Charakterystyka i oporność na wybrane środki dezynfekujące przetrwalników łaseczek *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*

Characteristics and resistance to selected disinfectants of bacterial spores of *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*.

Anna Kinga Kierzkowska

Zakład Bakteriologii i Zwalczenia Skażeń Biologicznych, Narodowy Instytut Zdrowia
Publicznego – Państwowy Zakład Higieny w Warszawie

Pomimo pojawiania się na rynku coraz to nowszych preparatów dezynfekcyjnych wciąż nie ma preparatów biobójczych, które skutecznie likwidowałyby spory wielolekoopornych patogennych bakterii. Z tego powodu, większość dostępnych na rynku preparatów sporobójczych stanowią mieszaniny kilku substancji. W pracy omówiono charakterystykę endospor łaseczek *Bacillus*, cykl ich rozwoju oraz wykaz obecnie skutecznych substancji stosowanych w mieszaninach preparatów sporobójczych.

Słowa kluczowe: przetrwalniki, sporulacja, dekontaminacja, dezynfekcja, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*

ABSTRACT

Despite the emergence of newer disinfectant preparations on the market, there are still no biocides that would effectively eliminate spores of multi-drug resistant pathogenic bacteria. For this reason, most commercially available sporicidal preparations are mixtures of several substances. The paper discusses the endospore characteristics, their development cycle and the list of currently effective substances used in mixtures of sporicidal preparations

Keywords: endospores, sporulation, decontamination, disinfection, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*

WSTĘP

Stosowanie środków dezynfekujących stanowi jedną z podstawowych metod zwalczania szkodliwych mikroorganizmów. Środki te często jednak są nieskuteczne wobec bakterii wytwarzających spory, między innymi łaseczek *Bacillus subtilis*, i *Bacillus cereus*,

które dzięki dużej łatwości rozprzestrzeniania się w środowisku mogą stwarzać zagrożenie dla bezpieczeństwa człowieka.

W odpowiedzi na działanie środków biobójczych i bakteriobójczych mikroorganizmy wykształciły szereg mechanizmów obronnych w wyniku których są mniej wrażliwe na działanie substancji zawartych w preparatach dezynfekujących. Wciąż trwają badania w celu stworzenia skutecznych preparatów sporobójczych.

W prezentowanej pracy omówiono budowę i oporność na wybrane środki dezynfekujące bakteryjnych przetrwalników laseczek *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus*.

CHARAKTERYSTYKA PAŁECZEK *BACILLUS SUBTILIS* I *BACILLUS CEREUS*

Bacillus cereus to laseczki Gram-dodatnie, tlenowe lub beztlenowe, wytwarzające ciepłoodporne formy przetrwalnikowe. Do grupy *B. cereus* zalicza się sześć gatunków, które charakteryzują się podobieństwem fenotypowym oraz genotypowym. Według badań takie gatunki jak *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides* cechuje ponad 99% podobieństwo pod względem sekwencji 16S rRNA i dotyczy 9 nukleotydów (1). Bakterie *Bacillus cereus* wstępują głównie w żywności i produktach spożywczych wywołując zakażenia pokarmowe, ale także w glebie, wodach, powietrzu oraz materiale roślinnym i organizmach zwierząt i ludzi. W środowisku występuje najczęściej w formie vegetatywnej i przetrwalnikowej wytwarzając spory ciepłoodporne. W formie vegetatywnej jest aktywna metabolicznie i w dogodnych warunkach środowiska intensywnie się namnaża tworząc kolejne kolonie bakterii.

Produkty w których odnotowano najczęstsze występowanie tych bakterii to: makarony, ryż, płatki a także mięso, mleko, sosy. Jeżeli zostaną spożyte pokarmy zakażone przetrwalnikami laseczek *B. cereus*, które nie zostały zniszczone w namnażającym się pokarmie, prowadzi do syntezy enterotoksyny w obrębie jelita. Zakażenie tego typu objawia się uporczywą, wodnistą biegunką. Zanieczyszczone sporami *Bacillus cereus* mogą być także suszone produkty mleczne, w tym produkty dla niemowląt.

