

MAGDALENA STRUS

## MECHANIZMY DZIAŁANIA CZYNNIKÓW FIZYCZNYCH NA DROBNOUSTROJE

## MECHANISMS OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PHYSICAL AGENTS

Zakład Bakteriologii Instytutu Mikrobiologii Collegium Medicum,  
 Uniwersytet Jagielloński  
 31-121 Kraków, ul. Czysła 18  
 Kierownik: prof. dr hab. P. Heczko

*W pracy przedstawiono podstawy działania niszczącego drobnoustroje takich czynników fizycznych, jak wysoka i niska temperatura, promieniowanie UV i jonizujące, plazma i fale dźwiękowe, które zostały wykorzystane w praktyce medycznej do celów dezynfekcji i sterylizacji, lub też są przedmiotem badań wdrożeniowych.*

Większość drobnoustrojów chorobotwórczych dla człowieka jest dużo bardziej podatnych, niż organizmy wyższe, na działanie czynników fizycznych, takich jak: temperatura, promieniowanie, pH środowiska, czy ultradźwięki. Zasadniczą tego przyczyną jest niekorzystny stosunek ich masy ciała do powierzchni. Dzięki temu intensywne i zróżnicowane oddziaływanie czynników fizycznych na mikroorganizmy może powodować ich częściową selekcję lub całkowite wyginięcie w danym środowisku [6].

Największą wytrzymałość na skrajnie zmieniające się oddziaływanie czynników fizycznych w środowisku wykazują, spośród różnych grup drobnoustrojów, bakterie. Dowodzi to ogromnej zdolności przystosowawczej tej grupy organizmów. Z tych powodów znaleźć je można w przyrodzie w takich środowiskach, w których żadna z innych znanych nam form życia w ogóle nie mogłaby egzystować.

Właściwie dosyć trudno jest określić, który z czynników fizycznych oddziałujących naturalnie w przyrodzie jest najistotniejszym dla życia drobnoustrojów. Najwcześniej i najdokładniej poznanym czynnikiem jest temperatura, warunkująca bardzo wiele procesów metabolicznych, w tym również rozmnażanie bakterii [5, 6, 11].

Mikroorganizmy, podobnie jak organizmy wyższe, można ze względu na ich wymagania temperaturowe podzielić na trzy grupy. Pierwszą stanowią organizmy psychrofilne, czyli takie, które żyją w zimnych wodach i w glebie. Ich optymalna temperatura wzrostu wynosi  $+20^{\circ}\text{C}$ , a minimalna zbliża się do temperatury zamarzania środowiska. Zainteresowanie psychrofilami wyraźnie wzrosło wraz z rozwojem przemysłu chłodniczego. Istnieje kilka mechanizmów, dzięki którym psychrofile mogą rozwijać się dobrze w niskich temperaturach. Z punktu widzenia przechowalności żywności najważniejszym odkryciem jest, że ich enzymy katalizujące reakcje metaboliczne działają najsukcesyjnie w niskich temperaturach, a jednocześnie wykazują wyjątkową termowrażliwość

i już temperatura powyżej 20°C działa na nie destrukcyjnie [6]. Dwie pozostałe grupy stanowią drobnoustroje mezofilne i termofilne. Do pierwszej zaliczamy przede wszystkim drobnoustroje chorobotwórcze o optymalnej temperaturze wzrostu 37°C. Natomiast optymalna temperatura wzrostu dla termofili wynosi 60°C, jest to więc grupa najbardziej oporna na wysokie temperatury. Żyją one w gorących źródłach, glebie czy fermentujących resztkach.

Zarówno powyżej temperatury maksymalnej, jak i poniżej temperatury minimalnej rozmnażanie bakterii i wzrost ich komórek ulega zahamowaniu. Wraz z obniżeniem temperatury poniżej optymalnej, bakterie zaczynają dzielić się coraz wolniej. Również inne procesy życiowe ulegają stopniowemu zwolnieniu, aż do ich zahamowania. Natomiast przy wyższych temperaturach bakterie dzielą się bardzo często, a intensywność wielu procesów metabolicznych osiąga wtedy wartość maksymalną. Przy dalszym podniesieniu temperatury zjawiska życiowe ulegają gwałtownemu przerwaniu bez uprzedniej fazy stopniowego ich zwalniania. Spowodowane to jest destrukcją białek, które katalizują większość procesów zachodzących w komórce bakteryjnej. Jedynie bakterie termofilne wykazują bardzo wysoką oporność na znacznie podwyższone temperatury, bowiem enzymy tych bakterii są bardziej odporne na denaturację, co może być związane ze sztywniejszą strukturą II i III rzędową ich białek. Zauważono również, że w organizmach termofilnych występują lipidy o wyższych punktach topnienia w porównaniu z lipidami drobnoustrojów ciepłowrażliwych. Być może temperatura topnienia lipidów komórkowych wyznacza górną granicę wzrostu danego organizmu [1, 5].

