanej;

b) Pożywka peptonowa: Bacto-peptone 25 g, chlorek sodowy 1,25 g, węgiel wapniowy 2 g, azotan potasowy 1 g, agar 25 g, do 1000 cm³ wody destylowanej;

c) Pożywka bulionowa: Bacto-Nutrient Broth 30 g, Bacto-peptone 2 g, chlorek sodowy 0,4 g, agar 22 g, do 1000 cm³ wody destylowanej.

Podłoża hodowlane stosowane do odzysku drobnoustrojów:

— bulion zwykły: pepton 10 g, chlorek sodowy 5 g, wyciąg mięsny 1000 cm³;

— bulion zwykły z dodatkiem 0,1% skrobi rozpuszczalnej.

Wartość pH podłoży 7,3 – 7,6.

B. subtilis hodowano w temperaturze 32°C, *B. stearothermophilus* w 50°C.

Metoda badania

1. Zależność sporulacji drobnoustrojów od składu podłoża hodowlanego i czasu hodowli.

Drobnoustroje testowe hodowano w probówkach na skosach agarowych o składzie podanym wyżej. Hodowle prowadzono przez 26 dni w odpowiedniej temperaturze; w dwudniowych odstępach czasu zmywano z podłoża i liczono w komorze *Thoma*, przy użyciu mikroskopu fazowo – kontrastowego, ogólną liczbę drobnoustrojów oraz liczbę spor. Wyniki przedstawia rycina 1 i 2.

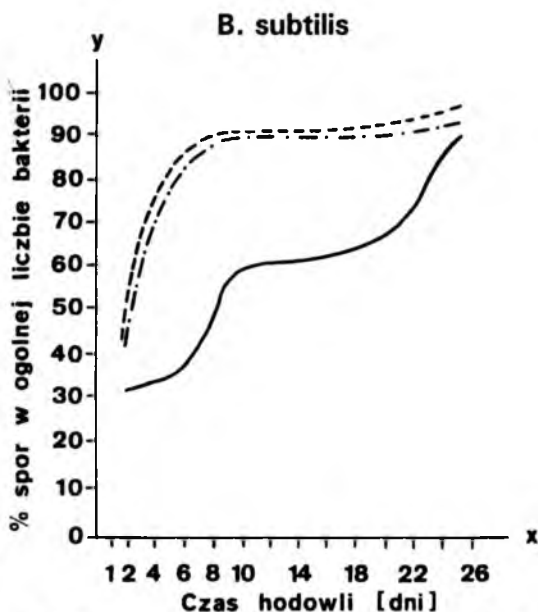
2. Zależność wrażliwości drobnoustrojów na parę wodną w nadciśnieniu od składu podłoża hodowlanego i czasu hodowli:

Drobnoustroje hodowano 3 tygodnie w butelkach *Roux* na stałych podłożach o składzie podanym wyżej. W odstępach czasu 24 h, 48 h, 1, 2, 3 tygodnie hodowle zmywano z podłoża 10 cm³ roztworu *Ringera* rozcieńczonego 1:4, wirowano 15 minut przy 3500 obrotów/min w temperaturze 25°C. Płyn z nad osadu zlewano, drobnoustroje zawieszano ponownie w roztworze i poddawano wirowaniu (procedurę powtarzano trzykrotnie). Po trzecim odwirowaniu drobnoustroje zawieszano w wodzie destylowanej.

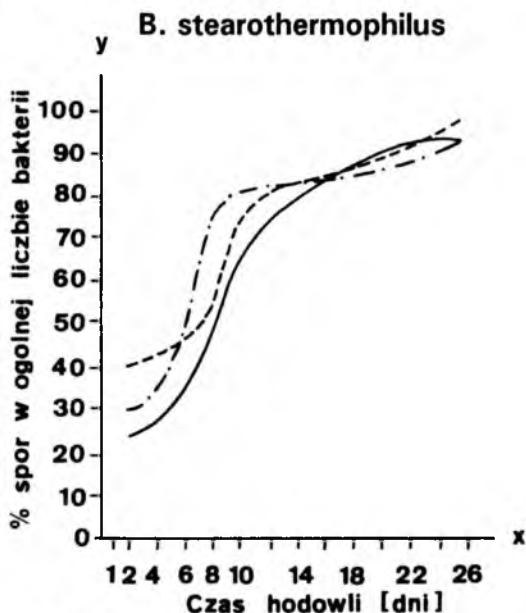
Zawiesinę drobnoustrojów testowych rozcieńczano, a następnie określano liczbę komórek w komorze *Thoma* przy użyciu mikroskopu fazowo – kontrastowego.