Chorobotwórczość *B. cereus* wynika z produkcji enterotoksyn oraz toksycznych enzymów. Laseczki *B. cereus* produkują β -laktamazy odpowiedzialne za oporność bakterii na antybiotyki β -laktamowe. Enterotoksyny wytwarzane przez laseczki *Bacillus* to przede wszystkim różne typy hemolizyn: cereolizyna, sfingomielinaza, cereolizyna AB, hemolizyna II, hemolizyna BL, hemolizyna III oraz trzy typy fosfolipazy C, toksyna emetyczna i dwa kompleksy enterotoksyn, które wywołują silne wymioty (2). Za formę biegunkową zatrucia odpowiada enterotoksyna z grupy hemolizyn typu BL, HBL. W temperaturze pokojowej komórki bakteryjne wytwarzają enterotoksynę i toksynę emetyczną, która jest oporna na ponowne podgrzewanie pokarmu.

Inwazyjność *B. cereus* związana jest z zewnętrznymi strukturami tych bakterii, ich hydrofobowością i hydrofilnością a także zdolnością do adhezji i namnażania się w organizmie człowieka. Hydrofobowa powierzchnia spor ułatwia im przytwierdzenie się do ścian jelit. Przytwierdzone spory kielkują w środowisku jelita cienkiego tworząc formy vegetatywne a następnie wytwarzając enterotoksynę w miejscu docelowym. Szczepy *B. cereus* poza błoną cytoplazmatyczną i ścianą komórkową posiadają w swojej strukturze warstwę powierzchniową „S” produkowaną przez formy vegetatywne bakterii. Według badaczy, warstwa „S” odpowiada za hydrofobowość powierzchni komórek bakteryjnych

i jest potrzebna dla efektywnej adhezji komórek bakteryjnych wobec ludzkich białek strukturalnych (1).

Do zakażenia zazwyczaj dochodzi po spożyciu ugotowanych pokarmów zbożowych zanieczyszczonych przetrwalnikami laseczek (opornych na gotowanie) i pozostawionych w temperaturze pokojowej.

B. cereus oprócz zatruc pokarmowych może powodować wiele innych schorzeń u osób z obniżoną odpornością. Są to zarówno zakażenia ran przypadkowych i pooperacyjnych, jak i znacznie częściej, zakażenia oczu: zapalenie rogówki, wewnętrzne zapalenie oka, zapalenie całej gałki ocznej (1).

Bacillus subtilis to Gram-dodatnie laseczki, tlenowe lub względnie beztlenowe, katalazododatnie. Ruchliwe, urzęsione perytrychalnie lub biegunowo. Występują w glebie, wodach słodkich i słonych rozkładając związki organiczne pochodzenia roślinnego ale mogą także występować w żywności. Naturalnie występuje w organizmie człowieka będąc składnikiem flory jelitowej pełniąc rolę w rozwoju tkanki limfatycznej układu pokarmowego. Wykazują zdolność do przetrwania w trudnych warunkach środowiska, w tym dużych wahań temperatur, pH i zasolenia.

Bacillus subtilis charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem pod względem budowy fizjologicznej i metabolizmu wynikającej z różnorodności genetycznej. Zawartość G + C w chromosomalnym DNA waha się od 32 do 69%.

Wyróżnia się trzy typy rozwojowe *Bacillus subtilis*. Pierwsza to forma wegetatywna, w której bakterie mają dostęp do substancji odżywczych i dzielą się symetrycznie, druga to forma przetrwalnikowa oraz trzecia forma tzw. kiełkowanie. *Bacillus subtilis* wykazuje zdolność do wytwarzania antybiotyków polipeptydowych i enzymów zewnątrzkomórkowych m.in. hydrolaz depolimeryzujących substancje wielocząsteczkowe, toksyn oraz innych metabolitów (1).

PRZETRVALNIKI BAKTERYJNE

Przetrwalniki bakteryjne to spoczynkowa forma bakterii, potocznie nazywana „fazą metaboliczną” lub w „fazą śmierci pozornej”. Endospory skrajnie odporne zwane są formami w stanie „głębokiej, super uśpionej, anabiozy” (13). Bakterie w tej fazie wykazują wysoką zdolność adaptacyjną do przetrwania w bardzo trudnych warunkach środowiska - fizycznych oraz chemicznych - przeżywając przez wiele miesięcy a nawet lat. *Bacillus* nabyły tę cechę na drodze ewolucji i uwarunkowań genetycznych (14). Stały się one ogromnym problemem w procesie dezynfekcji powierzchni, materiałów poddawanych dekontaminacji oraz przemyśle spożywczym odpowiadając za zatrucia przemysłowe.

