

Антибактериален ефект на дезинфектанти и антисептици

Николета Христова¹, Маргарита Ценова^{1,2}, Мартина Иванова¹, Емилия Грозданова¹, Славена Давидова¹, София Геройска¹, Мария Борисова¹, Велизар Георгиев¹, Жанина Радостинова¹, Симона Младенова¹, Мариела Паласкова¹, Галина Сачанска¹

¹ Нов български университет, департамент „Природни науки“, бул. „Монтевидео“ № 21, София, България

² Софийски университет „Св. Климент Охридски“, Биологически факултет, бул. „Драган Цанков“ № 8, 1164 София, България

gsatchanska@nbu.bg

Antibacterial Effect of Disinfectants and Antiseptics

Nikoleta Hristova¹, Margarita Tzenova^{1,2}, Martina Ivanova¹, Emilia Grozdanova¹, Slavena Davidova¹, Sofia Geroyska¹, Maria Borisova¹, Velizar Georgiev¹, Zhanina Radostinova¹, Simona Mladenova¹, Mariela Palaskova¹, Galina Satchanska¹

¹New Bulgarian University, Department of Natural Science, 21 Montevideo Blvd., Sofia, Bulgaria

²Sofia University "St. Kliment Ohridski", Faculty of Biology, 8 Dragan Tsankov Blvd., 1164 Sofia, Bulgaria

gsatchanska@nbu.bg

Резюме: Дезинфектантите и антисептиците са химични вещества или разтворители, които играят ключова роля в контрола на инфекциите. Тяхната всеобхватна функционалност намира приложение в почти всички сфери на човешката дейност. Тези препарати могат да проявяват антивирусно, антибактериално и антимикотично действие. В основата на различията между понятията дезинфектант и антисептик стои тяхното приложение. Дезинфектантите са синтетични агенти, чиято биоцидна активност подлага на унищожение микроорганизмите в околната среда, докато антисептиците се прилагат локално, най-често върху кожа и лигавици. Морфологичните различия при Грам (+) и Грам (–) бактерии поставят под въпрос биоцидната активност на антибактериалните агенти срещу различните инфекциозни агенти. Целта на настоящото изследване беше да се оцени биоцидната активност на различни дезинфектанти и антисептици от търговската мрежа. Като тестови организми бяха използвани референтен щам *Escherichia coli* и лабораторен изолат на *Staphylococcus aureus*. Анализът беше проведен, използвайки метода на дифузия в агар чрез ямки. Нашите резултати показаха, че натриевият хипохлорит (NaClO), водородният пероксид (H₂O₂) и почистващата вода за устата изразяват силен бактерициден ефект срещу Грам (+) и Грам (–) бактерии. Почистващият гел-препарат за бани, за който се смята, че е активен предимно срещу *Escherichia coli*, проявява активност само към *Staphylococcus aureus*. Почистващият гел-препарат за съдове, етакридин лактатът, сребърната вода и лавандуловата вода проявяват интермедиерен или никакъв ефект срещу *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

Ключови думи: дезинфектант, антисептик, антибактериално действие, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

Abstract: Disinfectants and antiseptics are substances or solvents which play a key role in the control of infections. Their wide functionality is applied in almost all human activities. These agents can have antiviral, antibacterial and antifungal effects. Disinfectants are synthetic agents the biocidal effect of which destroys microorganisms in the environment, while antiseptics are applied locally, primarily on skin and/or mucosae. The morphological differences between Gram (+) and Gram (-) bacteria raise questions regarding the biocidal effects of antibacterial agents against different types of infectious agents. The aim of our study is to evaluate the biocidal effect of disinfectants and antiseptics available on the market. The study uses a reference strain of *Escherichia coli* and a laboratory isolate of *Staphylococcus aureus*. The analysis was conducted using the agar well diffusion method. Results show that sodium hypochlorite, hydrogen peroxide H_2O_2 and mouthwashing water demonstrate strong bactericidal effect on both Gram (+) and Gram (-) bacteria. The bath cleaner gel, which is considered effective against *Escherichia coli*, demonstrated effectiveness against *Staphylococcus aureus* instead. The dishwashing gel, ethacridine lactate, silver water and lavandula water show intermediate or zero effect against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

Keywords: disinfectant, antiseptic, antibacterial activity, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*

Въведение

Дезинфектантите и антисептиците са химически вещества, играещи изключително важна роля в контрола на инфекциите, с широко промишлено, медицинско и битово приложение. Терминът „биоцид“ е обединяващ антибактериалното действие на тези синтетични вещества понятие [Russell, 2002]. По своята функционална същност тези химични субстанции атакуват и инактивират бактериите, проявявайки токсично действие върху техните клетки. Най-често механизмите включват: нарушаване на бактериалната клетъчна хомеостаза, лизис, последван от изтичането на вътрешното съдържимо на клетката, инхибиране на каталитичната функция на бактериалните ензими, нарушаване на електронния транспорт и окислителните процеси, отрицателното взаимодействие с макромолекулите и биосинтетичните процеси на бактериите [McDonnell and Russell, 1999]. До 40^{-те} години на XX век и откриването на първия антибиотик от Александър Флеминг – пеницилина, през 1928 г., адекватно лечение за справяне с бактериалните инфекции не е съществувало. Тогава антисептиците и дезинфектантите са били единствените биоциди, използвани с различни цели, като най-значимите от тях са фенолите (карболова киселина), живаченият хлорид, хлорът, хипохлоритите и йодът [Russell, 2002]. Влиянието на глобализацията и в условията на коронавирусна пандемия опасенията, свързани с потенциалната заплаха от замърсявания с микробиологичен характер, нарастват. Повишеният риск от разрастващи се инфекции в пространствата за обществено хранене също доведоха до увеличена употреба на антисептици и дезинфектанти от широката общественост [McDonnell and Russell, 1999]. Именно затова е постигнат значителен напредък в разработването и разбирането на механизмите на антибактериалното действие на тези химически вещества [McDonnell and Russell, 1999].