Pierwotnym miejscem działania ciepła na bakterie jest nie ściana komórkowa, lecz błona cytoplazmatyczna; skutek uszkodzenia błony następuje wypływ aminokwasów, enzymów, DNA i RNA co prowadzi do destrukcji komórki. Szczególnie wrażliwe na działanie ciepła są kwasy nukleinowe. Ustalono, że RNA jest około 30-krotnie bardziej wrażliwy na inaktywację termiczną niż DNA [11]. Wysoka temperatura powoduje uszkodzenie wiązań wodorowych, w wyniku czego następuje zniszczenie struktury przestrzennej cząsteczek białka, czy kwasów nukleinowych. Do pewnego punktu krytycznego może to być reakcja odwracalna, lecz jego przekroczenie powoduje śmierć komórki [1]. Zatem zarówno podwyższenie temperatury powyżej maksymalnej, jak też i obniżenie poniżej minimalnej, może być dla drobnoustrojów zjawiskiem niekorzystnym. Okazało się, że tylko szybkie obniżenie temperatury do -70°C nie zabija komórki bakteryjnej, lecz zahamowuje wszelkie procesy metaboliczne, które po powrocie do sprzyjających warunków środowiska wracają do stanu przed zamrożeniem. Wolne zamarzanie (temperatury od -3 do -10°C) powoduje nieodwracalne niszczenie komórek bakteryjnych. Tłumaczy się to tym, iż przy wolnym obniżaniu temperatury poniżej 0°C woda zawarta w komórkach wykryształizowuje, a powstające kryształy lodu niszczą struktury cytoplazmatyczne. Natomiast nagłe obniżenie temperatury do -70°C stopni uniemożliwia przejście wody w stan krystaliczny, która została się jako substancja amorficzna, nie naruszając budowy komórki [5].

Najbardziej odporne na działanie temperatury są przede wszystkim formy generatywne drobnoustrojów, lub ich przetrwalniki (zarodniki, spory). Mechanizm tej oporności wynika stąd, że przetrwalniki zawierają szereg ciepłoopornych enzymów wytrzymujących ogrzewanie do ponad 100°C. Do tych enzymów zaliczamy np. racemazę, która powoduje przejście L-alaniny w D-alaninę. Powstanie takiego recematu w komórce

hamuje kiełkowanie spor, a w ten sposób reguluje i ogranicza liczbę komórek wegetatywnych powstających w środowisku w momencie podwyższenia temperatury [1].

Kolejnym, bardzo istotnym czynnikiem fizycznym działającym na drobnoustroje jest promieniowanie elektromagnetyczne o określonej długości fali. Promieniowanie to musi wykazywać absorpcję fal (kwantów energii) przez składniki komórki mikroorganizmu. Przy absorpcji takiego promieniowania, kwanty energii wzbudzają absorbujące je cząsteczki, przy czym energia promienista przechodzi w energię kinetyczną elektronów, atomów lub cząsteczek. Kwanty o niskiej energii (do 1 elektronowolta) powodują nieznaczne drgania i rotacje nie zmieniając struktury i właściwości komórki, a energia ulega rozproszeniu w postaci ciepła. Kwanty o wyższym poziomie energetycznym (do 5 elektronowoltów) mogą powodować wzbudzenie elektronów na zewnętrznych orbitach atomów. Aktywacja taka trwa bardzo krótko, a powracający elektron wywołuje efekt fluorescencji lub przeniesienie energii wzbudzenia na inną cząsteczkę, czy też degradację do ciepła [1]. Im krótsze fale, tym kwanty niosą więcej energii i wywierają tym silniejsze działanie na mikroorganizmy. Zatem szczególne właściwości bakteriobójcze wykazuje promieniowanie ultrafioletowe o długości fali od 2300–2750 Å, a więc fale absorbowane przez kwasy nukleinowe, czy białka. Promieniowanie UV działa letalnie zarówno na formy wegetatywne, jak też i generatywne drobnoustrojów, ale z dwukrotnie mniejszą skutecznością, jak również nieczynnia toksyny bakteryjne. Przy mniejszych energiach promieniowanie UV wykazuje działanie mutagenne. Podstawowy mechanizm działania promieniowania UV związany jest ze zmianami w zasadach purynowych i pirymidynowych; najczęściej doprowadza ono do powstania dimerów tyminy i cytozyny lub hydratacji cytozyny. Obie te zmiany powodują mutacje, czyli błędne podstawiania zasad w czasie replikacji DNA, jak również całkowite zatrzymanie replikacji DNA prowadzące do śmierci komórki. Warto tutaj wspomnieć, że drobnoustroje posiadają ograniczoną zdolność eliminowania takich uszkodzeń na drodze tzw. fotoreaktywacji. Mechanizm fotoreaktywacji polega na wytworzeniu pod wpływem światła enzymu wycinającego dimer tyminy z łańcucha polinukleotydowego, po czym brakujące zasady są ponownie wbudowywane w DNA [1, 11].