Bakterie tworzą endospory w procesie zwanym sporulacją, w wyniku niedostatku składników pokarmowych, suszy, nieodpowiedniej temperatury oraz nagromadzenia się produktów przemiany materii (9). Endospory nie wykazują zdolności do rozmnażania się, a każda komórka bakteryjna tworzy w swoim wnętrzu tylko jeden przetrwalnik. Charakteryzuje je odmienna struktura morfologiczna i biochemiczna w porównaniu do wegetatywnej formy komórki bakteryjnej, która w dogodnych warunkach wytwarza toksyny i enzymy odpowiedzialne za ich chorobotwórczość. Do kiełkowania przetrwalników (germinacji) niezbędne są induktory takie jak woda, składniki odżywcze: cukry, nukleotydy oraz aminokwasy m. i. L-alanina, która dzięki aktywności racemazy alaninowej jest

przekształcana w D-alanine. Tak więc, sporulacja jest procesem odwracalnym ponieważ komórka bakteryjna może ponownie po sporulacji przejść w fazę wegetatywną jeśli zaistnieją sprzyjające warunki (13,14).

BUDOWA I PRZEŻYwalNOŚĆ PRZETRwalNIKÓw BAKTERYJNYCH LASECZEK *BACILLUS SUBTILIS* I *BACILLUS CEREUS*

Pojedynczy przetrwalnik zbudowany jest z płaszcza zewnętrznego i wewnętrznego chroniącego przed czynnikami chemicznymi oraz kory, która odpowiada za oporność na wysoką temperaturę. Przetrwalnik może mieć kształt kulisty lub owalny oraz być umieszczony w różny sposób: centralnie, biegunowo lub podbiegunowo (10,11). Powstaje w momencie zaistnienia warunków stresowych w wyniku których dochodzi do zahamowania podziału i wzrostu komórki. Proces sporulacji uaktywnia system złożonych białek wysyłających sygnał z wnętrza komórki. Jest to sześć białek regulatorowych, określaných jako czynnik „sigma (σ)”.

Białka regulatorowe regulowane są przez czynnik transkrypcyjny – białko „Spo0A”, ulegające fosforylacji i zmieniające około 500 genów. Odpowiada ono za kształt przyszłego przetrwalnika (18).

W pierwszym etapie rozwoju powstaje prespora oraz sporangium przedzielone przegrodą. Następnie zagęszcza się cytoplazma a prespora oddziela się od sporangium na skutek wytwarzania się kolejnych osłon: błony, ściany komórkowej, rdzenia i kory tworząc płaszcz osłonowy. Rdzeń zawiera materiał genetyczny, w 10-20% osłonięty małymi białkami tzw. SASP (*small acid-soluble spore protein*), które chronią przed światłem ultrafioletowym. Białka te nie występują w komórce wegetatywnej (3, 9). Kora zbudowana jest z peptydoglikanu, który odpowiada za utrzymanie właściwego ciśnienia wewnątrzkomórkowego. Płaszcz osłonowy zbudowany jest z dwóch warstw – wewnętrznej, składającej się z dwóch cienkich blaszek oraz zewnętrznej jednorodnej warstwy, składającej się w 70% z białek oraz enzymów degradujących i inaktywujących toksyczne, niebezpieczne związki nadając tym odporności na czynniki środowiskowe (9,13).

Dojrzewanie przetrwalnika wymaga 24 godzin, a następnie minimum 6 godzin aby nabrał oporności na wysoką temperaturę. Po zakończeniu tej fazy ustępuje metabolizm a komórka bakteryjna, w której wnętrzu powstał przetrwalnik ulega rozpadowi (8). Dojrzały przetrwalnik przechodzi w stan spoczynku - anabiozyi tzw. „pauzy metabolicznej” (14). Czynnikiem warunkującym to przejście jest utrata wody w rdzeniu do 28-57% (w komórce wegetatywnej jest jej ponad 75%) oraz wytworzenie się wysokiego poziomu enzymu pirydyny – 2 i kwasu dipikolinowego (DPA). Ograniczają tym ruch makrocząsteczek przyczyniając się do spoczynku spor (17). Jeżeli w trakcie zachodzenia procesu sporulacji nagle pojawiają się korzystne warunki środowiskowe, komórka nie może wznowić procesu wzrostu. Zdolność wzrostu odzyskuje po uzyskaniu pełnej dojrzałości (17).