Могат да се разграничат два основни ефекта на дезинфектантите и антисептиците върху бактериалната клетка, а именно: бактериостатичен – ефект, при който развитието на бактериите се задържа и те продължават да са жизнеспособни. Когато се отстрани съответното химично вещество, микроорганизмите продължават развитието си. Бактерицидният ефект, от друга страна, предизвиква необратима промяна в микробната клетка и води до нейната смърт [Pankey et al., 2004 and McDonnell and Russell, 1999]. В

лабораторни условия *in vitro*, за да бъде определено дали дадено химично съединение притежава бактериостатичен или бактерициден ефект, се взимат под внимание четири водещи фактора, базирани на характеристики на бактериалната култура. Към тези фактори спадат присъствието на повърхностни структури, придаващи устойчивост на микроорганизма – бактериална капсула, нейният химичен състав и способността на клетката да я образува [Singh et al., 2019], способността на бактериите да образуват спори, което от своя страна би превърнало микроорганизмите в изключително толерантни към разнообразни стресови условия като топлина, химични съединения и тежки физични условия, за разлика от вегетативните бактериални клетки [Wohlgemuth and Kämpfer, 2014]. Следващият определящ фактор е диференциращият състав на клетъчната стена на микроорганизма, определящ ги като Грам (+) или Грам (–) бактерии. Поради своята отличителна морфологична структура, Грам (–) бактерии са по-устойчиви от Грам (+) бактерии и именно затова причиняват значително по-висока заболяемост и смъртност в световен мащаб [Breijyeh et al., 2020]. Друг фактор са условията на растеж на изследвания микроорганизъм – например температурата. При повишаване на температурата в определени граници се засилва токсичното действие на биоцидите. Влияние оказва и водородният показател (pH), спрямо който бактериите се разделят на три групи – неутрофили (от 6.8 до 7.2), алкалофили (>7.5) и ацидофили (<2,0). Важни фактори са и количеството бактерии и продължителността на експеримента [Pankey et al., 2004]. По отношение на характеристиките на биоцидите тяхното действие се определя от химичната им природа, тяхната концентрация, наличието на друг химичен фактор, възможен синергизъм или антагонизъм между две или повече химични вещества.

По своята етиология дезинфектантите и антисептиците се различават по една основна разлика, криеща се в тяхното приложение. Антисептиците се използват за унищожаване на бактериалните клетки върху кожа и лигавици, като тяхната цел е да заличи или задържи развитието на бактериалните клетки при запазване на тъканите [McDonnell and Russell, 1999]. Дезинфектантите се използват за унищожаване на микроорганизмите в околната среда. В исторически план дезинфекцията на околната среда е най-старата и все още широко развиваща се област [Galabov, 2007]. Именно затова част от дезинфектантите проявяват споростатично и спороцидно действие [McDonnell and Russell, 1999 and Russell, 1990].

Бактериалният вид *E. coli* е Грам (–) микроорганизъм, който принадлежи към космополитното семейство *Enterobacteriaceae*. Това е микроорганизъм, чиито екологични взаимодействия и съжителства проявяват изключително голям обхват. Видът често бива наблюдаван като типичен комменсал или бактерия – част от нормалната микрофлора, обитаваща човешкия храносмилателен тракт. Колонизацията на човешкото тяло от микроорганизма се осъществява постнатално [Proença et al., 2017]. От друга страна, неговото наличие би било етиологичната причина за развитието на множество и различни бактериални инфекции на пикочните пътища, холецистити, апендисити, перитонити, следоперативни инфекции и сепсиси и неонатален менингит. [Proença et al., 2017 and Zou et al. 2014]. Чревните инфекции се предизвикват от различни щамове *E. coli*. – напр., *diarrhoeic E. coli* [Zou et al., 2014]. Бактериалното замърсяване може да настъпи във всеки един етап от достигането на хранителните продукти от производствените предприятия до общественото потребление. Най-често контаминацията на храната с *E. coli* възниква по време на производството, преработката или разпространението на отделните партии [Yang et al., 2017]. В основата на бактериалните инфекции с *E. coli* стоят месните

продукти, които се явяват и основните резервоари на резистентни на антимикробни препарати инфекции, причинени от същия микроорганизъм.

Видът *Staphylococcus aureus* принадлежи към бактериалното семейство *Staphylococcaceae*. Този микроорганизъм е Грам (+) факултативен анаероб, типичен представител на човешката микрофлора по кожата и лигавиците [Taylor, 2020]. Въпреки това той е един от най-значимите човешки патогени, чийто проявления притежават разнообразие от клинични прояви, вариращи от леки кожни инфекции като импетиго до тежки заболявания като ендокардит, пневмония, сепсис, синдром на токсичен шок, остеомиелит и синдром на попарената кожа [Taylor, 2020; Otto, 2015 and Pietrocola et al., 2017]. Този инфекциозен причинител е известен със способността си да предизвиква антропонозни инфекции, които могат да бъдат придобити както на обществени места, така в болнични условия [Pietrocola et al., 2017]. Характерно за *S. aureus* е секрецията на множество и разнообразни ензими и токсини, които обуславят неговата вирулентност. Тези метаболити играят ключова роля в патогенезата и взаимодействат директно с гостоприемника [Otto, 2015].

Целта на настоящото изследване е изучаване на антибактериалното действие на дезинфектанти и антисептици, закупени от търговската мрежа, срещу Грам (-) *Escherichia coli* и Грам (+) *Staphylococcus aureus*.

Този експеримент се опитва да покаже чувствителността и устойчивостта на микроорганизмите към използваните в обществения бит дезинфектанти и антисептици.

