

Poljakov, A.A. (Mitglied der V.I.-Lenin-Akademie der Agrarwissenschaften der UdSSR¹⁾)

Pavlova, I.B. Šuvaeva, O.N. Kononenko, Ju. V. (Unions-Forschungsinstitut für Veterinärhygiene²⁾)

Maslennikov, Ju.I. (Unions-Forschungsinstitut für Desinfektion und Sterilisation³⁾)

UNTERSUCHUNG DER WIRKUNG VON PERESSIGSÄURE AUF DIE ULTRASTRUKTUR DER Escherichia coli UND DES Staphylococcus aureus

Übersetzung aus:

Trudy. Vsesojuznyj naučno-issledovatel'skij institut veterinarnoj sanitarii. Tjumen', 50 (1974), S. 97 - 104.

Russ.: ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ НАДУКСУСНОЙ КИСЛОТЫ НА УЛЬТРАСТРУКТУРУ КИШЕЧНОЙ ПАЛОЧКИ И ЗОЛОТИСТОГО СТАФИЛОКОККА

Izučenie dejstvija nadukusnoj kisloty na ul'trastrukturu kišecnoj palocki i zolotistogo stafilokokka

When added to *S. aureus* cultures in subbactericidal concns., peracetic acid [79-21-0] induced the formation of intracytoplasmic membrane structures assocd. with respiration. These structures and the cytoplasmic membrane were completely destroyed by bactericidal concns. of peracetic acid. In bactericidal concns., peracetic acid disrupted the osmiophilic inclusions contg. oxidn.-redn. enzymes in *E. coli* cells. Oxygen formed during the decompn. of peracetic acid apparently penetrates into the bacterial cells without damaging the cell walls and causes death by disrupting respiration.

1) VASCHNIL-Vsesojuznaja ordena Lenina akademija sel'skochozjajstvennych nauk im V.I. (Anm. d. Übers.)

2) VNIIVS-Vsesojuznyj naučno-issledovatel'skij institut veterinarnoj sanitarii (Anm. d. Übers.)

3) VNIIDIS-Vsesojuznyj naučno-issledovatel'skij institut desinfekcii i sterilizacii (Anm. d. Übers.)

Gegenwärtig gibt es zahlreiche in- und ausländische Veröffentlichungen über die Möglichkeit der Anwendung von Präparaten aus der Peroxosäurengruppe, insbesondere der Peressigsäure für die Desinfektion (V.T. Osipjan, 1969; V.I. Vaškov, 1971, 1973; Jones, Hoffman, Phillips, 1967).

Nach den Angaben von tschechoslowakischen Verfassern ist die Peressigsäure wirksam bei der Desinfektion von Ställen bei verschiedenen Infektionen, insbesondere bei der Rindertuberkulose. Bei in vitro-Versuchen ging *Mycobacterium bovis* nach 10minütiger Einwirkung von 0,5%iger Peressigsäure zugrunde, und innerhalb von 5 Minuten bei einer Konzentration von 1, 3, 5 %. Die Desinfektion der Testgegenstände aus Holz, die mit *Mycobacterium bovis* infiziert worden waren, trat nach Anwendung von 0,5 - 1%iger Peressigsäure-Lösung bei einer Expositionszeit von 2 Stunden ein (F. Hrušovský, 1965).

Zur Desinfektion und Sterilisation von Gummi- und Kunststoffartikeln wurde die Peressigsäure in der UdSSR erstmals 1973 benutzt. Die Peressigsäure ist ein starkes Antiseptikum und besitzt ausgeprägte Bakterizid- und Sporizideigenschaften.

Die Absicht der vorliegenden Arbeit bestand in der Untersuchung der Wirkung von Peressigsäure auf die Ultrastruktur der Bakterienzellen *E. coli* und *Staph. aureus*.

Die Bakterizidaktivität der Peressigsäure wurde für *E. coli* (Stamm 1 257) und *Staph. aureus* (Stamm 209-P) untersucht. Einer Bouillonkultur (16 Std. Wachstum, 2 Mrd. Keime/ml) wurde die errechnete Peressigsäuremenge zugegeben (nach ADV), nach 10 - 30minütiger Einwirkungszeit wurde das Gemisch mit Soda neutralisiert, und die Überlebensrate der Bakterienkulturen abgeschätzt. Aufgrund der durchgeführten Versuche stellte man fest, daß die Empfindlichkeitsschwelle auf Peressigsäure bei *Staph. aureus* 0,07 % bei 30 Minuten Einwirkungszeit und bei *E. coli* 0,05 % bei derselben Einwirkungszeit beträgt.