Przetrwalniki bakteryjne są odporne na wysoką temperaturę. Przeżywają w temperaturze 100°C od kilku do kilkudziesięciu godzin. *B. subtilis* może rosnąć w temperaturze 60-70°C dlatego jest laseczką termotolerancyjną (8). Zarodniki *B. cereus* przeżywają w temperaturze 95°C przez 45 minut, natomiast w 100°C w czasie 2,2-5,4 min zachodzi redukcja decymalna (17). Wraz ze wzrostem temperatury spada przeżywalność spor. W temperaturze 112°C przeżywalność spor wynosi średnio 30 min ale dla każdego gatunku warunki inaktywacji są inne i specyficzne. Oporność przetrwalników na wysoką temperaturę wynika z obecności

w strukturach komórkowych kwasu dipikolinowego z jonami wapnia DPA-Ca^+ (DPA – dipicolinic acid), który wpływa regulująco na proces kiełkowania spor oraz inne enzymy, które zachowują strukturę spor w temperaturze powyżej 100°C . Rozpad cząsteczek tego kwasu powoduje osłabienie struktur komórkowych form wegetatywnych bakterii.

Udowodniono, że wywoływanie szoku termicznego (obniżanie i podwyższanie temperatur) od 70°C do 100°C w czasie od 5 minut do 60 minut może powodować uszkodzenie struktur zewnętrznych płaszcza osłonowego przetrwalników.

OPORNOŚĆ PRZETRWAŁNIKÓW *BACILLUS SUBTILIS* I *BACILLUS CEREUS* NA ŚRODKI DEZYNFEKUJĄCE

Preparaty biobójcze i antyseptyczne służą ograniczeniu rozprzestrzeniania się mikroorganizmów w sektorze medycznym, spożywczym i przemysłowym pełniąc ogromną rolę w kontroli zakażeń. Jednak większość z nich działa na formy wegetatywne bakterii nie radząc sobie z formami przetrwalnikowymi (17,16).

W dezynfekcji wyróżnia się trzy poziomy w zależności od wymaganej klasy czystości: poziom niski, w którym niszczy się wegetatywne formy bakterii oraz niektóre wirusy, poziom średni, inaktywujący mykobakterie i wirusy oraz poziom wysoki, w którym dezynfekcja jest najskuteczniejsza wobec przetrwalników, grzybów i wirusów (18).

Skuteczność dezynfekcji zależy od zastosowanego stężenia roztworu, czasu kontaktu oraz czynników zewnętrznych, takich jak: temperatura, ciśnienie i pH. Skuteczny dezynfektant powinien być aktywny wobec mikroorganizmów oraz odporny na niekorzystne warunki środowiska (np. nie powodować korozji), być bezpieczny dla człowieka (nie powodować uczuleń lub być hypoalergiczny), być stabilny w wodzie twardej, dobrze się rozpuszczać, nie powodować przebarwień powierzchni, ulegać biodegradowalności. Dezynfektanty o szerokim spektrum działania zawierają w swoim składzie: kwas nadoctowy, fenole, alkohole czwartorzędowe, związki amoniowe, detergenty, chlorowce, związki kompleksujące związki organiczne rtęci, które są bardzo toksyczne względem form wegetatywnych bakterii ale nie działają na spory. Niespełna tylko kilka grup związków działa sporobójczo. (15). Związki występujące w środkach sporobójczych podzielone są na dwie grupy. Do pierwszej grupy należą: związki utleniające (np. nadtlenek wodoru), kwas nadoctowy oraz nadsiarazan potasu. Natomiast do drugiej grupy należą aldehydy, takie jak np. aldehyd glutarowy, uważany za skuteczny i najczęściej wykorzystywany (15,16).

Gotowe środki dezynfekujące są zazwyczaj mieszaniną różnych związków ponieważ za skuteczny uważa się preparat, który zawiera w swoim składzie kilka substancji (15,16). FDA (Food and Drug Administration) prowadzi wykaz dopuszczalnych i stosowanych środków dezynfekcyjnych wysokiego stopnia. Obecnie na rynku dopuszczone są do sprzedaży preparaty, które zawierają w swoim składzie: $\geq 2,4\%$ aldehyd glutarowy, $0,55\%$ aldehyd ortoftalowy (OPA), $0,95\%$ aldehyd glutarowy z $1,64\%$ fenolem/fenolanem, 75% nadtlenek wodoru z $0,23\%$ kwasem nadoctowym, 1% nadtlenek wodoru z $0,08$ kwasu nadoctowego oraz $7,5\%$ nadtlenu wodoru. Preparaty te mają bardzo dobre działanie sporobójcze (12).