1. Материали и методи

Като тестови микроорганизми бяха използвани референтният щам *Escherichia coli* N1BМСС 8751 (Грам (-) и *Staphylococcus aureus* (Грам (+), лабораторен изолат. Бактериалите култури бяха култивирани за 24 часа. Върху бактериалните култури бяха селектирани и приложени едни от най-често използваните от българското население биоциди: белина, почистващ гел-препарат за бани (от търговската мрежа), измиващ гел-препарат за съдове (от търговската мрежа), кислородна вода (H₂O₂), етакридин лактат, сребърна вода, почистваща вода за уста (от търговската мрежа) и лавандулова вода. Микроорганизмите бяха инокулирани при концентрация 0.5 по McFarland. Чувствителността на микроорганизмите към приложените биоциди беше изследвана посредством метода дифузия в агар, като пробите бяха нанасяни в стерилно изрязани ямки.

1.1. Бактериални култури: В настоящото проучване бяха използвани два 24-часови тест-микроорганизми (*Escherichia coli* N1BМСС 8751 и лабораторен изолат *Staphylococcus aureus*), любезно предоставени от колекцията на Нов български университет, УПИЗ по Биология. Бактериалната концентрация, с която бяха инокулирани петритата 0,5 x 10⁶ cfu/ml McFarland Standard.

1.2. Определяне на биоцидна активност: Влиянието на дезинфектантите и антисептиците срещу Грам (-) и Грам (+) микроорганизми беше изучено посредством метода ямки в агар. Предварително разлятите с месопептонен агар петрита (HiMedia, India) се инокулират със 100µl 24-часови тест-микроорганизми *E.coli* и *S. aureus*. Непосредствено след инокулацията в агара на всяко от петритата бяха изрязани по 5 ямки с помощта на стерилно синьо типче. За всеки отделен вид дезинфектант се накапваха по две ямки в

петритата с двата тест-микроорганизма, а в централната ямка беше накапвана стерилна вода за контрола. За да се улесни дифузията на активната субстанция в агара, пробите бяха поставяни за два часа в хладилник при 4°C. Впоследствие петритата бяха инкубирани в термостат при 37°C за 24 часа. Отчитането се извърши на 24-ия час чрез измерване в мм на диаметъра на зоните без растеж около ямките, със съответния дезинфектант или антисептик. Ямките, съдържащи антисептик или дезинфектант, около които не се формира инхибираща зона бяха отчитани като отрицателен резултат, а бактериалният вид - за резистентен.

1.3. Използвани биоциди

1.3.1. Дезинфектанти

Бяха използвани три дезинфектанта: белина – разтвор на $\leq 5\%$ NaClO, почистващ гел-препарат за бани (от търговската мрежа) и измиващ гел-препарат за съдове (от търговската мрежа).

Белина (NaClO)

Белината е силен и ефективен дезинфектант. Биоцидната функционалност на това вещество се основава на нейната активна съставка – натриев хипохлорит (NaClO). Това вещество проявява изключителни дезинфекциращи свойства при унищожаването на бактерии, микроскопични гъбички и вируси, но въпреки това лесно се инактивира от органична материя [WHO, 2014]. За химичните разтвори на натриевия хипохлорит е характерна широка приложимост за дезинфекция на твърди повърхности (домакинска белина), като същевременно могат да се използват и при дезинфекция на инфектирана кръв [McDonnell and Russell, 1999].

Почистващ гел-препарат за бани със сложен състав (от търговската мрежа)

По своята химическа същност почистващите препарати притежават изключително силна дезинфекцираща активност поради множеството активни съставки, които съдържат. Гелът, който беше използван в това изследване съдържа: кватернерни (четвъртични) амониеви съединения като бензил C12-16 алкил диметиламмониев хлорид (N-Alkyl-N-benzyl-N,N-dimethylammonium chloride); фосфорна киселина (H_3PO_4), амфотерни повърхностно активни вещества (ПАВ); нейногенни ПАВ; натриева основа (NaOH), ароматизатор. Изброените химични съединения са често срещани съставни елементи на почистващите препарати.

Измиващ гел-препарат за съдове със сложен състав (от търговската мрежа)

Подобно на почистващия препарат за бани, и измиващият препарат за съдове притежава сложен състав: анионни ПАВ, амфотерни ПАВ, ароматизатор: $C_{15}H_{20}O$ (2-Benzylideneoostanal), консервант C_6H_5COONa (натриев бензоат). Тези химични съединения стоят в основата на биоцидната активност на субстанцията.

1.3.2 Антисептици

Антисептиците, които бяха приложени при изготвянето на експерименталното проучване, включват: кислородна вода (H_2O_2), етакридин лактат, сребърна вода, почистваща вода за уста със сложен състав (от търговската мрежа) и лавандулова вода.

Кислородна вода (от търговската мрежа) (H₂O₂)

Водородният пероксид (H₂O₂) е биоцид, който се използва широко от населението за дезинфекция, стерилизация и антисептика. Поради своята химична структура пероксидите са източник на активен (атомен) кислород. Известно е, че пероксидът проявява по-силна биоцидна активност срещу Грам (+), отколкото към Грам (-) бактерии. Освен това присъствието на активни ензимни защити в бактериалната клетка, като каталаза или други пероксидази, играе важна роля при повишаването на толерантността на тези микроорганизми при наличие на по-ниски концентрации H₂O₂ и възстановяването на наличните лезии в клетъчния геном [McDonnell and Russell, 1999 and Samoilenko et al. 1983]. Именно затова по-високата чувствителност на анаеробните микроорганизми към водороден пероксид се обуславя от невъзможността на бактериите да синтезират ензима каталаза, който неутрализира пероксида.

Етакридин лактат (от търговската мрежа)

Етакридин лактатът (2-етокси-6,9-диаминоакридин монолактат монохидрат) познат също като риванол, е намерил своето място като силен биоциден агент още от пеницилиновата ера, проявявайки активността си при различни тестове с антигени [Jain and Surana, 2011]. По своята химична същност той е органично съединение – част от групата на акридиновите багрила [Ziętek et al., 2020].

Сребърна вода (от търговската мрежа)

От хиляди години среброто (Ag) се използва като антимикробно средство [Rodriguez et al. 2007]. Доказано е, че този метал е биологично активен, когато се намира във фино дисперсно или йонно състояние (Ag⁺), включително когато е разтворен във водна среда.

