

HANNA KRZYWICKA, BOŻENNA JAKIMIAK, EWA ZARZYCKA

WPLYW PODŁOŻY WZROSTOWYCH NA ODZYSK DROBNOUSTROJÓW
TESTOWYCH PODDANYCH DZIAŁANIU PARY WODNEJ
W NADCIŚNIENIU

THE EFFECT OF GROWTH MEDIA ON RECOVERY OF TEST MICROORGANISMS
AFTER EXPOSITION TO SATURATED STEAM UNDER PRESSURE

Zakład Zwalczenia Szkażeń Biologicznych, Państwowy Zakład Higieny
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: dr H. Krzywicka

Sprawdzono wpływ podłoży wzrostowych na odzysk drobnoustrojów testowych: Bacillus subtilis i Bacillus stearothermophilus poddanych działaniu pary wodnej w nadciśnieniu. Podłoża zawierające glukozę, tryptozę oraz L-alaninę stwarzały najkorzystniejsze warunki wzrostu.

WSTĘP

Proces sterylizacji należy kontrolować wskaźnikami fizycznymi, biologicznymi i chemicznymi (2, 3, 4, 10, 18).

Wskaźniki biologiczne informują nas o fakcie zabicia drobnoustrojów – spor wyselekcjonowanych szczepów bakterii wysoce opornych na dany czynnik sterylizujący.

Szczepy testowe powinny być niepatogenne, łatwe w hodowli, a ich oporność powinna przewyższać oporność mikroorganizmów występujących w środowisku szpitalnym.

W przypadku sterylizacji parą wodną w nadciśnieniu szczepem bakterii wykazującym najwyższą oporność jest *Bacillus stearothermophilus*. Procesy dezynfekcji termicznej również powinny być kontrolowane wskaźnikami biologicznymi. Do sporządzenia testów biologicznych stosuje się spory szczepu *Bacillus subtilis* (4, 18).

Wielu badaczy zaobserwowało różnice we wzroście drobnoustrojów poddawanych działaniu pary wodnej w nadciśnieniu w temperaturach subletalnych zależnie od rodzaju stosowanych podłoży po okresie ekspozycji (1, 8, 11, 12)

Celem niniejszej pracy było sprawdzenie jakie podłoża wzrostowe stwarzają najkorzystniejsze warunki dla rozwoju bakterii testowych.

MATERIAŁ I METODY

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

Przygotowanie zawiesiny drobnoustrojów

Hodowle bakterii prowadzono w butelkach *Roux* na podłożu agarowym zawierającym 3% bulionu zwykłego, 0,5% peptonu. Organizmy testowe hodowano przez 7 dni: *B. subtilis* w temp. 32°C, *B. stearothermophilus* w temp. 50°C. Drobnoustroje zmywano z podłoża roztworem *Ringera* rozcieńczonym w stosunku 1: 4, płukano trzykrotnie odwirowując w czasie 15 minut przy 3500 obr/min w temp. 25°C. Po trzecim odwirowaniu drobnoustroje zawieszano w wodzie destylowanej.

Gęstość zawiesiny testowej określano w komorze *Thoma* przy użyciu mikroskopu fazowo-kontrastowego.

Przygotowanie testów

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 (0,015g) zawierającą 10^4 spor. Krążki z zawiesiną (testy) suszono w zamkniętych płytkach w temp. 32°C w czasie 24 h.

Działanie parą wodną w nadciśnieniu.

Badania oporności termicznej przygotowanych testów przeprowadzono w autoklawie doświadczalnym skonstruowanym wg. projektu mgr K. Zycha (PZH). Uzyskiwano w nim żądane ciśnienie w czasie 15 sekund, w tym też czasie uzyskiwano obniżenie ciśnienia do atmosferycznego po zakończeniu procesu. Dla *B. subtilis* stosowano 0,2 atn, a dla *B. stearothermophilus* 0,7 atn. Działaniu pary wodnej w nadciśnieniu poddawano nie mniej niż 20 krążków-testów nasyconych zawiesiną drobnoustrojów. Po ekspozycji w autoklawie (czasy ekspozycji – tabela II, III) testy umieszczano w odpowiednich podłożach (skład podłoży podano w tabeli I).