Środki dezynfekujące są wciąż testowane wobec bakterii wytwarzających formy przetrwalnikowe. Dotychczasowe badania są przeprowadzane najczęściej wobec bakterii z rodzaju *Bacillus*.

Środkiem dezynfekującym aktywnym wobec przetrwalnikujących bakterii *Bacillus subtilis* i *Bacillus cereus* jest między innymi aldehyd glutarowy. Środek ten jest najczęściej stosowany do sterylizacji narzędzi i innych materiałów, które nie mogą być wyjaławia-

ne z zastosowaniem wysokich temperatur. Jest skuteczny wobec bakterii wytwarzających spory ponieważ tworzy mocne wiązania krzyżowe z grupami aminowymi ściany komórkowej i płaszczu osłonowego. Wodne roztwory aldehydu glutarowego nie wykazują działania sporobójczego lecz wykazują działanie dezynfekujące. Dopiero jeżeli roztwór zostanie aktywowany i przekształcony w alkaliczny przez zastosowanie czynników alkalizujących do pH 7,5-8,5, wtedy nabiera właściwości sporobójczych.

Badania przeprowadzone z aldehydem glutarowym wykazały, że 5% roztwór działa sporobójczo na spory *Bacillus* (18). Według innych badaczy, 2% roztwór glutaraldehydu redukuje spory *B. cereus* o 4 rzędy liczby logarytmicznej w czasie 15-20 minut, natomiast spory *B. subtilis* tylko 1 log w czasie 30 minut (19). Udowodniono, że 1,5 % glutaraldehyd w środowisku z zanieczyszczeniami organicznymi redukuje liczbę spor w czasie wydłużonym do 8 godzin (18). Mechanizm działania aldehydu glutarowego nie jest jeszcze dobrze poznany. Z badań naukowych wiadomo że niszczy warstwę białek SASP osłaniających płaszcz a następnie uszkadza strukturę DNA (18).

Kolejnym silnym dezynfektantem jest nadtlenek wodoru. Stosowany był już od lat 70-tych i jest stosowany nadal jako dodatkowa substancja w mieszaninach preparatów sporobójczych. Nadtlenek wodoru działa na bakterie przez tworzenie destrukcyjnych wolnych rodników hydroksylowych, które atakują błony lipidowe i DNA (12). Nadtlenek wodoru wykazuje działanie sporobójcze wobec bakterii *B. subtilis* oraz *B. cereus*. W stężeniu 30% niszczy całkowicie spory w ciągu 30 minut. Inne wyniki badań wykazały zmniejszenie spor w czasie 5 minut o jeden rząd jednostek, natomiast po 60 minutach następną redukcję ich ilości o kolejną liczbę logarytmiczną. Wydłużenie czasu działania do 180 minut pozwala na całkowitą redukcję spor. Nadtlenek wodoru, którego stężenie zostało obniżone do 26% zredukował liczbę spor *Bacillus subtilis* o 4 log. w czasie 11 minut.

Trzecim najczęściej używanym dezynfektantem jest kwas nadoctowy, który charakteryzuje się szybkim działaniem wobec drobnoustrojów. Usuwa zanieczyszczenie organiczne, nie pozostawia biofilmów i działa sporobójczo nawet przy niskich temperaturach. Niestety jest roztworem niestabilnym. Jako roztwór 1% po 6 dniach traci już połowę swojej aktywności. Natomiast roztwór 40% traci 1-2% swojej aktywności w ciągu miesiąca. Przeprowadzone badania wykazały, że kwas nadoctowy w stężeniu 0,05-1% zabija spory w 15 sekund do 30 minut (12).

PODSUMOWANIE

Badania naukowe poświęcone skuteczności preparatów sporobójczych wykazują, że najskuteczniejsze środki to mieszaniny zawierające aldehyd glutarowy. Redukuje on liczbę spor w czasie od 15 minut do 8 godzin w zależności od zastosowanego stężenia i drobnoustroju na który działa. Szeroko przeprowadzane badania naukowe poświęcane zwalczaniu bakterii wielolekoopornych skupiają duże zainteresowanie ponieważ bakterie te wciąż stwarzają wiele problemów podczas przeprowadzania skutecznej dezynfekcji.