Почистваща вода за уста със сложен състав (от търговската мрежа – концентрат)

Почистващата вода за уста е концентрат на основата на растителен екстракт, притежаващ силна биоцидна активност. Съдържа: вода (H₂O), екстракт от смрадлика, алкохол (C₂H₅OH), алуминиев хлорид (AlCl₃), калциев хлорид (CaCl₂), ментол (C₁₀H₂₀O), (2S)-(2-пропил)-(5R)-метил-(1R)-циклохексанол; захарин: C₇H₅NO₃S, 1H-1λ⁶,2-Benzothiazole-1,1,3(2H)-trione.

Лавандулова вода (от търговската мрежа)

Активната субстанция в лавандуловата вода е извлеченото от лавандуловия цвят етерично масло. Съдържание на етеричното масло: 0,08% - 0,12%.

2. Резултати

Резултатите от получените проби бяха интерпретирани посредством измерване диаметъра на зоните без растеж около ямките със съответните биоциди. Съединенията, които проявиха изразена антибактериална активност, образуваха прозрачна зона без растеж около инокулираните с тях ямки. Резултатите от експеримента са показани в Таблица 1. От представените данни става ясно, че някои от използваните дезинфектанти проявяват по-силен биоциден ефект към Грам (+) бактерии от вида *Staphylococcus aureus*, отколкото към Грам (-) *Escherichia coli* (Табл.2).

От таблицата се вижда, че едновременно бактерицидно действие както към Грам (+), така и срещу Грам (-) бактерии имат белината, кислородната вода и почистващата вода за уста. С бактерициден ефект само към Грам (+) бактерии е почистващият гел-препарат за бани.

Таблица 1. Индикатори ефект на чувствителност

Диаметър на зоната	Индикатор ефект на чувствителност
$d \leq 12 \text{ mm}$	резистентен бактериален ефект (R)
$d \leq 12- 30 \text{ mm}$	интермедиерен бактериален ефект (I)
$d \geq 30\text{mm}$	чувствителност на бактериите (S)

Таблица 2. Антибактериална активност на приложените биоциди

Дезинфектанти			
№	Биоцид	Инхибираща зона d при <i>Escherichia coli</i> NIBMCC 8751	Инхибираща зона d при <i>Staphylococcus aureus</i> (лаб. изолат)
1.	Белина	31 mm (S)	36 mm (S)
2.	Почистващ гел-препарат за бани	0 mm (R)	33 mm (S)
3.	Измиващ гел-препарат за съдове	24 mm (I)	15 mm (I)
Антисептици			
№	Биоцид	Инхибираща зона d при <i>Escherichia coli</i> NIBMCC 8751	Инхибираща зона d при <i>Staphylococcus aureus</i> (лабораторен изолат)
1.	Кислородна вода	35 mm (S)	36 mm (S)
2.	Етакридин лактат	21 mm (I)	0 mm (R)
3.	Сребърна вода	0 mm (R)	0 mm (R)
4.	Почистваща вода за уста	31 mm (S)	35 mm (S)
5.	Лавандулова вода	13 mm (R)	0 mm (R)

От таблицата се вижда, че почистващият гел-препарат за съдове, етакридин лактатът, сребърната вода и лавандуловата вода проявяват интермедиерен или никакъв ефект срещу *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

3. Дискусия

Задълбочените познания в областта на дезинфекцията и антисептиката са ключов компонент в контрола и овладяването на бактериалните инфекции. Биоцидите, които използвахме за целите на това проучване, бяха закупени от търговската мрежа. С това изследване си поставихме за цел да оценим ефективността на едни от най-често срещаните биоциди в нашето ежедневие. Настоящият експеримент разкри, че част от използваните дезинфектанти проявяват по-силен биоциден ефект към Грам (+) бактерии от вида *S. aureus*, отколкото към Грам (-) *E.coli*.

Силната антибактериална способност на белината се основава на нейната активна съставка – натриевият хипохлорит (NaClO). Натриевият хипохлорит е хлор-освобождаващ агент, който притежава изключително силна оксидативна активност. Тя стои в основата на нарушаването на бактериалната вътреклетъчна хомеостаза чрез увреждане на клетъчната активност на протеините [Ascenzi, 1996]. За да се осъществи максималното действие на биоцида, рН-то в средата трябва да бъде ниско. Известно е, че хлор-освобождаващите агенти проявяват много силен увреждащ ефект върху бактериалната ДНК и участват в сформирването на производни на хлора нуклеотидни основи. Най-често те индуцират разкъсвания в едноверижните ДНК молекули и намаляват вътреклетъчната активност на ендонуклеазите [Shih and Lederberg, 1976, McDonnell and Russell, 1999]. Ето защо, бактериалната ДНК е прицелната точка на чувствителност към натриев хипохлорит.

Доказано е, че при наличие на високи концентрации на хлор-освобождаващи вещества и оптимални нива на рН, биоцидът притежава и спороцидна активност [McDonnell and Russell, 1999]. Антимикробното действие на препарата се изразява в лизис на бактериалната клетка, а спорите изгубват белтъчната си обвивка, което е предпоставка за тяхното загиване. Също така редица проучвания [McDonnell and Russell, 1999] показват, че третираните с хлор-освобождаващи агенти спори показват повишена пропускливост на споровата обвивка. Предполага се, че спороцидното действие на тези химични вещества е тясно свързано с разпадането на споровата обвивка, последвана от кортекса.

Нашата експериментална работа показва, че и двата 24-часови тестови микроорганизма *E.coli* (Грам (-) и *S. aureus* (Грам (+)) проявяват изразена чувствителност към биоцидната активност на това вещество. След отчитане на резултатите при аналогично проучване от колеги Sayed et al., 2020 оценяващо антимикробната активност на множество субстанции е наблюдавано, че при третиране на експериментални микроорганизми, сред които *E. coli* и *S. aureus* с натриев хипохлоритен и хлорхексидинов гел, най-големи зони на инхибиране на бактериалния растеж са били измерени именно при тези две субстанции [Sayed et al., 2020]. Съответствието между нашите и техните резултати доказва, че независимо от физичното състояние, под което се предлага (течност или гел), NaClO проявява силна оксидативна активност срещу микроорганизмите.