Parallel dazu wurden Proben der Bakterienkulturen von *E. coli* und *Staph. aureus* zur Untersuchung im Elektronenmikroskop entnommen.

Die Vorfixierung wurde mit Glutaraldehyd durchgeführt, und die darauffolgende Fixierung nach Ryter und Kellenberger (1958). Das Material wurde in zunehmenden Alkohol- und Azetonkonzentrationen entwässert und in ein Epoxidharzgemisch gegossen. Ultrafeine Schnitte wurden auf dem Ultratom LKB-productor hergestellt, die nach Kontrastierung in wässriger Uranylazetat-Lösung im Elektronenmikroskop NI-12 betrachtet wurden.

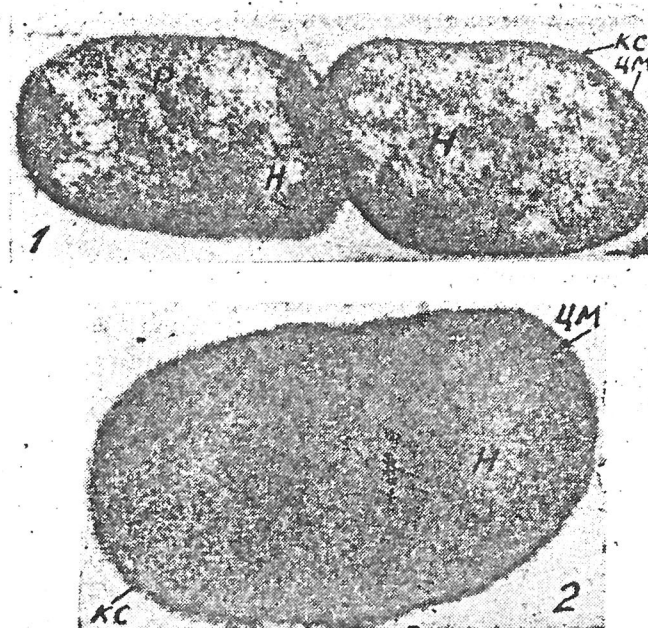


Abb. 1. Ultrastruktur von *E. coli*, genormt:

kc - Zellwand; 4M - Zytoplasmamembran; p - Ribosomen; H - Nukleoid. x 36 000.

Abb. 2. Ultrastruktur von *E. coli* nach Einwirkung von Peressigsäure (Subbakterizidosis):

kc - Zellwand; 4M - Zytoplasmamembran; H - Nukleoid. x 66 000.

Zur Zeit liegen ausreichend gute Untersuchungen über die Ultrastruktur der *E. coli*- und *Staph. aureus*-Zellen von in- und ausländischen Verfassern vor (Murray u.a., 1965; A.V. Kulikovskij, 1969; Avakjan und Koautoren, 1972 u.a.). Die in dieser Arbeit enthaltenen Photographien der *E. coli*- und *Staph. aureus*-Zellen sind in genormter Größe abgebildet, so daß sie als Kontrolle verwendet werden können (Abb. 1 und 3).

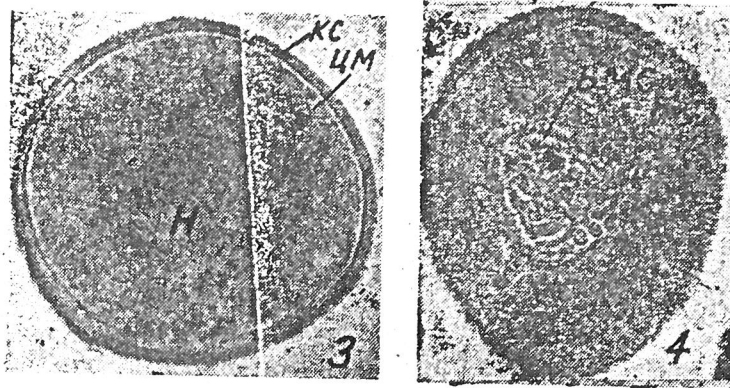


Abb. 3. Ultrastruktur von Staph. aureus, genormt:
kc - dreischichtige Zellwand; 4μ - Zytoplasmamembran; H - Nukleoid. x 60 000.