PIŚMIENNICTWO

1. Bednarczyk A, Kozon-Dackowska E. Czynniki patogenności bakterii z grupy *Bacillus cereus*. Postępy Mikrobiologii 2008; 47: 51-63.

2. Bartoszewicz M, Czyżewska U. Taksonomia, wirulencja i cykle życiowe *Bacillus cereus* Sensu Lato. Postępy Mikrobiologii 2017; 56: 440-50.
3. Dudkiewicz B, Kmieciak W, Kraszewska A i inni. Ćwiczenia z mikrobiologii dla studentów analityki pod red. Eligii M. Szewczyk. Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej i Diagnostyki Mikrobiologicznej. Uniwersytet Medyczny w Łodzi 2014.
4. Garbusińska A. Przetrwalniki bakteryjne w procesie dekontaminacji. Centrum Onkologii-Instytut im. Marii Skłodowskiej Curie. Dział Centralnej Sterylizacji. Gliwice.
5. Granum PE, Anderson A, Gayther C, Lund T, Larsen H. Evidence for a further enterotoxin complex producent by *Bacillus cereus*. FEMS Microbiology Letters 1996; 141:145-149 <https://pdfs.semanticscholar.org/6c20/471e5421d47bbf503d2577b5f30cb0ca4b5d.pdf>
6. Imamura D, Watabe K. Spore and sporulation. Research Signpost 2012; 261-82.
7. Imamura D, Watabe K. Proteins involved in formation of the outermost layer of *Bacillus subtilis* spores. JB Accepts, published online ahead of print on 10 June 2011.
8. Kozajda A, Stańczyk-Szadłowska I. Bakterie *Bacillus subtilis* jako problem legislacyjny higieny pracy w Polsce. Medycyna Pracy 2012; 63: 91-6.
9. Książczyk M, Krzyżewska E, Futoma-Kołoch B i inni. Oddziaływanie związków dezynfekcyjnych na komórki bakteryjne w kontekście bezpieczeństwa higieny i zdrowia publicznego. Postępy Hig Med Dos (online) 2015; 69:1042-55.
10. Leclerc H, Gaillard JL, Simonet. La spore Bacterinne. Microbiologie generale 1998
11. Obuchowski M, Hinc K. Przetrwalniki *Bacillus subtilis* – nośniki jadalnych szczepionek. Laboratorium przemysłowe 2011; 7:39-41
12. Ochojska-Jośko J, Spandel L. Zakażenia *Clostridium difficile* jako problem zdrowia publicznego. Problemy Higieny i Epidemiologii 2014;95: 568-73.
13. Olesiak P, Stępiak L. Skuteczność wybranych związków dezynfekcyjnych wobec przetrwalników *Bacillus*. Inżynieria i Ochrona Środowiska 2012; 15: 41-50.
14. Olesiak P, Smyłła A, Krupa P, Kostecki M. Aktywność wybranych dezynfektantów wobec przetrwalników bakterii z rodzaju *Bacillus*. Archives of Environmental Protection 2012; 38: 63-73.
15. Parnowska W. Znaczenie stosowania i badań skuteczności środków dezynfekcyjnych w profilaktyce zakażeń szpitalnych. Postępy Nauk Medycznych 2000; 3: 54-60.
16. Staniszevska M, Rohm-Rodowald E, Jakimiak B. Działanie sporobójcze środków dezynfekcyjnych. Zakażenia 2006; 12: 14-7.
17. Szuliński D. Współczesne techniki zamrażania. Odporność drobnoustrojów na niskie temperatury i jej wpływ na jakość produktów mrożonych. Wydział Mechaniczny 2009;1-8
18. Tennen R, Setlow B, Davils KL. Mechanisms of killilng of spores of *Bacillus subtilis* by iodine glutaraldehyde and nitrous acid. Journal of Microbiology 2001; 89: 330-8.
19. William A. Rutala, David J. Weber. Wytyczne do dezynfekcji i sterylizacji w zakładach opieki zdrowotnej 2008; 59-63

Otrzymano: 11 X 2018 r.

Adres Autora: 00-721 Warszawa, ul. Chocimska 24, Zakład Bakteriologii i Zwalczenia Czynnków Zakaźnych