B. subtilis inkubowano w podłożach I–VII: w temperaturze 32°C w czasie 3 dni. *B. stearothermophilus* w podłożach III, V–VII: w temperaturze 50°C w czasie 5 dni.

Ponadto drobnoustroje testowe po ekspozycji w parze wodnej (czas ekspozycji – tabela IV) hodowano w podłożach V i VI wzbogaconych dodatkowo L-alaniną (0,2%), w warunkach podanych wyżej. Określano % testów, z których wyhodowano drobnoustroje.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Skład stosowanych podłoży podano w tabeli I, a uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach II, III i IV.

W tabelach podane są procenty testów, z których zostały wyhodowane drobnoustroje w jednej serii doświadczeń. Przykład obliczeń podano poniżej.

B. subtilis

Czas działania w minutach	Liczba testów	Liczba testów dodatnich
6	20	12
8	20	6
Razem	40	18

18 testów stanowi 45 %.

Na podstawie wyników podanych w tabeli II można stwierdzić, że dla rozwoju *B. subtilis* najkorzystniejsze jest podłoże III. Pozostałe podłoża można uszeregować wg następującej kolejności: II, V, IV, VII, I.

Spśród czterech badanych podłoży dla rozwoju *B. stearothermophilus* najkorzystniejsze jest podłoże V i III (tabela III). Dodatek 0,2 % L-alaniny do podłoża

Tabela I Skład podłoży
Composition of growth media

Nr podłoża	Skład*
I	Bulion zwykły 3%, pepton 0,2%
II (7)	Bulion zwykły 3%, tryptocza 1%, glukoza 0,5%
III (5)	Bulion zwykły 3%, pepton 0,5%, NaCl 0,8%, glukoza 0,1%
IV (16)	Glukoza 0,2%, ekstrakt drożdżowy 0,3%, K ₂ HPO ₄ 0,1%, CaCl ₂ kryst. 0,008%, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,2%, MgSO ₄ 0,02%, Mn(SO ₄) ₂ H ₂ O 0,005%, ZnSO ₄ 7H ₂ O 0,005%, CuSO ₄ 5 H ₂ O 0,005%, FeSO ₄ 7H ₂ O 0,0005%
V (1)	Bulion 3%, pepton 0,5%, tryptocza 0,1%, skrobia rozp. 0,1%, K ₂ HPO ₄ 0,2%
VI (1)	Ekstrakt drożdż. 1%, skrobia rozp. 0,1%, K ₂ HPO ₄ 0,2%
VII (14)	Tryptocza 1%, ekstrakt drożdż. 0,5%, K ₂ HPO ₄ 0,2%

* pH wymienionych podłoży – 7,4

Tabela II Wpływ składu podłoża wzrostowego użytego do odzysku *Bacillus subtilis* NCTC 3610 poddanego działaniu pary wodnej w nadciśnieniu 0,2 atn (wyrażone w % testów, z których zostały wyhodowane drobnoustroje).
The recovery condition (the composition of the growth media) of test micro-organism: *Bacillus subtilis* NCTC after the exposition to saturated steam under pressure 0,2 atn.

Czas espozycji w min	Rodzaj podłoża*						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
3							
6	48,6	80,3	88,0	67,4	72,1	53,4	48,7
8							
9	32,4	44,2	51,0	36,5	42,2	28,0	23,5
10							
15	3,3	7,4	8,8	5,2	7,0	5,2	4,6
20							

*) Składy podłoży podano w tabeli I

bulionowego V znacznie zwiększył liczbę dodatnich wyników zarówno *B. subtilis* jak i *B. stearotherophilus*, natomiast wpłynął niekorzystnie na wzrost bakterii znajdujących się w podłożu z ekstraktem drożdżowym – podłożu VI (tabela IV).

Kiełkowanie i rozwój spor bakterii przebiega w następujących etapach: depolimeryzacja kompleksu mureinowego w komórce, wydalenie wapnia i peptydów związanych z kwasem mureinowym. W tym stadium śnięcie /dormancy/ jest przerwane i odporność termiczna spada gwałtownie do poziomu bliskiego oporności komórek wegetatywnych.