Abb. 4. Ultrastruktur von Staph. aureus nach
Einwirkung von Peressigsäure (Subbakterizidosis):
kc - Zellwand, etwas aufgelockert. In der Zelle
sieht man eine Anhäufung von Strukturen der inneren
Zytoplasmamembran. x 75 000.

Die Subbakterizidkonzentrationen der Peressigsäure zeigen keine deutlichen Strukturveränderungen in den E. coli-Zellen. Die Zellen werden nur runder und nehmen im Volumen etwas zu. Alle Zellstrukturen sind deutlich zu erkennen: die Zellwand, Zytoplasmamembran, das Zytoplasma und der Nukleoid entsprechen völlig den Strukturen der normalen E. coli-Zelle. In einzelnen Bereichen der Zytoplasmamembran kommen ihre Invaginatoren deutlich zum Vorschein (Abb. 2).

Die Subbakteriziddosen der Peressigsäure rufen bei Einwirkung auf die Staph. aureus-Zelle keine sichtbaren Zerstörungen der Zellwand, Zytoplasmamembran, des Zytoplasmas und Nukleoids hervor. Es ist jedoch eine gewisse Auflockerung der Zellwand festzustellen (Abb. 4).

Im Zytoplasma der Staph. aureus-Zellen stellt man grundsätzlich in allen Zellen Anhäufungen komplexer Strukturen der inneren Zytoplasmamembran fest. Diese Anhäufungen komplexer Strukturen der inneren Zytoplasmamembran findet man sowohl in zentralen Zellbereichen als auch an Stellen, wo sich Transversalsepten bilden (Abb. 4).

Das aktive Agens der Peressigsäure auf die Bakterienzelle ist der Sauerstoff. Peressigsäure zerfällt bei Kontakt mit organischen Substanzen in Wasserstoffperoxid und Essigsäure, und Wasserstoffperoxid seinerseits in Sauerstoff und Wasser.

Bekanntlich ist das Vorhandensein von Sauerstoff in einem Medium, das von starken Aerobionten belebt wird, unbedingte Voraussetzung. Dabei kann der Sauerstoff durch Diffusion in die Zelle gelangen (Rouz, 1971). Eine Funktion der Strukturen der inneren Zytoplasmamembran bei den Bakterien ist die Atmung (Gel'man, 1966; Kac, 1972). Die Strukturen der inneren Zytoplasmamembran sind bei den meisten grampositiven Bakterien vorhanden. Das Auftreten einer großen Anzahl von Strukturen der inneren Zytoplasmamembran in *St. aureus*-Zellen bei Einwirkung von subbakteriziden Dosen der Peressigsäure spricht für eine verstärkte Atmungsfunktion der Zellen bei wesentlich größerer Sauerstoffaufnahme als normal.

Die etwas stärkere Entwicklung der Invaginatoren der Zytoplasmamembran in den Wandbereichen der *E.-coli*-Zellen spricht ebenfalls für eine intensivere Atmung dieser Zellen. Die Auflockerung und geringe Entfärbung der Zellwand beim *Staph. aureus* hängt zusammen mit der Wirkung des Sauerstoffs, der ein starkes Oxidationsmittel ist.

Wie die weiteren Untersuchungen zeigten, treten bei Einwirkung von Peressigsäure-Bakteriziddosen auf die *E. coli*-Zellen stark osmiophile Einschlüsse auf, die in den peripheren Bereichen der Zelle liegen. Diese Einschlüsse (1 - 4 an der Zahl) haben stark ausgeprägte Ränder und bisweilen auch richtige geometrische Umrisse (Abb. 5, 6, 7). Dabei wurden in den Zellen keine Zerstörungen der Struktur der *E. coli*-Zellwand festgestellt. Die Zytoplasmamembran kommt deutlich in allen Bereichen zum Vorschein, außer jenen, in deren Nähe die Osmiophil-Einschlüsse liegen (Abb. 6).

Bei Einwirkung von Peressigsäure-Bakteriziddosen auf *Staph. aureus*-Zellen wurde eine Entfärbung der Zellwand festgestellt (Abb. 10). Es zeigt sich, daß die Zytoplasmamembran und die Membranstrukturen völlig zerstört werden. Besonders deutlich sind die Beschädigungen



Abb. 5, 6, 7. Ultrastruktur von *E. coli* nach Einwirkung einer Peressigsäure-Bakterizid-dosis:

kc - Zellwand; um - Zytoplasmamembran. In der Zelle sind Osmiophil-Einschlüsse (B) verschiedener Größe zu sehen, von denen einige richtige geometrische Umrisse haben (mit Pfeilen bezeichnet). x 30 000, 50 000, 35 000.

der Zytoplasmamembran und der Strukturen der inneren Zytoplasmamembran an den Stellen zu erkennen, wo sich Transversalsepten bilden (Abb. 9, 10, 11).

