

APRECIERI PRIVIND EFECTUL ANTIMICROBIAN AL PRODUSELOR BIOCID E PROCID ȘI PROCID FORTE

Răpunțean Gh., F. Chirilă, S. Răpunțean, N. Fiț., G. Nadăș, Z. Fazakas

Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară Cluj-Napoca
e-mail: rapuntean@usamvcluj.ro

Key words: biocide, glutaraldehyde, efect antimicrobian.

ABSTRACT

Procid and Procid forte products are containing two biocide substances (glutaraldehyd and didecyl-dimethyl ammonium chloride) with inhibitory action on Gram negative and Gram positive bacteria, viruses, fungi and unicellular algae. The products are recommended in the veterinary practice for microbial disinfection of various surfaces. The antimicrobial effect was tested for the following microorganism types: Gram negative bacteria: *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas pyocianea*, *Bordetella bronchiseptica*, *Neisseria polysacharea*; Gram positive bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis (tulpina vaccinală 1190 R)*, *Bacillus laterosporus*, *Brevibacterium linens*, *Listeria monocytogenes*, *Erisipelothrix rhusiopathiae*; microscopic fungi: *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Candida albicans*; unicellular algae: *Prototheca zopfii*. The following reference strains of the ATTC collection were also tested: *Staphylococcus aureus* 6358P, *Escherichia coli* 10536, *Pseudomonas pyocyanea* 27853, *Prototheca wickerhamii* 16529. From both products dilutions of 1/100 and 1/200 (10 ml) were introduced in tubes and the tested culture was added (0,2 ml). Passages on culture mediums were performed after 30, 60 minutes and 24 hours, in order to test the mycrobicidal effect. All the tested strains were inhibiting by 1/100 dilution to the three contact times. At 1/200 dilution resistance was observed for *Salmonella* (at 30 minutes) and *Pseudomonas* (at 30 and 60 minutes).

REZUMAT

Produsele Procid și Procid forte conțin două substanțe biocide (aldehidă glutarică și clorură didecildimetil amoniu), cu acțiune inhibitoare asupra bacteriilor Gram negative, Gram pozitive, a virusurilor, fungilor și algelor unicelulare. Produsele sunt recomandate în practica veterinară pentru decontaminarea microbiană a diferitelor suprafețe. S-a verificat efectul antimicrobian față de următoarele tipuri de microorganisme: bacterii Gram negative: *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas pyocianea*, *Bordetella bronchiseptica*, *Neisseria polysacharea*; bacterii Gram pozitive: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis (tulpina vaccinală 1190 R)*, *Bacillus laterosporus*, *Brevibacterium linens*, *Listeria monocytogenes*, *Erisipelothrix rhusiopathiae*; ciuperci microscopice: *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Candida albicans*; alge unicelulare: *Prototheca zopfii*. Au fost testate și următoarele tulpini de referință din colecția ATCC: *Staphylococcus aureus* 6358P, *Escherichia coli* 10536, *Pseudomonas pyocyanea* 27853, *Prototheca wickerhamii* 16529. Din ambele produse s-au efectuat diluții de 1/100 și 1/200, repartizate în tuburi a câte 10 ml, care au fost însămânțate cu 0,2 ml cultură din tulpinile de testat. Din acestea s-au efectuat pasaje pe medii de cultura adecvate după 30 minute, 60 minute și 24 de ore de contact, pentru a verifica inducerea efectului microbicid. Toate tulpinile tesate au fost inhibitate de ambele produse la diluția de 1/100, la toți cei trei timpi de contact, cu efect bactericid. La diluția de 1/200 s-a constatat rezistență la tulpinile de *Salmonella* (la 30 minute) și *Pseudomonas* (la 30 și 60 minute).