Gdyby istniała możliwość pobudzenia wszystkich spor do kiełkowania, można byłoby przeprowadzać procesy sterylizacji w stosunkowo niskich temperaturach. Jednak metoda ta nie jest w warunkach praktycznych realna. W każdej populacji spor występują

Tabela III Wpływ składu podłoża wzrostowego użytego do odzysku *Bacillus stearothermophilus* NCTC 8923 *poddanego działaniu* pary wodnej w nadciśnieniu 0,7 atn (wyrażone % testów, z których zostały wyhodowane drobnoustroje).
The recovery conditions (the composition of growth media) of test microorganism: *Bacillus stearothermophilus* NCTC 8923 after the exposition to saturated steam under pressure 0,7 atn.

Czas ekspozycji w min	Rodzaj podłoża *)			
	III	V	VI	VII
45	65,0	94,0 52,9	65,0	
50	42,0	45,0 40,0	30,0	
55	38,4	40,0 7,6	15,3	

*) Składy podłoży podano w tabeli I

Tabela IV Wpływ dodatku 0,2 % L-alaniny na wzrost drobnoustrojów po ekspozycji w parze wodnej w nadciśnieniu: *Bacillus subtilis* NCTC 3610- 0,2 atn *Bacillus stearothermophilus* NCTC 8923- 0,7 atn (wyrażony w % testów, z których zostały wyhodowane drobnoustroje).
Influence of the addition of 0,2 % L-alanine for the growth of microorganisms after the exposition to saturated steam under pressure: *Bacillus subtilis* NCTC 3610 – 0,2 atn, *Bacillus stearothermophilus* NCTC 8923 – 0,7 atn (in % of tests with growing bacteria).

Organizm testowy	Czas ekspozycji w min.	Rodzaj podłoża *)			
		podłoże V		podłoże VI	
		bez alaniny	z alaniną	bez alaniny	z alaniną
B.subtilis	8	28,2	82,4	58,9	15,5
	35	–	–	60,2	33,0
B.stearothermophilus	50	45,0	100,0		
	55	40,0	69,2		

*) Składy podłoży podano w tabeli I

formy znajdujące się w głębszym stanie śnięcia niż inne. Obecność ich w wyjąłowanym materiale stwarza konieczność stosowania zawyżonych temperatur sterylizacji oraz może być przyczyną błędnej interpretacji wyników badań przeprowadzanych w temperaturach subletalnych.

Wielu badaczy zajmowało się problemem wyjaśnienia mechanizmu kiełkowania spor i rozwoju (4, 14, 17).

Pobudzenie kiełkowania osiągnięto stosując tzw. aktywację termiczną, przeprowadzaną w subletalnych temperaturach (6, 9), aktywację promieniami gamma (13), oraz chemicznymi substancjami wprowadzonymi do podłoży bakteryjnych. Zgodnie z danymi z piśmiennictwa rolę aktywatorów chemicznych mogą grywać takie związki jak glukoza, tryptoza, L-alanina, kwas dwupikolinowy (4, 5, 8, 15, 17, 19, 20).

W przedstawionych badaniach najkorzystniejsze dla wzrostu okazały się podłoża zawierające glukozę i tryptozę. Natomiast podłoża w skład, których wchodził ekstrakt drożdżowy nie dawały zadowalających wyników.

Widoczny dodatni wpływ na rozwój drobnoustrojów wywierała obecność L-alaniny w podłożu zawierającym cukry. Obecność L-alaniny w podłożu z ekstraktem drożdżowym nie ułatwiała kiełkowania spor bakterii testowych lecz obniżała procent organizmów rozwijających się.

WNIOSKI

1. Skład podłoża wzrostowych wpływał na odzysk drobnoustrojów testowych: *Bacillus subtilis* i *Bacillus stearotherophilus* po ekspozycji w parze wodnej w nadciśnieniu w warunkach subletalnych.

2. Podłoża zawierające glukozę, tryptozę oraz L-alaninę stwarzały najkorzystniejsze warunki wzrostu.

H. Krzywicka, B. Jakimiak, E. Zarzycka

THE EFFECT OF GROWTH MEDIA ON THE RECOVERY OF TEST MICROORGANISMS AFTER EXPOSITION TO SATURATED STEAM UNDER PRESSURE.