Анализът на резултата, получен след третирането на двата тестови микроорганизма с почистващия гел-препарат за бани със сложен състав, показва, че при тази субстанция не се наблюдава активност срещу Грам (-) *E. coli*, докато Грам (+) *S. aureus* се повлияват.

След третирането на бактериите с измиващия гел-препарат за съдове със сложен състав микроорганизмите проявиха доста изразен интермедиерен ефект. Този резултат ние определихме като отрицателен. Възможно е бактериите да са се повлияли от концентрацията на химичния комплекс в *in vitro* условия, което не би могло да се гарантира в практиката или бита.

Кислородната вода е разтвор на водороден пероксид (H_2O_2) и дестилирана вода (dH_2O). H_2O_2 е естествено съдържащ се химичен компонент на пчелния мед и млякото, който от своя страна ги предпазва от разваляне, но също така е метаболит, който се генерира и в човешките тъкани благодарение на клетъчния метаболизъм. Именно посредством индуцирането му в човешкия организъм се създава антибактериална защита от инвазивните микроорганизми [Block, 2001]. В търговската мрежа водородният пероксид се предлага под формата на бистра, безцветна течност, която може да бъде намерена в различни концентрации, вариращи от 3 до 90 % [McDonnell and Russell, 1999]. Биоцидната активност на пероксида се влияе от рН в пъти по-малко, отколкото много други

дезинфектанти като органични киселини и феноли [Block, 2001]. По своята същност кислородната вода е стабилен разтвор, но въпреки това повечето продукти съдържат стабилизатори за предотвратяване на разлагането ѝ до вода (H_2O) и кислород (O_2). H_2O_2 притежава изключително широкоспектърно действие срещу вируси, бактерии, бактериални спори и дрожди [McDonnell and Russell, 1999; Block, 2001 and Linley et al., 2010]. Известно е, че водородният пероксид притежава по-висока оксидативна способност от хлора и хлорния диоксид. Механизмът, по който се проявява дезинфекциращата му активност, се основава на освобождаването на свободни окси-радикали (СОР), които водят до геномни увреждания в бактериалните клетки [Totaro et al., 2020]. В основата на биоцидната активност на това вещество е генерирането на свободни хидрокси радикали ($\cdot OH$), които притежават способността да окисляват тиоловите групи на протеините, вкл. ензимите [McDonnell and Russell, 1999]. Най-често се наблюдават нарушения в структурата и пропускливостта на клетъчната стена, цитоплазматичната мембрана, както и индуцирането на рибозомни увреждания и разкъсвания на бактериална ДНК [Samoilenko et al. 1983]. Спороцидна активност се наблюдава при две условия: по-високи концентрации (10 до 30 %) в съчетание с по-продължителен контакт на веществото с бактериалните клетки или чрез преминаването на пероксида в газова фаза [McDonnell and Russell, 1999]. Въпреки това, действието на химичното вещество невинаги успява да покаже висока биоцидна активност. При разтвор (3% - 6 %) водородният пероксид показва много нисък вирусциден ефект спрямо ентеровирусни вириони (1 минутна обработка в повърхностния тест спрямо полиовирус тип 1 суха суспензия) или липса на ефект (1 мин тест за суспензия) [Galabov, 2007]. Подобни резултати биха могли да се наблюдават и при третиране на бактерии. Известно е, че пероксидът проявява по-силна биоцидна активност срещу Грам (+), отколкото към Грам (-) бактерии. Освен това присъствието на активни ензимни защити в бактериалната клетка, като каталаза или други пероксидази, играе важна роля при повишаването на толерантността на тези микроорганизми при наличие на пониски концентрации H_2O_2 и възстановяването на наличните повреди в клетъчния геном [McDonnell and Russell, 1999 and Samoilenko et al., 1983]. Именно затова по-високата чувствителност на анаеробните микроорганизми към водороден пероксид се обуславя от невъзможността на бактериите да синтезират ензима каталаза, който неутрализира пероксида.

В настоящото проучване успяхме да покажем антибактериалната ефективност на H_2O_2 . В пробите и при двата тест-микроорганизма бе отчетена чувствителност на бактериите. В аналогични проучвания, Al-Talib et al., 2019 установяват, че бактерии, принадлежащи към семейството *Enterobacteriaceae*, включително и Грам (-) *E. coli*, се повлияват чувствително от кислородната вода (H_2O_2). В същия научен труд е доказана и чувствителността на метицилин-резистентната Грам (+) бактерия *S. aureus* [Al-Talib et al., 2019]. Тези и други *in vitro* експерименти доказват антисептичните качества на този продукт.

В хуманната и ветеринарна медицина етакридин лактатът се използва под формата на 0,1 % водни разтвори за локално приложение. Биоцид се прилага при третирането на кожни и гнойни инфекции, рани и трудно зарастващи наранявания и възпалени лигавици. Показано е съединението да се предписва при лечение на генитални възпаления, орални инфекции, ожулвания на кожата, изгаряния и язви. Други литературни данни показват ефективността на етакридин лактата при лечение на диария и някои паразитни (протозойни) заболявания [Ziętek et al., 2020]. Известно е, че това органично съединение

проявява много силна ефективност срещу множество Грам (+) и някои Грам (-) бактерии, но едновременно с това спектърът му на действие обхваща и гъбички [Petrikaite et al., 2007]. Механизмът на действие на етакридин лактата е инхибиране на микробния синтез на протеини, което от своя страна се дължи на свързването му с бактериалната ДНК, инхибирайки способността на клетката да синтезира ДНК и РНК. Доказано е, че структурата на трицикличния етакридин действа като интерлокалатор, включвайки се между базовите двойки в бактериалната нуклеинова киселина. Това от своя страна довежда до промяна в рамката на четене, нарушение в правилното протичане на транскрипцията, което води до допълнителни промени в синтеза на протеините и последваща смърт на бактериите [Ziętek et al., 2020].