INTRODUCERE

Numărul și structura substanțelor chimice cu acțiune biocidă este foarte mare, ele având un rol important în reducerea numărului de microorganisme (acțiunea de sanitație) sau de distrugere a acestora (acțiunea de dezinfectie). Toxicitatea neselectivă sau puțin selectivă a acestor substanțe se datorește mecanismelor prin care ele alterează celulele și care se adresează unor structuri celulare comune atât microorganismelor cât și celulelor organismelor superioare: alterează membranele citoplasmice, denaturează structura proteinelor și blochează grupările chimic active întrerupând metabolismul (1).

Aldehidele utilizate ca dezinfectante (formaldehida, paraformaldehida și glutaraldehida) acționează prin alchilarea grupărilor – NH₂ proteice, la concentrații mari și prin precipitarea proteinelor. Au acțiune bactericidă, sporicidă (după contact prelungit) și virulicidă (1). În folosirea lor trebuie luat în considerare gradul lor de toxicitate (3, 8, 9).

Produsele Procid și Procid forte conțin două substanțe biocide (aldehidă glutarică și clorură didecildimetil amoniu), cu acțiune inhibitoare asupra bacteriilor Gram negative, Gram pozitive, a virusurilor, fungilor și algelor unicelulare (10).

Scopul lucrării are ca obiectiv verificarea efectului antimicrobian al produselor PROCID și PROCID FORTE soluții dezinfectante pe bază de glutaraldehidă, asupra bacteriilor Gram pozitive și Gram negative, a fungilor și algelor, în condiții de laborator.

MATERIAL ȘI METODĂ

Tulpini bacteriene testate:

Bacterii Gram negative: *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, *E. coli* (ATCC 106536) *Pseudomonas pyocyanea*, *Ps. pyocyanea* (ATCC 27853), *Bordetella bronchiseptica*, *Neisseria polysaccharea*.

Bacterii Gram pozitive: *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* (ATCC 6538P), *Bacillus anthracis (tulpina vaccinală 1190 R)*, *Bacillus laterosporus*, *Brevibacterium linens*, *Listeria monocytogenes*, *Erisipelothrix rhusiopathiae*.

Ciuperci microscopice: *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Candida albicans*

Alge unicelulare: *Prototheca zopfii*, *Prototheca wickerhamii* (ATCC 16529).

Medii de cultură. Bulion și agar glucozat, agar Sabouraud, mediu Chapman, agar cu sânge, mediul Smith-Baskerville.

Efectuarea diluțiilor:

Pentru fiecare tulpină microbiană testată s-au folosit 4 tuburi cu 10 ml bulion nutritiv. În primul tub s-a făcut diluția produselor Procid și respectiv Procid forte (50 μl + 10 ml bulion = 1/100) și s-a însămânțat cu 0,2 ml cultură în mediu lichid a tulpinii de testat. După 30 minute, 60 minute și 24 ore de contact, s-a pasat câte 0,2 ml din primul tub în tuburile de control pentru a verifica efectul inhibitor la fiecare timp de contact. Tuburile însămânțate și cele de control s-au incubat pentru 24-48 de ore la 37°C, ulterior fiind ținute sub observație 10-14 zile. S-a lucrat în mod similar și pentru diluția de 1/200.

În cazul bacteriilor, s-a însămânțat 0,2 ml dintr-o cultură în bulion de 24 de ore în fiecare tub. Timpul de contact a fost de 30 minute, 60 minute și 24 de ore. După fiecare timp de contact, s-au făcut însămânțări pe medii de cultură adecvate fiecărei categorii de germeni. S-a verificat în acest mod dacă efectul antimicrobian indus este de tip bactericid sau bacteriostatic.

În cazul ciupercilor, însămânțarea s-a practicat dintr-o suspensie de hife și spori făcută în bulion nutritiv glucozat, folosind ansa de însămânțare cu diametrul de 3 mm; însămânțarea s-a făcut atât pe bulion nutritiv și geloză glucozată; mediile însămânțate au fost ținute sub observație 2 săptămâni.