Summary

The aim of the study was to find out which growth media give the best condition for the development of test bacteria after exposure to saturated steam under pressure.

The test organisms were strains of *Bacillus subtilis* NCTC 3610 and *Bacillus stearotherophilus* NCTC 8923.

The test prepared from spore suspensions were exposed to saturated steam under pressure 0.2 atm – *B. subtilis*, and 0.7 atm – *B. stearotherophilus* with various length of exposure /sublethal conditions/. After the exposure the tests were placed in growth media.

The obtained results show that the compositions of the medium in which spore-forming bacteria are grown after the exposure under sublethal conditions to saturated steam under pressure affects the recovery of the test organism. The media with glucose, tryptose and L-alanine provided the best conditions for growth.

PIŚMIENNICTWO

1. *Augustin J.A. Pflug J.J.* Recovery patterns of spores of putrefactive anaerobe 3679 in various subculture media after heat treatment. *Appl. Microbiol.* 1967, 2, 266. – 2. *Bergman H.J., Benchman* Investigation of sterilization indicators for monitoring steam sterilization. *Zentral Sterilization*, 1993, 1, 159. – 3. *Bergman H.J.*: Safety by means of biological or chemical indicators. *Zentral Sterilization*, 1994, 3. – 4. *Block S.S.*: Disinfection, Sterilization and Preservation, Lea and Febiger, Philadelphia, 1991. – 5. *Busta F.F. Ordal Z.J.*: Use of calcium dipicolinate for enumeration of total viable endospore populations without heat activation. *Appl. Microbiol.* 1964, 12, 2, 106. – 6. *Cook A.M. Brown M.R.*: Relationship between heat activation and percentage colony formation for *Bacillus stearotherophilus* spores: Effects of storage and pH of the recovery medium. *J. Appl. Bacteriol.* 1965, 28, 3, 361. – 7. *Cook A.M., Brown M.R.*: The relation between heat activation and colony formation for the spores of *Bacillus stearotherophilus*. *J. Pharm.*, 1964, 16, 725. – 8. *Donnelan J.E., Nags E.H. Levinson H.S.*: Chemically defined, synthetic media for sporulation and for germination and growth of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*

- 1964, 87, 332. – 9. *Fields M.L.*: Environmental stresses on spore populations of *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Microbiol.*, 1964, 12, 5, 407. – 10. *Gardner J.F., Peel M.M.* Introduction to Sterilization, Desinfection and Infection Control. Second Edition, Churchill Livingstone, 1991.
11. *Gonzales I., Lopez M., Mazas M., Gonzales J., Bernardo A.*: The effect of recovery conditions on the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores. *J. Appl. Bacteriol.*, 1995, 78 (5), 548. – 12. *Gould G.W., Jones., Wrighton C.*: Limitations of the initiation of germination of bacterial spores as a spore control procedure. *J. Appl. Bacteriol.*, 1968, 31, 357. – 13. *Hitchins A. B., King W.L., Gould G.W.*: Role of disulphide bond of resistance of *Bacillus cereus* spores to gamma irradiation and heat. *J. Appl. Bacteriol.*, 1966, 29, 505. – 14. *Juhee Kim, Brooks H.*: Spore production by *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Microbiol.* 1966, 14, 4, 690. – 15. *Nakata H.M.*: Organic nutrients required for growth and sporulation of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, 1964, 88, 1522. – 16. *Pelcher B. A., Fleming H. P., Ordal Z.J.*: Some characteristics of spores of *Bacillus cereus* produced by a replacement technique. *Canadian J. of Microbiol.* 1963, 9, 251. – *Russel A. D., Chopra I.* Understanding antibacterial action and resistance. Ellis Horwood Limited, New York – London, 1990. – 18. *Russel A. D., Hugo W. B., Ayliff G. A. J.*, Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation, Backwell Scientific Publication, 1994. – 19. *Sierra C.* Selective inhibition of initiation of germination of bacterial endospores. *Appl. Microbiol.*, 1968, 16, 5, 801. – 20. *Wax R. Freese E.*: Initiation of the germination of *Bacillus subtilis* spores by a combination of compounds in place of L-alanine. *J. Bacteriol.*, 1968, 95, 2, 433.

Otrzymano: 1995. 11. 30