W płytkach *Petriego* wyjaławiano ułożone pojedynczo krążki bibuły filtracyjnej *Whatman* nr 1 o średnicy 10 mm. Na każdy krążek nanoszono, używając wykalibrowanych igieł, 1 kroplę (0,015 g) zawiesiny zawierającej 10⁴ spor. Krążki z zawiesiną (testy) suszono w zamkniętych płytkach w temp. 32°C w czasie 24 h.

Do badania wrażliwości drobnoustrojów na działanie pary wodnej w nadciśnieniu służył autoklaw doświadczalny skonstruowany według projektu mgr inż. *K. Zycha*. Uzyskiwano w nim żądane ciśnienie w czasie 15 sekund, w tym też czasie obniżeniu ulegało ciśnienie (do atmos-



Ryc. 1. Wpływ składu podłoża wzrostowego i czasu inkubacji na sporulację bakterii;
 pożywka: manganowa (a) — peptonowa (b) — bulionowa (c) —
 Influence of growth medium and incubation time on sporulation of bacteria medium:
 no. a — no. b — no. c —



Ryc. 2. Wpływ składu podłoża wzrostowego i czasu inkubacji na sporulację bakterii;
 pożywka: manganowa (a) — peptonowa (b) — bulionowa (c) —
 Influence of growth medium and incubation time on sporulation of bacteria medium:
 no. a — no. b — no. c —

ferycznego) po zakończeniu procesu. *B. subtilis* badano w ciśnieniu 0,2 atn, *B. stearothermophilus* w 0,7 atn. Każdy parametr badano na 50 testach.

Testy, po ekspozycji w parze, umieszczano w podłożach płynnych i inkubowano: testy z *B. subtilis* w bulionie zwykłym w temperaturze 32°C w czasie 3 dni, testy z *B. stearothermophilus* w bulionie zwykłym z dodatkiem 0,1% skrobi w temperaturze 50°C w czasie 5 dni.

Określano procent testów, z których nie wyhodowano drobnoustrojów.

Uzyskane dane nanoszono na papier logarymiczno – probitowy, wykreślano proste interpolując między naniesionymi punktami. Dla sprawdzenia, czy wykreślone proste oddają wiarygodnie przebieg działania bakteriobójczego, zastosowano test χ^2 .

Tabela I. Wrażliwość spor *Bacillus subtilis* NCTC 3610 na działanie pary wodnej w nadciśnieniu (0,2 atn) w zależności od składu podłoża wzrostowego i czasu hodowli. Czas (w min) potrzebny do uzyskania 99,4% poziomu śmiertelności (odczytany z wykresów).

Influence of growth medium and incubation time on sensitivity of spores of *Bacillus subtilis* NCTC 3610 to steam under pressure (0,2 atn). Time (min) needed to get mortality level 99,4%.

Czas hodowli	Podłoża wzrostowe*		
	1	2	3
Czas ekspozycji (w min.)			
24 h	16	<5	<5
48 h	24	<5	<5
1 tydzień	40	42	24
2 tygodnie	45	50	35
3 tygodnie	45	60	40

* skład podłoży podany na str. 3

Tabela II. Wrażliwość spor *Bacillus stearothermophilus* NCTC 8923 na działanie pary wodnej w nadciśnieniu (0,7 atn) w zależności od składu podłoża wzrostowego i czasu hodowli. Czas (w min) potrzebny do uzyskania 99,4% poziomu śmiertelności (odczytany z wykresów).

Influence of growth medium and incubation time on sensitivity of spores to steam under pressure (0,7 atn). Time (min) needed to get mortality level 99,4%.

Czas hodowli	Podłoża wzrostowe*		
	1	2	3
Czas ekspozycji (w min.)			
24 h	65	22	21
48 h	95	37	37
1 tydzień	160	120	42
2 tygodnie	200	230	61
3 tygodnie	200	300	95

* skład podłoży podany na str. 3

Z wykresów odczytywano czas potrzebny do uzyskania poziomu śmiertelności 99,4% (tabele I, II).