În cazul algelor unicelulare, din genul *Prototheca*, însămânțarea s-a făcut în mediu lichid (bulion glucozat), cât și în plăci Petri cu agar glucozat și mediul Smith Baskerville; observarea s-a făcut timp de 2 săptămâni.

REZULTE ȘI DISCUȚII

Recipientele însămânțate s-au examinat zilnic timp de două săptămâni.

La mediile lichide s-au apreciat următoarele caractere: limpezimea/turbiditatea, culoarea, aspectul de suprafață și prezența depozitului.

Pe mediile solide s-au apreciat următoarele caractere ale coloniilor: dimensiunile, marginile, aspectul de suprafață, transparența, opacitatea, consistența, culoarea, aderența la mediu.

Dacă germenii nu se dezvoltă (efect inhibitor) mediile se mențin limpezi, chiar după o observație de 2 săptămâni; notarea s-a făcut cu semnul minus (–).

Dacă germenii se dezvoltă (lipsa efectului inhibitor) înseamnă că produsul nu a fost eficient la diluția respectivă; germenii s-au dezvoltat în tubul sau în plăcile de cultură; notarea s-a făcut cu semnul plus (+).

Produsele Procid sunt recomandate în practica veterinară pentru decontaminarea microbiană a diferitelor suprafețe. S-a verificat efectul antimicrobian al produsele biocide Procid și Procid forte (soluții dezinfectante) în condiții de laborator, pe un număr de 19 tulpini microbiene, din care 7 tulpini de bacterii Gram pozitive, 7 tulpini Gram negative, 2 tulpini de muceți, 1 tulpină de levuri și 2 tulpini de alge unicelulare. Rezultatele comparative între cele două produse sunt prezentate în tabelele nr. 1 (bacterii Gram pozitive), nr. 2 (bacterii Gram negative) și nr. 3 (muceți, levuri și alge unicelulare).

Efectul antimicrobian al produselor PROCID și PROCID FORTE față de tulpinile bacteriilor Gram pozitive

Tabel nr. 1

Nr. crt.	Specia bacteriană	Timp de contact	Procid		Procid forte	
			1/100	1/200	1/100	1/200
1.	Staphylococcus aureus (FMV Cluj-Napoca)	30 minute	–	–	–	–
		60 minute	–	–	–	–
		24 de ore	–	–	–	–
2.	Staphylococcus aureus (ATCC 6538P)	30 minute	–	–	–	–
		60 minute	–	–	–	–
		24 de ore	–	–	–	–
3.	Bacillus anthracis (tulpina vaccinală 1190)	30 minute	–	–	–	–
		60 minute	–	–	–	–
		24 de ore	–	–	–	–
4.	Bacillus laterosporus (FMV Cluj-Napoca)	30 minute	–	–	–	–
		60 minute	–	–	–	–
		24 de ore	–	–	–	–
5.	Brevibacterium lines (FMV Cluj-Napoca)	30 minute	–	–	–	–
		60 minute	–	–	–	–
		24 de ore	–	–	–	–
	Listeria monocytogenes (FMV Cluj-Napoca)	30 minute	–	–	–	–
		60 minute	–	–	–	–
		24 de ore	–	–	–	–
7.	Erysipelothrix rhusiopathiae (FMV Cluj-Napoca)	30 minute	–	–	–	–
		60 minute	–	–	–	–
		24 de ore	–	–	–	–

Legenda: (–) Inhibarea creșterii (germenii nu se dezvoltă în cultură)

(+) Lipsa inhibării (germenii se dezvoltă în cultură)

ATCC: American Type Culture Collection.

Se poate constata că efectul biocid față de bacteriile Gram pozitive a celor două produse este identic. Nu s-au înregistrat diferențe nici în ceea ce privește produsele, nici în funcție de unele proprietăți ale bacteriilor testate. Inhibiția s-a produs, chiar dacă unele dintre

acestea sunt sporulate, cum sunt cele din genul *Bacillus* și nici prin faptul că unele, cum sunt *Listeria* și *Erysipelothrix* sunt considerate ca deosebit de rezistente în mediul exterior.