Es ist bekannt, daß die Zellen der gramnegativen und grampositiven Bakterien eine unterschiedliche Lokalisierung der Atmungsfermente besitzen, was auf die unterschiedlichen Dehydrogenasen zurückzuführen ist.

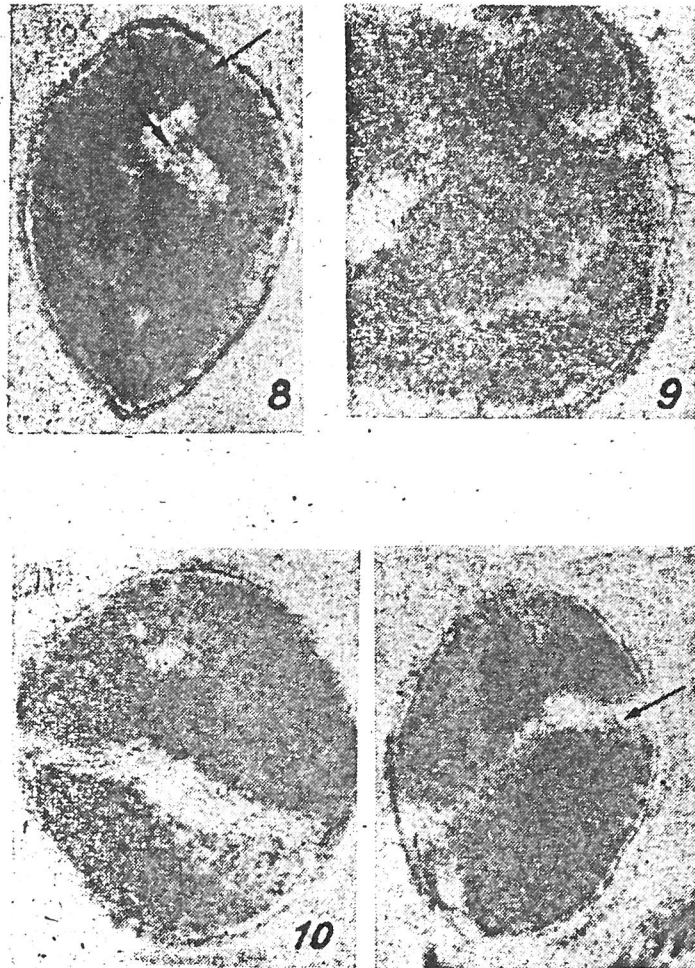


Abb. 8, 9, 10, 11. Ultrastruktur von Staph. aureus nach Einwirkung einer Peressigsäure-Bakterizidosis:

Zu sehen ist die völlige Zerstörung der Zytoplasmamembran und von Zellwandbereichen an den Bildungsstellen der Transversalsepten.
x 90 000, 150 000, 90 000.

Wie gezeigt, kommt bei Inkubation der *E. coli*-Zellen mit Kaliumtellurit (Indikator der Dehydrogenaseaktivität) das Reduktionsprodukt in Form von Anhäufungen der elektronendichten Substanz unter der Zytoplasmamembran nur in einzelnen Bereichen derselben und nicht auf beiden Seiten der Membran, sondern nur auf der Innenseite zur Ablagerung (Kac, 1973). Im Unterschied zur *E. coli* lagert sich beim *Staph. aureus* das Reduktionsprodukt sowohl an der Zytoplasmamembran als auch in den Membranstrukturen ab (Kawata und Inoue, 1965; Kac, 1972). Die unterschiedliche Lokalisierung der Dehydrogenasen bei

den grampositiven und gramnegativen Bakterien gibt den Unterschied in der chemischen Zusammensetzung dieser Dehydrogenasen wie auch in den Funktionen der Zytoplasmamembran und der Membranstrukturen wieder (van Iterson, 1965; Silva, 1967).