3. Zależność wrażliwości drobnoustrojów na parę w naciśnieniu od liczby spor na teście.

Zawiesinę drobnoustrojów hodowanych 1 tydzień, przygotowaną jak podano wyżej, rozcieńczano tak, aby uzyskać po 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 spor na jednym teście dla *B. subtilis* oraz 10^1 , 10^2 , 10^4 dla *B. stearothermophilus*. Testy poddawano działaniu pary wodnej w naciśnieniu. Po ekspozycji testy inkubowano jak podano w p. 2. Określano procent testów, z których nie wychodowano drobnoustrojów.

Wyniki przedstawiają tabele III i IV.

Tabela III. Wrażliwość spor *Bacillus subtilis* NCTC 3610 na działanie pary wodnej w naciśnieniu (0,2 atn) w zależności od liczby spor na eksponowanych testach (wyrażone w % jałowych testów).

Influence of number of spores of *Bacillus subtilis* NCTC 3610 on test on the sensitivity to steam under pressure (0,2 atn) (express in % of tests free of bacteria)

Liczba spor na teście	Czas ekspozycji (w min)								Czas (w min) odczytany z wykresu przy poziomie śmiertelności 99,4%
	2	3	6	9	12	15	18	21	
% procent jałowych testów									
10^2	30,0	—*	80,0	79,0	86,0	88,0	99,0	—	22,0
10^3	1,5	—	60,0	75,0	80,0	80,0	—	—	32,0
10^4	0	0,7	—	46,0	70,0	—	70,0	—	35,0
10^5	0	1,0	12,0	—	14,0	45,0	—	80	47

*— nie badano

Tabela IV. Wrażliwość spor *Bacillus stearothermophilus* NCTC 8923 na działanie pary wodnej w naciśnieniu (0,7 atn) w zależności od liczby spor na eksponowanych testach (wyrażone w % jałowych testów).

Influence of number of spores of *Bacillus stearothermophilus* NCTC 8923 on test on the sensitivity to steam under pressure (express in % of tests free of bacteria).

Liczba spor na teście	Czas ekspozycji (w min)						Czas (w min) odczytany z wykresu przy poziomie śmiertelności 99,4%
	2,5	5	10	15	20	50	
% procent jałowych testów							
10^1	2,0	60,0	90,0	—*	—	—	12,0
10^2	0	0	15,0	70,0	90,0	—	26,0
10^4	0	0	0	0	—	20,0	—

*— nie badano

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Ryciny 1 i 2 przedstawiają liczbę spor wytwarzanych przez drobnoustroje testowe hodowane na trzech podłożach. Najmniejsza liczba spor wystąpiła na podłożu nr c) ubogim w składniki odżywcze. Szczególnie wyraźne zjawisko to było widoczne w przypadku *B. subtilis*. Drobnoustrój wytwarzał większą liczbę spor na podłożu zawierającym sól manganową. Zależność ta nie była wyraźnie widoczna w przypadku *B. stearothermophilus*.

Proces wytwarzania spor przez obydwie drobnoustroje na wszystkich rodzajach badanych podłoży zwiększał się szybko do 10 dni hodowli, po czym liczba spor ulegała tylko nieznacznemu zwiększeniu.

Na podłożach nr a) i c) liczba spor *B. subtilis* wzrastała gwałtownie począwszy od pierwszych dni hodowli, natomiast gwałtowne zwiększenie liczby spor *B. stearothermophilus* wystąpiło między 6 a 10 dniem.

Zasadą było zmniejszanie się wrażliwości spor organizmów, hodowanych na wszystkich podłożach, wraz z wiekiem hodowli. Skład podłoży, na których rosły drobnoustroje testowe, w widoczny i analogiczny sposób wpływał na wrażliwość spor na badany czynnik termiczny (tab. I i II). Analogia dotyczyła zarówno krótkiego (24h i 48h), jak i długiego (2 i 3 tygodnie) czasu hodowli.