Plăcile de cultură însămânțate din tuburile în care s-a constatat efect inhibitor (la toți timpii de contact), au rămas sterile, pe întreaga perioadă de observație (30 de zile). Aceea înseamnă că efectul antimicrobian este de tip bactericid și s-a manifestat după 30 minute de contact.

Efectul antimicrobian al produselor PROCID și PROCID FORTE față de tulpinile bacteriilor Gram negative

Tabel nr. 2

Nr. crt.	Specia bacteriană	Timp de contact	Procid		Procid forte	
			1/100	1/200	1/100	1/200
1.	Salmonella sp., (FMV Cluj-Napoca)	30 minute	—	+	—	+
		60 minute	—	—	—	—
		24 de ore	—	—	—	—
2.	Escherichia coli (FMV Cluj-Napoca)	30 minute	—	—	—	—
		60 minute	—	—	—	—
		24 de ore	—	—	—	—
3.	Escherichia coli (ATCC 10536)	30 minute	—	—	—	—
		60 minute	—	—	—	—
		24 de ore	—	—	—	—
4.	Bordetella bronchiseptica (FMV Cluj-Napoca)	30 minute	—	—	—	—
		60 minute	—	—	—	—
		24 de ore	—	—	—	—
5.	Pseudomonas pyocyanea (FMV Cluj-Napoca)	30 minute	—	+	—	+
		60 minute	—	+	—	—
		24 de ore	—	—	—	—
6.	Pseudomonas pyocyanea (ATCC 27853)	30 minute	—	+	—	+
		60 minute	—	+	—	—
		24 de ore	—	—	—	—
7.	Neisseria polysacharea (FMV Cluj-Napoca)	30 minute	—	—	—	—
		60 minute	—	—	—	—
		24 de ore	—	—	—	—

Legenda: (–) Inhibarea creșterii (germenii nu se dezvoltă în cultură)
 (+) Lipsa inhibării (germenii se dezvoltă în cultură)
 ATCC: American Type Culture Colection

Față de bacteriile Gram negative efectul microbicid a fost asemănător între cele două produse. S-au dovedit sensibile cele din genurile *Escherichia*, *Bordetella* și *Neisseria* atât la diluția de 1/100, cât și 1/200, la toți cei 3 timpi de contact, respectiv 30 minute, 60 minute și 24 de ore; efectul indus a fost bactericid.

Tulpinile din genul *Pseudomonas* au fost inhibate de ambele produse la diluția de 1/100 la toți cei trei timpi de contact; au fost rezistente la diluția de 1/200 la timpii de 30 și 60 minute, la produsul Procid și la timpul de 30 de minute la Procid forte. Înhibarea s-a produs numai după 24 de ore, efectul indus fiind bacteriostatic la 60 de minute și bactericid la 24 de ore. În tuburile în care nu s-a produs inhibiția (timpii de 30 și 60 minute), s-a dezvoltat cultură. În bulion s-a constatat turbiditate accentuată și formarea unui inel și peliculă la suprafață, iar pe geloza nutritivă s-au dezvoltat colonii de tip S. În ambele medii de cultură s-a constatat că acestea au căpătat o culoare albăstruie ca urmare a producerii de pigment picocianic.

Bacilul picocianic este în general cunoscut ca un germen cu o rezistență crescută la factorii fizici (radiațiile ultraviolete), și chimici (alcool), ca și la antibiotice. Este un germen

cu o largă răspândire în mediul exterior, inclusiv în alimente, fiind bine reprezentat și în mediul spitalicesc, frecvent implicat în producerea infecțiilor nosocomiale, mai ales la persoanele cu diferite forme de imunodeficite.