Die unter Einwirkung der Peressigsäure ermittelten Daten zeigen, daß das starke Oxydationsmittel Sauerstoff, das das aktive Agens ist, zu einer teilweisen oder vollkommenen Verbrennung jener Bereiche der Bakterienzelle führt, wo die Dehydrogenaseaktivitätszentren lokalisiert sind.

Die Stelle, an der der Sauerstoff wirkte, lag somit in den an der Wand gelegenen Dehydrogenaseaktivitätszentren. Das Vorhandensein von Osmiophil-Einschlüssen in den E. coli-Zellen, die nicht selten richtige geometrische Formen haben, spricht möglicherweise für eine teilweise Verbrennung der Oxydationsprodukte. Die Einwirkung des Sauerstoffs auf die Staph. aureus-Zellen zeichnet sich durch eine vollständige Zerstörung der Zytoplasmamembran und der Strukturen der inneren Zytoplasmamembran aus, was möglicherweise für eine Verbrennung der Oxydations- und Reduktionsfermente spricht, die diffus über die gesamte Zytoplasmamembran und in den Strukturen der inneren Zytoplasmamembran verteilt sind.

Somit konnte durch die Versuchsergebnisse gezeigt werden, daß Sauerstoff das aktive Agens der Peressigsäure ist, welcher in die Bakterienzelle eindringt, ohne sichtbare Zerstörungen an der Gesamtheit der Zellenwand hervorzurufen. Der Sauerstoff wirkt selektiv auf die Redoxenzyme der Zellen ein. Desweiteren werden in den E. coli- und Staph. aureus-Zellen die antolytischen Fermente freigesetzt, die zur völliger Zellauflösung führen, was aber bereits keine spezifische Einwirkung der Peressigsäure mehr ist.

Schlußfolgerungen

1. Es wurde gezeigt, daß Sauerstoff das aktive Agens der Peressigsäure ist, der sich aufgrund der Zersetzung der Peressigsäure bildet. Sauerstoff dringt in die Bakterienzelle ein, ohne sie im Ganzen zu zerstören, und wirkt als starkes Oxydationsmittel.

2. Die Einwirkung subbakterizider Peressigsäurekonzentrationen auf *Staph. aureus* rief eine intensive Entwicklung der Strukturen der inneren Zytoplasmamembran hervor, was für eine beträchtlich zunehmende Atmungsaktivität spricht.

3. Bei Einwirkung von Bakterizidkonzentration der Peressigsäure auf *E. coli* traten im Zellzytoplasma lokale stark osmiophile Einschlüsse auf, die häufig richtige geometrische Formen hatten (1 - 4 pro Zelle). Diese Einschlüsse entsprechen den Stellen, wo die Redoxenzyme lokalisiert sind.

4. Die Einwirkung bakterizider Peressigsäurekonzentrationen auf *Staph. aureus* bewirkte die vollständige Zerstörung der Zytoplasmamembran und der Strukturen der inneren Zytoplasmamembran, die die Zentren der Atemtätigkeit der Zelle sind.

5. Die *E. coli*- und *Staph. aureus*-Zellen sterben infolge vollständiger Zerstörung der Atmungsfermente ab.

Literatur

Авакян А. А., Кац Л. Н., Павлова И. Б. Атлас анатомии бактерий, патогенных для человека и животных. М., Изд-во «Медицина», 1972, стр. 47, 101.
Avakjan, A.A., Kac, L.N., Pavlova, I.B.
Atlas anatomii bakterij, patogennyh dlja čeloveka i životnyh.
Moskva: Verlag "Medicina", 1972; hier: S. 47, 101.
<Anatomischer Atlas der für Mensch und Tier pathogenen Bakterien; russ.>

Гельман Н. С., Лукоянова М. А., Островский Д. Н. Дыхательный аппарат бактерий. Изд-во «Наука», 1966.
Gel'man, N.S., Lukojanova, M.A., Ostrovskij, D.N.
Dychatel'nyj apparat bakterij.
Moskva: Verlag "Nauka", 1966.
Englische Übersetzung:
Gel'man, Nina Samojlovna, Lukoyanova, Marina Antonovna, Ostrovskii, Dmitrii Nikolaevich:
Respiration and Phosphorylation of Bacteria. Transl. ed.: Gifford B. Pinchot.
New York: Plenum Press, 1967.

Hrušovský, F.: Dezinfekčný účinok kyseliny peroctovej na *Mycobacterium bovis*. Persteril Možnosti praktického vynužití.

In: Chemické závody Sokolov národní podnik. Sokolov, 1965, S. 19 - 25.