W przypadku spor obu drobnoustrojów, w krótkim czasie hodowli, najmniejsza wrażliwość charakteryzowała spory wyhodowane na podłożu a). Dla *B. stearothermophilus* zależność ta pozwalała się scharakteryzować liczbowo – wrażliwość była około 2,5 – 3 krotnie mniejsza niż spor hodowanych na podłożach b) i c). Natomiast dla *B. subtilis* można jedynie przypuszczać, że jest podobnie, ponieważ w najkrótszym czasie ekspozycji – 5 min ginęły drobnoustroje hodowane na podłożach b) i c), a graniczny czas przeżycia organizmów hodowanych na podłożu a) wynosił 16 min.

Wrażliwość drobnoustrojów hodowanych 2 i 3 tygodnie charakteryzowała się inną zależnością. Najmniej wrażliwe były spory obu organizmów uzyskiwane z podłoża b), średnio z podłoża a) i najbardziej wrażliwe z podłoża c). Wyraźnie zaznaczyła się różnica wrażliwości *B. stearothermophilus* z podłoża b) i c) – była około trzykrotna.

Zależność działania sporobójczego pary wodnej w nadciśnieniu od liczby spor drobnoustrojów, widoczna jest zarówno w przypadku *B. subtilis* (tab. III) jak i *B. stearothermophilus* (tab. IV).

Zwiększenie liczby spor na testach z 10^3 do 10^4 wyraża się w przypadku *B. subtilis* przeszło dwukrotnym przedłużeniem czasu działania (z 12 do 26 min), dla osiągnięcia takiego samego efektu sporobójczego. W tabeli IV nie uwidoczniono wyników dla testu zawierającego 10^4 spor *B. stearothermophilus*, ponieważ w najdłuższym czasie działania (50 min) wyjąłowanych zostało jedynie 20% testów.

Porównując wyniki uzyskane w 1. i 2. części badań można zaobserwować, że podłoże sprzyjające wytwarzaniu spor najmniej wrażliwych termicznie, jest jednocześnie podłożem najmniej korzystnym dla ich wytwarzania. Obydwie cechy nie pozostają ze sobą w prostej zależności. Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje niektórych autorów, dotyczące stymulującego wpływu obecności soli manganowych w podłożu wzrostowym na proces sporulacji [2, 16].

Stwierdzona w pracy zmienna, w czasie hodowli, zależność wrażliwości spor na czynnik termiczny od składu podłoża, wyjaśnić może prezentowane w tej sprawie rozbieżności poglądów [1, 2, 10, 11, 13, 16]. Dominujący pogląd, że sole wapnia uczestniczą w budowie mechanizmów obronnych spor, znalazł również uzasadnienie w prezentowanych wynikach badań wykonanych na drobnoustrojach hodowanych w długim (> 2 tygodnie) okresie czasu [7, 9, 10, 11, 14, 15, 21, 23].

WNIOSKI

1. Wrażliwość spor testowych szczepów *B. subtilis* i *B. stearothermophilus* na badany czynnik termiczny uzależniona jest od rodzaju podłoża hodowlanego i czasu hodowli.
2. Podłoża, na których wytwarzana jest największa liczba spor, nie są jednocześnie podłożami sprzyjającymi powstawaniu form najbardziej opornych na działanie pary wodnej w nadciśnieniu.
3. Liczba spor na teście wpływa na efekt sporobójczy pary wodnej w nadciśnieniu.

H. Krzywicka, B. Tadeusiak, J. Janowska

FACTORS MODULATING THE SENSITIVITY OF BACTERIAL SPORES TO STEAM UNDER PRESSURE

Summary

The sensitivity of spores *B. subtilis* and *B. stearothermophilus* to steam under pressure depended on the growth medium and duration of cultivation.

B. subtilis and *B. stearothermophilus* produced the largest number of spores on medium with Mn and yeast extract. However the spores grown on the medium were not the most resistant.

The resistant spores was growing up with the age of cultures. The highest level of resistance was obtained in the case of the medium with Ca, after 7 – 10 days of cultivation. The sporicidal effect of steam under pressure depended on the number of spores on the test.

PIŚMIENICTWO

1. Abalaka J.A., Oloyede O.B.: Effect of metabisulphite on sporulation and alkaline phosphatase in *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*. *Microbios.*, 1990, 63, 256. – 2. Amaha M., Ordal J. Z.: Effect of divalent cations in the sporulation medium on the thermal death rate of *Bacillus coagulans* var *thermoacidurans*. 1957, 74, 596. – 3. Berger I.J., Nelson P. A. The effect of formulation of parenteral solution on microbial growth – measurement of D-and z-values. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, 1995, 49, 32. – 4. Bergmann H.J., Benchmark A.: Investigation of sterilization indicators for monitoring steam sterilization. *Zentral Sterilization.*, 1993, 1, 159. – 5. Bergman H. J.: Safety by means of biological or chemical indicators. *Zentral Sterilization.*, 1994, 3. – 6. Block S. S.: *Disinfection, Sterilization and Preservation*, Lea and Febiger, Philadelphia., 1991. – 7. Eisenstadt E., Silver S.: Calcium transport during sporulation in *Bacillus subtilis* w: *Spores V. Fifth International Spore Conference* (Ed.: H. O. Halvorson, R. Hanson, L. L. Campbell) *Am. Soc. Microbiol.*, 1972, 180. – 8. Gardner J. F., Peel M. M.: *Introduction to Sterilisation, Disinfection and Infection Control*. Second Edition. Churchill Livingstone, London, 1991. – 9. Gould G. W., Dring G. J.: Heat resistance of bacterial endospores and concept of an expanded osmoregulatory cortex. *Nature*, 1975, 258, 402. – 10. Grecz N., Tang T., Rajan K. S.: Relation of metal chelate stability to heat resistance of bacterial spores, w: *Spores V. Fifth International Spore Conference* (Ed. H. O. Halvorson, R. Hanson, L. L. Campbell), *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, 1972, 53.

11. Kihm D. J., Hutton M. T., Hanlin J. H., Jonhson F. A.: Influence of transition metals added during sporulation on heat resistance of *Clostridium botulinum* 113B spores. Appl. Environ. Microbiol., 1990, 56, 681. – 12. Lechowicz R. V., Ordal Z. J.: The influence of the sporulation temperature on the heat resistance and chemical composition of bacterial spores. Can. J. Microbiol., 1962, 8, 287. – 13. Mayou J. L., Jezeski J. J.: Effect of sporulation media on the heat resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. J. Food Prot. 1977, 40, 232. – 14. Murrell W. G.: Biophysical studies on the molecular mechanisms of spore heat resistance and dormancy w: Sporulation and germination, (Ed. Levinson H. S., Sonenshein A. L., Tipper D. J.). Am. Soc. Microbiol., Washington, 1981, 64. – 15. Murrell W. G., Warth A. D.: Composition and heat resistance of bacterial spores w: Spores , (Ed. L. L. Campbell, H. O. Halvorson) Am. Soc. Microbiol., 1965, 1). – 16. Nank W. K. Schmidt C. F.: The effect of the addition of manganese to a nutrient agar sporulation medium upon to resistance of thermophilic flat sour spore crops. Bacteriol. Proc. 1958, 42. – 17. Quintavalla S., Parolari G.: Effect of temperature, and pH on the growth of *Bacillus* cells and spores: a response surface methodology study. Int. J. Food Microbiol. 1993, 19, 207. – 18. Schmidt C. F., Nank W. K.: Cultural factors influencing the thermal resistance of a strain of *Bacillus subtilis*. Bacteriol. Proc., 1958, 42. – 19. Silla-Santos M. H., Nunez-Kalasic H. The effect of pH on the thermal resistance of *Clostridium sporogenes* (PA 3679) in asparagus puree acidified with citric and glucono-delta-lactone. Int. J. Food Microbiol., 1992, 16, 275.- 20. Slepecky R., Foster J. W.: Alterations in metal content of spores of *Bacillus megatherium* and the effect of some spore properties. J. Bacteriol., 1959, 78, 117.
21. Warburg R. J., Buchanan C. E., Parent K., Halvorson H. O.: A detailed study of ger J mutants of *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol., 1986, 132, 2309. – 22. Williams N. D., Russell A. D.: Conditions suitable for the recovery of biocide treated spores of *Bacillus subtilis*. Microbios, 1993, 74, 121. – 23. Wooley B. C., Collier R. E.: Changes in thermoresistance of *Clostridium roseum* as related to the intracellular content of calcium and dipicolinic acid. Can. J. Microbiol., 1965, 11, 279.

Otrzymano: 1995.11.30