Tulpina de *Salmonella* a fost inhibată de ambele produse la diluția de 1/100; a rezistat la diluția de 1/200 la 30 minute de contact și a fost inhibată la diluția respectivă de 1/200 la timpii de 60 minute și 24 de ore; efectul indus a fost bactericid.

Efectul antimicrobian al produselor PROCID și PROCID FORTE față de tulpinile de ciuperci și alge unicelulare

Tabel nr. 3

Nr. crt.	Specia bacteriană	Timp de contact	Procid		Procid forte	
			1/100	1/200	1/100	1/200
1.	Candida spp. (FMV Cluj-Napoca)	30 minute	—	—	—	—
		60 minute	—	—	—	—
		24 de ore	—	—	—	—
2.	Penicillium spp., (FMV Cluj-Napoca)	30 minute	—	—	—	—
		60 minute	—	—	—	—
		24 de ore	—	—	—	—
3.	Aspergillus spp., (FMV Cluj-Napoca)	30 minute	—	—	—	—
		60 minute	—	—	—	—
		24 de ore	—	—	—	—
4.	Prototheca zoppii (FMV Cluj-Napoca)	30 minute	—	—	—	—
		60 minute	—	—	—	—
		24 de ore	—	—	—	—
5.	Prototheca wickerhamii (ATCC 16529)	30 minute	—	+	—	+
		60 minute	—	+	—	—
		24 de ore	—	—	—	—

Legenda: (–) Inhibarea creșterii (germenii nu se dezvoltă în cultură)

(+) Lipsa inhibării (germenii se dezvoltă în cultură)

ATCC: American Type Culture Colection.

S-a constatat că cele două produse au manifestat o acțiune microbicidă identică, față de tulpinile de micetii (genurile *Penicillium* și *Aspergillus*), levuri (genul *Candida*) și algele unicelulare (genul *Prototheca*), acestea fiind la ambele diluții efectuate de 1/100 și 1/200 după 30 minute de contact; efectul indus a fost de tip „cid”, cu toate că aceste microorganisme au o structură mai complexă comparativ cu bacteriile. Astfel în compoziția membranei citoplasmice intră sterolii, peretele lor având ca principale elemente de structură polimeri de hexoze și hexozamine. Prototecile au o compoziție chimică complexă. În pereții celulari se găsesc steroli, celuloză, lipsind acidul muramic și glucozamina, aspect distinctiv față de bacterii și fungi.

În baza rezultatelor obținute se poate menționa că produsele biocide Procid și Procid forte, au un intens efect antimicrobian, față de bacteriile testate la diluția de 1/100 la toți cei trei timpi de contact, efectul indus fiind bactericid. La diluția de 1/200 efectul a fost mai slab, rezistând tulpinile de *Salmonella* și *Pseudomonas*. Produsul Procid forte având în compoziția sa și surfactanți s-a dovedit mai activ la diluția de 1/200. Apreciem că ambele produse pot fi folosite în acțiuni de dezinfectie și sanitație, conform recomandărilor din prospectul emis de firma producătoare. Pentru utilizare trebuie acordată o atenție deosebită măsurilor de protecția muncii, cunoscând că gutaraldehida prezintă toxicitate, fiind implicată în producerea unor afecțiuni (astm, rinite, dermatite). Asemenea afecțiuni au fost descrise la oameni și au fost reproduse la animale de experiență (2, 4, 5, 6, 7).

CONCLUZII

1. Produsele biocide Procid și Procid forte (soluții dezinfectante) au fost testate în condiții de laborator pe un număr de 19 tulpini microbiene, din care 7 tulpini de bacterii Gram pozitive, 7 tulpini Gram negative, 2 tulpini de muceți, 1 tulpină de levuri și 2 tulpini de alge unicelulare.

2. Bacteriile Gram pozitive s-au dovedit sensibile în totalitate, atât la diluția de 1/100, cât și 1/200, la toți cei 3 timpi de contact, respectiv 30 minute, 60 minute și 24 de ore, chiar dacă unele bacterii sunt sporulate; efectul indus a fost bactericid.