Obok promieniowania UV właściwości mutagenne i bakteriobójcze wykazuje również promieniowanie jonizujące. Właściwości jonizujące wykazują niektóre typy promieniowania elektromagnetycznego (promienie *gamma* lub X) oraz promieniowanie korpuskularne (strumienie neutronów, protonów, promienie *alfa* i *beta*). Siła działania promieniowania jonizującego niszcząca drobnoustroje jest znacznie większa niż promieniowania UV. Szczególnie promieniowanie *gamma* wykazuje dużą aktywność biologiczną, głównie z powodu swojej przenikliwości. Mechanizm działania wszystkich typów promieniowania jonizującego jest podobny, mianowicie wyzwolana zostaje energia kinetyczna, która prowadzi do powstania ubytków i przestawień całych odcinków łańcuchów kwasów nukleinowych, oraz dochodzi do mylnego podstawiania zasad. Prawdziwym wyjątkiem wśród drobnoustrojów są bakterie *Deinococcus radiodurans*, które wytworzyły mechanizmy ochronne przed promieniowaniem jonizującym, polegające między innymi na posiadaniu podwójnego genomu [9].

Większość z wymienionych czynników fizycznych, naturalnie występujących w przyrodzie, cywilizacja wykorzystuje do niszczenia drobnoustrojów w procesach dezynfekcji i sterylizacji. Ich duża skuteczność wynika głównie z tego, iż drobnoustroje, poza

nielicznymi wyjątkami, nie wytwarzają oporności na czynniki fizyczne, w przeciwieństwie do czynników chemicznych, stosowanych w środkach dezynfekcyjnych, czy chemioterapeutykach przeciwdrobnoustrojowych. W praktyce medycznej najczęściej wykorzystuje się wysoką temperaturę wraz z działaniem pary wodnej pod ciśnieniem w autoklawach, czy promieniowanie UV wytwarzane przez lampy rtęciowe [2, 7]. Wraz ze wzrostem wykorzystania w medycynie materiałów i narzędzi wrażliwych na działanie wysokiej temperatury, wykonanych z tworzyw sztucznych, takich jak cewniki, igły, endoskopy, do których sterylizacji czy dezynfekcji tylko w ograniczonym stopniu ma zastosowanie wysoka temperatura, zachodzi potrzeba ciągłego poszukiwania nowych, jeszcze do końca poznanych, metod opartych na innych czynnikach fizycznych. W szczególności dotyczy to zastosowań działania plazmy, fal dźwiękowych i ultradźwiękowych [3, 9, 11].