Резултатите, които получихме с етакридин лактата спрямо двата тестови микрорганзима показаха, че при *in vitro* третиране на Грам (-) *E. coli* се наблюдава изразен интермедиерен бактериален ефект, докато Грам (+) *S. aureus* проявява устойчивост към антисептика. Junka et al., 2014 описват, че при използването на разнообразни микробиологични методики риванолът проявява отрицателен резултат спрямо Грам (+) коагулаза-отрицателни стафилококи, Грам (-) *Klebsiella pneumoniae* и срещу вътреболнични изолати на Грам (-) *Pseudomonas aeruginosa*. Биоцидното действие на риванола в голяма степен е доказано при Грам (-) бактерии и при някои видове Грам (+) микроорганизми, но едновременно с това спектърът на действие се простира и срещу гъбички [Petrikaite et al., 2007]. Въпреки това, тази невысока активност на етакридин лактата при *in vitro* условия е пречка за установяването му като широкоспектърен антисептик.

Доказано е, че среброто е биологично активно, когато се намира във фино дисперсно или йонно състояние (Ag^+), също когато е разтворено във водна среда (сребърна вода) [Sim et al., 2018] въпреки много слабата си разтворимост. Тази форма на среброто се използва за създаването на йонни сребърни съединения, като сребърен нитрат и сребърен сулфадиазин, които често намират приложение в лечението на рани [Sim et al., 2018]. Към момента са известни три механизма на действие на среброто върху микроорганизмите. Първият механизъм се обуславя от способността на сребърните катиони да пробиват бактериалната клетъчна стена чрез взаимодействие с пептидогликанния слой. Второто действие на сребърните йони се свързва със склонността им да навлизат в бактериалната клетка, посредством инхибирането на клетъчното дишане, последвано от нарушения в метаболитните пътища, а това води до генериране на реактивни кислородни видове (ROS). Последният, трети механизъм, доказващ биоцидното действие на сребърните катиони, се основава на нарушения, възникващи в репликационния цикъл на бактериалните клетки, предшествани от нарушения в микроорганизмовата ДНК молекула [Sim et al., 2018]. Антибактериалното действие на сребърните йони е тясно свързано с взаимодействието им с тиоловите (сулфхидрилни) групи, което не изключва останалите прицелни мишени [Jung et al., 2008]. Доказано е, че аминокиселините, като цистеин и други съединения, съдържащи тиолови групи като натриев тиогликолат, инхибират действието на среброто срещу бактериите. Също така е известно, че сяра съдържащите аминокиселини, сяра несъдържащите аминокиселини и съдържащите сяра съединения, като цистатион, цистеинова киселина, l-метионин, таурин, натриев бисулфат и натриев тиосулфат, не са в състояние да инактивират сребърните йони. Тези и други научни трудове доказват, че в основата на биоцидното действие на среброто е взаимодействието на сребърните йони с тиоловите групи (-SH) в протеините, вкл. ензимите на бактериите.

Въпреки това е известно, че в тези процеси могат да участват и други клетъчни компоненти, напр., водородните връзки [Jung et al., 2008]. В допълнение към ефекта си върху бактериалните ензими, сребърните йони проявяват силна инхибираща способност върху бактериалния растеж, като впоследствие се отлагат в клетъчните вакуоли или в гранули, прикрепени за клетъчната стена. Освен това, сребърните йони притежават способността да нарушават клетъчното делене и да увреждат клетъчната обвивка и вътрешното съдържимо на бактериите [Jung et al., 2008]. Доказано е, че среброто нарушава множество интрацелуларни процеси в микроорганизма, включително образуването на дисулфидни връзки, цялостния метаболизъм и хомеостазата на желязо [Ramirez et al., 2013]. Експериментални постановки, базирани на трансмисионната електронна микроскопия, онагледяват значителни промени в мембраните на бактериалните клетки след третиране със сребърни йони, което може да е причината или последицата от клетъчната смърт [Jung et al., 2008].

Множество изследвания доказват резистентността на някои бактериални видове към среброто. Устойчивостта към сребърните съединения е определена от бактериалните плазмиди и гени, а това е доказано посредством методите на молекулярната генетика [Silver, 2003]. Условието за разграничаване на чувствителните и резистентните към среброто микроорганизми не са добре известни и дори съществуването на подобен феномен се оспорва, особено наличието на устойчиви към сребро бактерии, които причиняват клиничен проблем [Silver, 2003].

Анализът, който направихме след отчитане на резултатите за сребърната вода с двата тестови микроорганизма, показва общ резистентен бактериален ефект. В друг научен труд [Muller, 2018] се описва, че понастоящем резистентността на бактериите към среброто се разглежда най-вече в контекста на лабораторните изследвания, проведени върху изолирани отделни микроорганизмови видове, докато при клинични условия, т.е. при хронични рани, микроорганизмите съществуват предимно в рамките на полимикробни съобщества. В същото проучване авторите предполагат, че тъй като устойчивостта към сребро може лесно да бъде постигната без непременно да настъпват мутации в бактериалната клетка или трансфер на генетичен материал между отделните видове, потенциалът за оцеляване на чувствителните към сребро микроорганизми в богата на сребро среда вероятно ще бъде срещан далеч по-често, отколкото се смята в момента. Според авторите, една от причините за все по-често наблюдаваната резистентност към иначе чувствителните на метала бактерии е способността на микроорганизмите да използват катиона като краен електронен акцептор, комбинирайки извънклетъчния редокс токсин пиоцианин като електронен преносител, което позволява намаляване на концентрацията на Ag^+ до Ag^0 в извънклетъчната среда [Muller, 2018].