3. Bacteriile Gram negative din genurile *Escherichia*, *Bordetella* și *Neisseria* s-au dovedit sensibile, la toți cei 3 timpi de contact, atât la diluția de 1/100, cât și 1/200, efectul indus a fost bactericid.

4. Tulpina de *Salmonella* a fost inhibată de ambele produse la diluția de 1/100, a rezistat la diluția de 1/200 la 30 minute de contact și a fost inhibată la diluția respectivă de 1/200 la timpii de 60 minute și 24 de ore; efectul indus a fost bactericid.

5. Tulpinile din genul *Pseudomonas* au fost inhibate de ambele produse la diluția de 1/100 la toți cei trei timpi de contact, dar au fost rezistente la diluția de 1/200 la timpii de 30 și 60 minute de contact, la produsul Procid și la timpul de 30 de minute la Procid forte; inhibarea s-a produs numai după 24 de ore, efectul indus fiind bacteriostatic la 60 de minute și bactericid la 24 de ore.

6. Muceții (genurile *Penicillium* și *Aspergillus*), levurile (genul *Candida*) și algele (genul *Prototheca*) au fost inhibate de ambele produse, la ambele diluții (1/100 și 1/200) la toți cei trei timpi de contact; efectul indus a fost de tip „cid”.

7. Efectul biocid demonstrat asupra tulpinilor bacteriene testate (Gram pozitive și Gram negative; sporulate și nesporulate), a ciupercilor microscopice (levuri și muceți) și a algelor unicelulare, permite recomandarea acestuia în acțiunea de decontaminare, conform recomandărilor producătorului.

BIBLIOGRAFIE

1. Cristea Aurelia Nicoleta, (2006) Tratat de farmacologie, secțiunea XX Antiseptice, Dezinfectante, Paraziticide, Editura Medicală, ediția a 2-a, București, p. 1117-1131.

2. Corrado O. J., J. Osman, R. J. Davies, (1986) Asthma and Rhinitis after exposure to Glutaraldehyde in Endoscopy Units – Human Toxicology, 5, (5), p. 328-328;

3. Halatek T., B. Opalska, R. Swiercz, (2003) Glutaraldehyde Inhalation Exposure of Rats: Effects on Lung Morphology, Clara-Cell Protein, and Hyaluronic Acid Levels in BAL – Inhalation Toxicology, 15, (1), p. 85-97.

4. Nethercott J. R., et al., (1988) Occupational contact dermatitis due to glutaraldehyde in health care workers - Arch. Dermatol.,18, 193-196.

5. Zissu D., P. Bennet, S. Binet, (1998) Histopathological study in B6C3F1 mice chronically exposed by inhalation to glutaraldehyde – Toxicology Letter, 95, (2), p. 131 – 139.

6. Zissu D., (2006) Histopathological change in the respiratory tract of mice exposed to ten families of airborne chemicals – Journal of Applied Toxicology, 15, (3), p. 207

7. von Birgelen Angelique, Chou J. Billey et al., (2000) Effects of Glutaraldehyde in a 2-year Inhalation Study in Rats and Mice – Toxicology Sciences, 55, p. 195-205.

8. Werly M. S., H. D. Burleigh-Flayer, B. Ballantyne, (1995) Respiratory Peripheral Sensory Irritation and Hypersensitivity studies with Glutaraldehyde Vapor – Toxicology and Industrial Health, 11, (5), p. 489-501.

9. * * * Glutaraldehyde, (2008) Wikipedia the free encyclopedia
<http://en.wikipedia.org/wiki/Glutaraldehyde>.

10. * * * Propunere de prospect pentru produsele Procid și Procid forte – S.C. PROMEDIVET SRL
Sovata, județul Mureș.

NOTA: Lucrarea va fi tradusă în limba engleză și va fi publicată în Buletinul USAMV–FMV Cluj-Napoca, 2009.