⟨Desinfektionswirkung der Peressigsäure auf *Myc. bovis*. Persteril-Möglichkeiten in der praktischen Anwendung; tschech.⟩

Itersen, Wouter van: Symposium on the Fine Structure and Replication of Bacteria and Their Parts. II. Bacterial Cytoplasm.

In: Bacteriological Reviews. Baltimore, Md., 29 (1965), Nr 3, S. 299 - 325.

Jones, Lynwood A., Hoffmann, Robert K., Phillips, Charles R.: Sporicidal Activity of Peracetic Acid and β -Propiolactone at Subzero Temperatures.

In: Applied and Environmental Microbiology. Baltimore, Md., 15 (1967), Nr 2, S. 357 - 362.

Кац Л. Н. Автореф. дисс., 1972.

Кас, L.N.

Avtoreferat dissertacii, 1972.

[Nicht ermittelbar]

Kawata, T., Inoue, T.: Reduction Sites of Tellurite and Tetrasolium Salts in *Lysteria monocytogenes*.

In: Journal of General and Applied Microbiology. Tokyo, 11 (1965), Nr 2, S. 115 - 128.

Куликовский А. В. Автореф. дисс., 1969.

Kulikovskij, A.V.

Elektronmikroskopičeskoe issledovanie ultrastrukturnych izmenenij *E. coli* i *Staph. aureus* posle vozdejstviya dezinficirujuščich sredstv.

Moskva, Avtoreferat dissertacii, 1969.

⟨Elektronmikroskopische Untersuchung der Ultrastrukturveränderungen von *E. coli* und *Staph. aureus* nach Einwirkung von Desinfektionsmitteln; russ.⟩

Murray, R.G., Steed, Pamela, Elson, H.E.: The Localisation of the Mucoprotein in Sections of the Cell Wall of *Escheria coli* and Other Gram-Negative Bacteria.

In: Canadian Journal of Microbiology. Ottawa, 11 (1965), S. 547 - 560.

Осипян В. Т. Бактерицидные и дезинфицирующие свойства некоторых ацильных гидроперекисей. ЖМЭИ, 12, 1969, стр. 126.

Osipjan, V.T., Šapilov, O.D., Gramenickaja, V.G., Savinskij, Ja.R.: Baktericidnye i dezinficirujuščie svojstva nekotorych acil'nych gidroperekisej.

In: Žurnal mikrobiologii, épidemologii i immunobiologii. Moskva, 12 (1969), S. 126 - 130.

[Bactericidal and Disinfecting Properties of Some Acyl Hydroperoxides; russ.]

Розу Э. Химическая микробиология. М., Изд-во «Мир», 1971, стр. 83.

Rouz, E.

Chimičeskaja mikrobiologija.

Moskva: Verlag "Mir", 1971; hier: S. 83.

Übersetzung aus dem Englischen:

Ryter, A., Kellenberger, E.: Étude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide désoxyribonucléique. I. Les nucléoides des bactéries en croissance active.

In: Zeitschrift für Naturforschung. B: Anorganische Chemie, Organische Chemie. Tübingen, 13b (1958), S. 597 - 605.

Silva, M.T.: Electron Microscopic Study on the Effect of the Oxidation of Ultrathin Sections of Bacillus cereus and B. megaterium.

In: Journal of Veterinary and Animal Husbandry Research. Indore, 18 (1967), Nr 3, S. 345 - 353.

Вашков В. И. Химические стерилизующие средства. Труды ВНИИДнС, т. I, в. 21, 1971, стр. 23-31.

Vaškov, V.I.: Chimičeskije sterilizujuščie sredstva.

In: Trudy. Vsesojuznyj naučno-issledovatel'skij institut dezinfekcii i sterilizacii. [Moskva,] 1 (1971), Nr 21, S. 23 - 31.

<Chemisch sterilisierende Stoffe; russ.>

Вашков В. И. Средства и методы стерилизации, применяемые в медицине. М., Изд-во «Медицина», 1973.

Vaškov, V.I.

Sredstva i metody sterilizacii, primenjaemye v medicine.

Moskva: Verlag "Medicina", 1973.

<Die in der Medizin benutzten Sterilisationsmittel und -verfahren; russ.>

Stuttgart, den 7. August 1979

übersetzt von

Ottmar Pertschi
(Ottmar Pertschi)
Dipl.-Übersetzer