Plazma jest czwartym stanem skupienia materii (obok stanu stałego, płynnego i gazowego). Wysoka energia cząsteczek cechująca ten stan działa niszcząco na żywą materię. Mianowicie, wysoka energia zastosowana w celu wytworzenia plazmy, prowadzi do wybicia elektronów z niektórych atomów, w następstwie czego dochodzi do przyspieszenia powstałych elementów: wolnych elektronów i jąder atomowych, a także całych atomów. W nowej metodzie tak zwanej „zimnej” sterylizacji, niedawno wprowadzonej do praktyki medycznej, wykorzystuje się nadtlenek wodoru jako źródło plazmy. Pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego o wysokiej energii powstają w warunkach wysokiej próżni różne, rodniki nadtlenu wodoru, posiadające niewielką energię i krótki okres życia, ale znaczne działanie drobnoustrojóbójcze. Po wyczerpaniu się energii, z rodników tych powstają cząsteczki wody i tlenu, które nie stanowią żadnego zagrożenia dla żywych organizmów, jak i środowiska. Sterylizacja za pomocą plazmy ma przed sobą daleką przyszłość, ale prowadzone są ciągłe badania mające na celu doskonalenie tej metody [3].

Inne czynniki fizyczne, które próbuje się zastosować do praktyki sterylizacyjnej to fale dźwiękowe i ultradźwiękowe. Fale dźwiękowe słyszalne dla ucha ludzkiego, o częstotliwości drgań od około 32 do 32000 na sekundę, mogą być czynnikiem bakteriobójczym, jeżeli tylko działają one z odpowiednio dużą intensywnością. I tak, na przykład, fale dźwiękowe o częstości około 8900 drgań na sekundę używane były do niszczenia bakterii i uwalniania z nich antygenów. Jak się jednak okazało, nie jest to czynnik zapewniający zupełne zniszczenie drobnoustrojów. Dużą rolę odgrywa tu wiek hodowli bakteryjnej. Bakterie z młodych hodowli są znacznie wrażliwsze na działanie słyszalnych fal dźwiękowych niż stare, kilkudniowe kultury. Praktyczne zastosowanie znalazły natomiast fale ultradźwiękowe o częstości drgań od około 100.000 do 225.000 na sekundę. Śmierć bakterii pod wpływem ultradźwięków o odpowiedniej częstości jest funkcją logarymiczną czasu ich działania. Niestety dla każdego drobnoustroju należy ustalić czas działania przy danej częstotliwości i intensywności fal ultradźwiękowych, występują bowiem znaczne różnice we wrażliwości pomiędzy grupami drobnoustrojów i poszczególnymi gatunkami w obrębie grupy. Mechanizm działania fal ultradźwiękowych wiąże się ze zjawiskiem kawitacji. Polega ono na rozrywaniu roztworu przez powstawanie w nim pęcherzyków gazu, co w przypadku działania na drobnoustroje prowadzi do mechanicznego rozerwania komórki od wewnątrz. W momencie działania fal ultradźwiękowych dodatkowo wyzwala się energia cieplna, która

jest właśnie funkcją czasu. Pojawia się więc pytanie, na które jeszcze brak odpowiedzi, czy działanie drobnoustrojóbójcze fal ultradźwiękowych jest związane ze zjawiskiem kawitacji, czy też wyzwalamą się, znaczną energią cieplną [8,11].

Wprowadzenie do gospodarstw domowych metody podgrzewania potraw za pomocą ultradźwięków ponownie wzbudziło zainteresowanie badaczy zagadnieniem wpływu tych fal na drobnoustroje zawarte w żywności: czy mamy do czynienia jedynie ze śmiercią termiczną, czy też ze śmiercią w wyniku bezpośredniej destrukcji komórek przez fale. Jednakże dostępne piśmiennictwo nie daje ostatecznego rozwiązania tej kwestii, prawdopodobnie z powodu metodycznych trudności w oddzieleniu od siebie tych dwóch dróg działania, chociaż większość ostatnich prac na ten temat raczej przeczy bezpośredniemu działaniu fal ultradźwiękowych. Należy zatem przyjąć, że w zakresie częstotliwości i energii fal stosowanych w kuchniach mikrofalowych niszczenie drobnoustrojów jest zasadniczo powodowane przez wyzwoloną energię cieplną.

Niezależnie od samego mechanizmu bakteriobójczego działania fal ultradźwiękowych, uważa się ostatnio, że kuchnie mikrofalowe pracujące w zakresie 2450 MHz o mocy od 325 do 650 W są w stanie niszczyć w ciągu 5 minut formy wegetatywne większości chorobotwórczych bakterii, zaś przy mocy 1400 W nawet spory bakteryjne w czasie 10 do 20 minut pod warunkiem, że są zawieszony w środowisku wodnym, gdyż wysuszone i przywarte do powierzchni są odporne [8]. Natomiast sprawą otwartą i wymagającą dalszych badań jest bakteriobójcze działanie fal ultradźwiękowych o innej częstotliwości lub energii. Ostatnio grupa badaczy z Akademii Rolniczo-Technicznej z Olsztyna przebadła wpływ promieniowania mikrofalowego stosowanego w powszechnie używanych kuchniach mikrofalowych na kilka szczepów *Campylobacter jejuni* i *Salmonella typhimurium* sztucznie wprowadzonych do tusz drobiowych. Autorzy wykazali, że bakterie zawarte w jamach ciała były niszczone szybciej niż na powierzchni tusz. W ciągu kilkunastu minut dochodziło do całkowitego zniszczenia wszystkich badanych bakterii. Ze względów bezpieczeństwa autorzy sugerują poddawanie tusz drobiowych temu procesowi przez okres co najmniej 16 minut [4, 10].

M. Strus

## MECHANISMS OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PHYSICAL AGENTS

### Summary

Among numerous physical agents exerting their deleterious effect on microorganisms only a few have been applied to sterilisation or disinfection used for medical purposes. Temperature is the most important agent, which from one side in a very wide range enables supporting of metabolic processes of psychro-, mezo- and thermophilic microorganisms, but beyond these limits causes their death. High temperature induces at first damage of cytoplasmic membrane and then denaturation of RNA leading to death. On the other hand, a low temperature slowly decreasing below 0°C induces crystallisation of water in cells and destruction of cytoplasmic structures.

Ultraviolet radiation causes mutations resulting in stopping of DNA replication in all forms of the microorganisms. The same way of the lethal activity is exerted by ionising radiation. Its kinetic energy induces mutations affecting not single bases but also whole operons making gene expression impossible.

Gaseous plasma is a new physical agent applied recently to sterilisation. High frequency energy initiates generation of the plasma from hydrogen peroxide vapours in a high vacuum and creates reactive species particles from the vapours that collide and kill microorganisms.

On the other hand, application of ultrasound radiation to killing of microorganisms needs for further studies because of a high variability depending upon used frequency and energy. It is not known, for example, if destruction of microorganisms by ultrasounds is related to a phenomenon of cavitation or thermal energy. Nevertheless, even a range of frequency and energy used in commercial microwave ovens kills vegetative cells of coliform rods in about 15 minutes.

## PIŚMIENNICTWO

1. *Ackerman E.*: Zarys biofizyki. PZWL, Warszawa, 1968. – 2. *Favero M.S., Bond W.W.*: Sterilization, disinfection and antisepsis in the hospital. W: *Wenzel R.P.*: Prevention and control of nosocomial infections. Williams and Wilkins, Baltimore, 1994. – 3. *Jordy A.*: Niedrigtemperatur – Plasmasterilisation. *Krk. Hyg. Infektverh.*, 1994, 16, 34. – 4. *Jóźwik E., Radkowski M., Uradziński J., Sztejn J., Gomółka M.*: The effect of microwaves on survival of *Salmonella* in chicken carcasses. *Fleischwirt* 1997, 77, 52. – 5. *Kotenko K., Sedlaczek L.*: Biologia bakterii. PWN, Warszawa, 1997. – 6. *Kunicki – Goldfinger W.*: Życie bakterii. PWN, Warszawa, 1968. – 7. *Lowbury E.J.L., Ayliffe G.A.J., Geddes A.M., Williams J.D.*: Control of hospital infection: a practical handbook. 2<sup>nd</sup>ed. Chapman and Hall, London, 1981. – 8. *Najdowski L., Dragas A.Z., Kotnik V.*: The killing activity of microwaves on some non- sporogenic and sporogenic medically important bacterial strains. *J. Hosp. Infect.* 1991, 19, 239. – 9. *Silverman G.J.*: Sterilization by ionizing irradiation. W: *Block S.S.*: Disinfection, sterilization and preservation. Lea and Fibiger, Philadelphia, 1983. – 10. *Uradziński J., Sztejn J., Gomółka M., Jóźwik E., Radkowski M.*: Survival of *Campylobacter jejuni* in chicken carcasses during microwave cooking. *J. Hum. Nutr. Metab.*, 1997 w druku.
11. *Wallhäuser K.H.*: Sterilization – Desinfektion, Konservierung. Georg Thieme, Stuttgart, 1978.

Otrzymano: 1996.12.30