Почистваща вода за уста със сложен състав (от търговската мрежа) е концентрат на основата на растителен екстракт от смрадлика. Етеричните масла се синтезират от различни части на ароматните растения като вторични метаболити с летлив характер [Swamy et al., 2016 and Liaqat et al., 2018]. Етеричните масла имат голям потенциал в областта на биомедицината, тъй като ефективно проявяват антибактериалната си способност към отделни бактериални видове, гъбички и вируси. Наличието на разнообразни химични вещества като алдехиди, феноли, терпени и други антимикробни съединения обуславя антимикробната функционалност на маслата към различни патогени [Swamy et al., 2016]. В друг научен труд – на Nazzaro et al., 2013 се описва, че механизмът на действие на етеричните масла не е строго определен, а по-скоро се определя като една

каскада от реакции, протичаща в бактериалната клетка. Принципният модел на действие на тези метаболити е инхибирането на бактериалния растеж и производството на токсични бактериални метаболити. Авторите споделят, че голяма част от етеричните масла имат посилен ефект срещу Грам (+) бактерии, отколкото Грам (-), и че вероятно този ефект се дължи на разликите в състава на клетъчната им стена [Nazzaro et al., 2013]. Резултатите, които получихме в нашата лаборатория напълно подкрепят тези твърдения.

Лавандулата принадлежи към семейството *Lamiaceae*, вид известен с широкоспектърни терапевтични свойства и биологична активност, като напр., антиконвулсна, анксиолитична, антиоксидантна, противовъзпалителна и антимикробна [Cardia et al., 2018]. Доказано е също, че лавандуловите етерични масла притежават благоприятен имуномодулиращ ефект върху зарастването на рани [Kwiatkowski et al. 2020]. Етеричното масло от лавандула е един от най-популярните фитопродукти, които могат да бъдат извлечени от няколко растителни вида лавандула. Има четири основни вида лавандула: *Lavandula latifolia*, *Lavandula angustifolia*, *Lavandula stoechas* и *Lavandula x intermedia* (стерилно кръстосване между *L. latifolia* и *L. angustifolia*). Видът *Lavandula angustifoliae* е най-широко култивируваният вид, който е общопризнат като търговска лавандула [Hossain, 2017]. Основните съставни елементи на растението са линалол, линалилацетат, 1,8-цинеол β -оцимен, терпинен-4-ол и камфор, като същевременно относителното ниво на всеки един от фитохимикалите варира при различните видове [Koulivand et al., 2013]. Лавандуловите етерични масла се получават след дестилация на пресни или изсушени връхчета на цъфтящи растения посредством водна пара. Съдържанието на отделните компоненти е: R-енантиомери на линалол (20–45%) и линалилацетат (25 до 46%). Високото наличие на тези съставки определя качеството на маслото. Относителното съдържание на останалите съставки трябва да бъде в следните граници: лимонен (> 1,0%), евкалиптол (<2,5%), камфор (> 1,2%), терпин-4-ол (0,1–6,0%), лавандулол (<0,1%), лавандулилацетат (<0,2%) и α -терпинеол (> 2,0%) [Wińska et al., 2019]. Лавандуловото масло не трябва да съдържа твърде много оцимен, цинеол, камфор или терпин-4-ол, защото високата им концентрация повлиява негативно неговия аромат. Линалоолът и линалилацетат са доказани като силни биоцидни агенти срещу бактерии като *E. coli* и *E. cloacae*. Също така е доказано, че съединенията като лимонен, α -пинен и β -пинен имат антибактериална активност срещу различни човешки патогенни бактерии. *In vitro* експерименти установяват благоприятен ефект на лавандуловите етерични масла срещу метицилин-резистентния *S. aureus* и резистентния към ванкомицин *E. faecium* [Hossain, 2017 and Wińska et al., 2019]. Точният начин на действие на фитохимикалите все още не е напълно изяснен. Предполага се, че биоцидното действие се обуславя от влиянието на маслата върху ултраструктурата на бактериалната стена, което води до промяна в чувствителността на същинските бактериални клетки [Kwiatkowski et al., 2020].

От научно проучване на Kwiatkowski et al. 2020 става ясно, че лавандуловите фитохимикали дължат своята активност главно на линалола и линалилацета, но в същинската си част експериментът показва, че тези съединения в по-ниски количества са важни за създаването на уникална смес с изразена синергия [Kwiatkowski et al., 2020]. В настоящото проучване показахме, че и двата тестови микроорганизма проявяват устойчивост към лавандуловата вода. Резистентността на бактериите би могла да се обясни с ниското количество на етерични масла в суспензията. Друг научен труд – на Roller et al., 2009 сравнява антимикробната ефикасност на четири лавандулови масла, използвани поотделно и в комбинация, върху метицилин-чувствителни и метицилин-

резистентни бактерии от вида *Staphylococcus aureus* (MSSA и MRSA). Експериментът им се основава на дисково-дифузен метод, който от своя страна позволява осъществяването на директен контакт между микроорганизмите и маслата. В резултат на тяхната лабораторна работа *in vitro* авторите споделят, че четирите лавандулови масла инхибирали растежа, както на MSSA, така и на MRSA чрез директен контакт, но не и в газовата фаза [Roller et al., 2009]. Вследствие на тези данни ние предполагаме, че различията в биоцидна активност на лавандуловата вода и етеричните масла се основава именно в това, че лавандуловата вода е дестилат и процентното количествено съдържание на активните съединения е значително по-ниско. Това предположение от своя страна би могло да обясни ефекта на резистентност, който наблюдавахме и при двата тестови микроорганизми (Грам (–) *Escherichia coli* и Грам (+) *Staphylococcus aureus*).

Заклучение

Резултатите от настоящото проучване показват, че част от използваните дезинфектанти проявяват по-силен биоциден ефект към Грам (+) бактерии от вида *Staphylococcus aureus*, отколкото към Грам (–) *Escherichia coli*. Натриевият хипохлорит, водородният пероксид и почистващата вода за уста изразяват силен бактерициден ефект срещу Грам (+) и Грам (–) бактерии. Почистващият гел-препарат за бани, за който се смята, че е активен предимно срещу *Escherichia coli*, проявява активност само към *Staphylococcus aureus*. Почистващият гел-препарат за съдове, етакридин лактатът, сребърната вода и лавандуловата вода проявяват интермедиерен или никакъв ефект срещу *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*. Изненадващо, бактерицидните свойства на почистващата вода за уста е съизмерима с тези на белината и кислородната вода.

Благодарности

Изследването е проведено в УПИЗ „Учебно-научна лаборатория по биология“ и подкрепено от Магистърски факултет, Нов български университет.

ЛИТЕРАТУРА

- Al-Talib H., A. Alkhateeb, A. Ruzuki, N. Zulkifli, Syakirah Hamizi, N. Muhammad and A. Karim., Effectiveness of commonly used antiseptics on bacteria causing nosocomial infections in tertiary hospital in Malaysia., *African Journal of Microbiology Research*, 2019, Volume 13(10), 188-194.
- Block S., *Disinfestation, Sterilization and Preservation* (5th ed), 2001.
- Bloomfield S. F., Chlorine and iodine formulations. In: Ascenzi J M, editor. *Handbook of disinfectants and antiseptics*, 1996, 133–158.
- Breijyeh Z., B. Jubeh and R. Karaman., Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It., *Molecules (Journal)*, 2020, 25(6), doi: 10.3390/molecules25061340.
- Cardia G., S. Silva-Filho, E. Silva, N. Uchida, H. Cavalcante, L. Cassarotti, V. Salvadego, R. Spironello, C. Bersani-Amado and R. Cuman., Effect of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Essential Oil on Acute Inflammatory Response., *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, doi: 10.1155/2018/1413940.

- El Sayed M., N. Ghanerad, F. Rahimi, M. Shabanpoor and Z. Shabanpour., Antibacterial Activity of Sodium Hypochlorite Gel versus Different Types of Root Canal Medicaments Using Agar Diffusion Test: An *In Vitro* Comparative Study., *International Journal of Dentistry*, 2020, doi: 10.1155/2020/6483026.
- Galabov A., Virucidal agents in the eve of manorapid synergy®, *GMS Krankenhhyg Interdiszip.* 2007; 2(1).
- Hossain S., H. Heo, B. De Silva, S. Wimalasena, H. Pathirana, and G. Joon., Antibacterial activity of essential oil from lavender (*Lavandula angustifolia*) against pet turtle-borne pathogenic bacteria., *Laboratory Animal Research*, 2017; 33(3), 195–201.
- Jain P. and S. J. Surana., Spectrophotometric determination of ethacridine lactate in infusion., *Pharmaceutical Methods (Journal)*, 2011, 189–192.
- Jung W., H. Koo, K. Kim, S. Shin, S. Kim and Y. Park., Antibacterial Activity and Mechanism of Action of the Silver Ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*., *Applied and Environmental Microbiology*, 2008; 74(7), 2171–2178.
- Junka A., M. Bartoszewicz, D. Smutnicka, A. Secewicz and P. Szymczyk., Efficacy of antiseptics containing povidone-iodine, octenidinedihydrochloride and ethacridine lactate against biofilmformed by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* measured with the novel biofilm-orientedantiseptics test., *International Wound Journal* 2014;11:730–734.
- Koulivand P., M. Ghadiri and A. Gorji., Lavender and the Nervous System., *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, doi: 10.1155/2013/681304.
- Kwiatkowski P., Ł. Łopusiewicz, M. Kostek, E. Drozłowska, A. Pruss, B. Wojciuk, M. Sienkiewicz, H. Zielińska-Bliźniewska and B. Dołęgowska., The Antibacterial Activity of Lavender Essential Oil Alone and In Combination with Octenidine Dihydrochloride against MRSA Strains, *Molecules (journal)*, 2020, Volume 25; 25(1): 95, doi: 10.3390/molecules25010095.
- Liaqat I., N. Riaz, QU. Saleem, H. Tahir, M. Arshad and N. Arshad., Toxicological Evaluation of Essential Oils from Some Plants of Rutaceae Family., *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.*, 2018, 1-7.
- Linley E., S. Denyer, G. McDonnell, C. Simons, J.Y Maillard., Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, Volume 67,1589–1596.
- McDonnell G., A. Russell., Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance, *Clin Microbiol Rev*, 1999; 12(1): 147–179.
- Morones-Ramirez J., J. Winkler, C. Spina, J. Collins., Silver enhances antibiotic activity against gram-negative bacteria, *Science Translational Medicine*, 2013, 19;5(190):190ra81, doi: 10.1126/scitranslmed.3006276.
- Muller M., Bacterial Silver Resistance Gained by Cooperative Interspecies Redox Behavior., *American Society for Microbiology Journals*, 2018. Volume 62, doi: 10.1128/AAC.00672-18.
- Nazzaro F., F. Fratianni, L. De Martino, R. Coppola and V. De Feo., Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria., *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013, 6(12), 1451–1474.
- Otto M., *Staphylococcus aureus* toxins., *Current Opinion in Microbiology*, 2015, 32-37.
- Pankey G., L. Sabath., Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections., *Clinical Infectious Diseases*, 2004, Volume 38, 864–870.

- Petrikaite V., E. Tarasevicius, A. Pavilonis., New ethacridine derivatives as the potential antifungal and antibacterial preparations, *Medicina (Kaunas, Lithuania) Journal*, 2007; 43(8), 657-663.
- Pietrocola G., G. Nobile, S. Rindi and P. Speziale., *Staphylococcus aureus* Manipulates Innate Immunity through Own and Host-Expressed Proteases., *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, doi: 10.3389/fcimb.2017.00166.
- Proença J., D. Barral and I. Gordo., Commensal-to-pathogen transition: One-single transposon insertion results in two pathoadaptive traits in *Escherichia coli* - macrophage interaction., *Scientific Reports*, 2017, Volume 7, <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-04081-1>>
- Roller S., N. Ernest, J. