

trwałniki bakteryjne, w zależności od jego stężenia, czasu działania i środowiska.

Materiał i metody

Do badań użyto oczyszczone, spoczynkowe przetrwalniki *B. subtilis*, z kolekcji własnej, o 95 %-owej zdolności kiełkowania w podłożu standardowym (6, 7). Sporządzono zawiesiny o gęstości 5×10^7 spor/ml w roztworze lauroseptu — handlowy, wodny 25% roztwór bromku laurylopirydynowego — w rozcieńczeniach: I— 10^{-3} , II— 10^{-4} , III— 10^{-5} w: W/wodzie i M/wyciągu mięsnym, rozlewano po 5 ml do probówek po czym inkubowano w temp. 30°C w czasie 5', 10', 30', 60', 2 godz., 3 godz., 4 godz., 6 godz., 24 godz., i 48 godz., następnie:

1. Mikroskopowo oceniano działanie Lauroseptu na przetrwalniki spoczynkowe (mikroskop kontrastowo-fazowy Lumipan, powiększenie obj. $90 \times$ ok. $1,5 \times 10$), wyróżniając w ocenie stadia: przetrwalniki spoczynkowe „jasne”, przetrwalniki w I fazie kiełkowania — pobudzone „ciemne” (8, 9), przetrwalniki w II fazie kiełkowania „ciemne nabrzmiące” (5). Wyniki oceny mikroskopowej podano jako średnie z kilkunastu pól widzenia z 5 preparatów sporządzanych dla każdego wariantu czasu działania i stężenia.

2. Z każdego wariantu czasu działania i stężenia pobierano 1 ml i po wykonaniu dziesiętnego szeregu rozcieńczeń wysiewano na podłoże wzrostowe w celu ustalenia wpływu Lauroseptu na żywotność przetrwalników, zdolność wyrastania i formowania kolonii.

Przeprowadzono także obserwacje nad działaniem wybranych stężeń Lauroseptu na homologiczną komórkę vegetatywną. Sporządzano zawiesiny komórek vegetatywnych pobierając je z 18-godzinnej hodowli bulionowej. Po inkubacji w roztworach Lauroseptu, 1 ml próbki przenoszono na stałe podłoże i po 48 godz. odczytywano rezultat.

Jako pomocniczy test dla wyróżnienia żywych spoczynkowych przetrwalników od pobudzonych lub nieżywych stosowano barwienie 1% błękitem metylenowym.

Wyniki

A. Roztwory Lauroseptu w wodzie.

Wyniki uzyskano z badań przeprowadzonych w 30 wariantach czasu działania i stężenia dezynfektanta. W tab. 1 przedstawiono dane dla 15 wariantów.

B. Roztwory Lauroseptu w wyciągu mięsnym.

Wyniki obserwacji zachowania się przetrwalników w wyciągu mięsnym z dodatkiem różnych ilości Lauroseptu dla 15 wybranych wariantów stężenia i czasu działania, przedstawiono w tab. 2.

Tab. 1. Wpływ działania wodnych roztworów Lauroseptu na przetrwalniki *B. subtilis*.

Rozcieńczenie Lauroseptu		Czas inkubacji				
		5'	1 h	4 h	24 h	48 h
W 10^{-3}	% pobudzonych	1,0	4,4	5,8	5,5	6,3
	wyniki posiewów ilościowych *)	$3,4 \times 10^7$ 68%	$3,5 \times 10^7$ 70%	$2,6 \times 10^7$ 52%	$2,4 \times 10^7$ 48%	$2,8 \times 10^7$ 56%
W 10^{-4}	% pobudzonych	3,9	4,5	4,8	4,3	9,2
	wyniki posiewów ilościowych *)	$4,8 \times 10^7$ 96%	$4,3 \times 10^7$ 86%	$4,1 \times 10^7$ 82%	$3,6 \times 10^7$ 71%	$3,2 \times 10^7$ 64%
W 10^{-5}	% pobudzonych	3,7	5,8	6,5	8,6	8,3
	wyniki posiewów ilościowych *)	$4,8 \times 10^7$ 96%	$4,6 \times 10^7$ 91%	$4,7 \times 10^7$ 94%	$4,3 \times 10^7$ 86%	$3,9 \times 10^7$ 78%

*) Ilość osobników po zakończeniu inkubacji oraz % osobników, które zachowały żywotność.

Tab. 2. Wpływ działania roztworów Lauroseptu w wyciągu mięsnym na przetrwalniki *B. subtilis*.

Rozcieńczenie Lauroseptu		Czas inkubacji				
		10'	2 h	3 h	4 h	48 h
M 10^{-3}	% pobudzonych	1,3	2,4	2,7	4,6	4,4
	% nabrzmiących	—	—	—	—	—
	wyniki posiewów ilościowych *)	$4,6 \times 10^7$ 92%	$1,6 \times 10^6$ 3%			
M 10^{-4}	% pobudzonych	3,1	84,5	93,4	95,0	95,5
	% nabrzmiących	—	—	—	—	—
	wyniki posiewów ilościowych *)	$4,9 \times 10^7$ 98%	6×10^6 12%	2×10^6 4%		
M 10^{-5}	% pobudzonych	5,1	87,1	83,3	44,5	**)
	% nabrzmiących	—	4,5	10,5	51,9	**)
	wyniki posiewów ilościowych *)	$4,6 \times 10^7$ 92%	$4,6 \times 10^7$ 92%	$4,8 \times 10^7$ 96%	$4,8 \times 10^7$ 96%	$4,3 \times 10^7$ 86%

*) Ilość osobników po zakończeniu inkubacji oraz % osobników, które zachowały żywotność.

***) W preparatach mikroskopowych z próbek poddanych ponad 6 godz. inkubacji w roztworze M 10^{-5} przetrwalniki stanowiły minimalny odsetek elementów widocznych w preparacie. Obserwowane przetrwalniki mogą być tymi samymi, które wsiano, względnie powstałymi po resporulacji laseczek.

Barwienie błękitem metylenowym potwierdziło obserwacje przedstawione w tab. 2: 1) po 2 godzinnej i dłuższej inkubacji w roztworze $M 10^{-3}$ wszystkie przetrwalniki w preparacie były wybarwione, 2) w preparatach z roztworów $M 10^{-4}$ i $M 10^{-5}$ procent przetrwalników wybarwionych sukcesywnie wzrastał w miarę przedłużania inkubacji.

W odniesieniu do komórek wegetatywnych stwierdzono, że bez względu na to czy jest to roztwór Lauroseptu w wodzie czy w wyciągu mięsny, rozcieńczenie 10^{-4} jest dla komórki wegetatywnej zabójcze. Nawet po 10' działania takiego rozcieńczenia Lauroseptu, wzrostu po przesiewie na podłoże wzrostowe nie obserwowano.

Omówienie wyników i dyskusja

W wyniku porównania efektów działania wybranych stężeń Lauroseptu na przetrwalnik i komórkę wegetatywną *B. subtilis* stwierdzono, że przetrwalnik jest bardziej odporny na destrukcyjne działanie Lauroseptu. Podczas gdy komórki wegetatywne ginęły w roztworze Lauroseptu rozcieńczonym 10^{-4} już po 10', bez względu na to czy był to roztwór w wodzie czy w wyciągu mięsny, przetrwalniki traciły żywotność w roztworach rozcieńczonych w wyciągu mięsny 10^{-3} i 10^{-4} odpowiednio po 2 i 3 godz. w roztworach wodnych maksymalną utratę żywotności (50%) stwierdzono w rozcieńczeniu 10^{-3} po 4 godz. inkubacji, a w rozcieńczeniach 10^{-4} i 10^{-5} maksymalny procent zabitych po 48 godz. inkubacji wyniósł odpowiednio 36 i 22%.

Bean (2) sugerował, że materia organiczna obecna w środowisku działania dezynfektanta obniża z reguły skuteczność jego działania m. in. przez absorpcję dezynfektanta z roztworu i zmniejszenie w ten sposób ilości cząsteczek atakujących komórki bakteryjne. Nasze obserwacje prowadzone na przetrwalniku bakteryjnym potwierdzają jedynie, że obecność substancji organicznej modyfikuje efekt działania dezynfektanta. Tylko w roztworach Lauroseptu w wyciągu mięsny, a zatem zawierających materię organiczną, zanotowano pełnowartościowe efekty zabójcze lub statyczne, występujące w zależności od stężenia i czasu działania. Najefektywniej działa na przetrwalniki roztwór $M 10^{-3}$, który likwiduje po 2 godz. 97%, a po 3 godz. 100% przetrwalników, dalej roztwór $M 10^{-4}$, dla którego analogiczne efekty osiągnano odpowiednio po 3 i 4 godz. działania. Działanie roztworu 10^{-3} jest jednak drastyczniejsze, gdyż do zabicia przetrwalnika dochodzi przed jego wejściem w I fazę kiełkowania. Po 2 godz. inkubacji przetrwalniki oglądane w mikroskopie kontrastowo-fazowym ciemniały na obwodzie i wybarwiały się błękitem metylenowym, co wskazuje, że utraciły żywotność zanim wydzielony został cały kwas dwupikolinowy (DPA) i dlatego nie obserwowano w preparatach mikroskopowych całkowitego ich wyciśnięcia (10). W roztworze $M 10^{-4}$ przetrwalniki zostają zlikwidowane po uprzednim wyjściu ze stanu spoczynkowego. Mechanizm zjawiska wydaje się być następujący: w konkurencji od-

działywania materii organicznej (wyciąg mięsny) na przetrwalnik i bakteriobójczego roztworu Lauroseptu $M 10^{-4}$, najpierw działają induktory kiełkowania zawarte w wyciągu, przetrwalnik wchodzi w I fazę kiełkowania, przybiera formę strukturalnie bliższą komórce wegetatywnej, wrażliwszą zatem na działanie czynników szkodliwych i zostaje zabity. Uzasadnieniem takiej interpretacji jest fakt, że nie obserwuje się przejścia pobudzonych w tym roztworze przetrwalników w II fazę kiełkowania, a po wysiewie na agar formowania kolonii (po inkubacji dłuższej niż 3 godz.).

Roztwór $M 10^{-5}$ działa inhibującą jedynie na podział komórek wegetatywnych. Przetrwalniki kiełkujące po 6 godz. inkubacji dają laseczki, które nie dzielą się dopóki nie zostaną przeniesione na właściwe podłoże wzrostowe.

Praca powyższa, której zasadniczym celem było poznanie efektywności Lauroseptu jako dezynfektanta wobec przetrwalników bakteryjnych, jest jednocześnie oceną działania tego preparatu z grupy związków powierzchniowo-czynnych na przetrwalnik. Rode i Foster (10) na podstawie badań przeprowadzonych na przetrwalnikach *B. megaterium* nad 40 surfaktantami, sformułowali pogląd, że surfaktanty powodują w przetrwalniku zmiany jakie zwykle towarzyszą zapoczątkowaniu kiełkowania tzn. uwalnia się DPA, spada refrakcyjność, przetrwalniki stają się podatne na barwienie. Spośród 23 kationowych surfaktantów przebadanych przez Rode i Foster'a (10) tylko 2 (Armeen C i Armeen 12D) były efektywne wobec przetrwalników *B. subtilis* jako aktywatory kiełkowania — powodowały uwalnianie DPA, czemu jednak nie towarzyszyło nabycie cechy wybarwalności. Mikroskopowo stwierdzony przez nas brak jakiegokolwiek odpowiedzi przetrwalników na obecność surfaktanta podczas inkubacji w wodnych roztworach Lauroseptu nasuwa przypuszczenie, że jest on związkiem powierzchniowo-czynnym nieefektywnym jako aktywator kiełkowania wobec przetrwalników *B. subtilis*.

Uzyskane w pracy wyniki są potwierdzeniem poglądu autorów o konieczności uwzględniania form przetrwalnikowych w badaniach nad efektywnością dezynfektantów.

Piśmiennictwo

1. Balcerak H., Wichlacz M.: Sesja Mikrobiologów Przemysłu Mięsnego, Bydgoszcz, 1969 (mat. niepubl.).
2. Bean H. S.: J. Appl. Bact. 30, 6, 1967.
3. Brzozowska M.: Mat. z XVI Zjazdu Pol. Tow. Mikrobiol. 152, 1967.
4. Cwiertniewska E.: Roczn. PZH 20, 132, 1959.
5. Levinson H. S., Hyatt M. T.: J. Bact. 72, 176, 1956.
6. Michalska I.: Acta Microbiol. Pol. 12, 331, 1963.
7. Michalska I.: Acta Microbiol. Pol. 12, 341, 1963.
8. Michalska I.: Postępy Mikrobiol. 1970 (w druku).
9. Pulvertaft R. J. V., Haynes J. A.: J. Gen. Microb. 5, 657, 1958.
10. Rode L. J., Foster J. W.: Arch. Mikrob. 36, 67, 1960.
11. Walkowiak E., Wityk A., Aleksandrowska I.: Medycyna Wet. 25, 176, 1969.

Adres autora: Krystyna M. Piszczyk, Bydgoszcz, Al. 1 Maja 27/10.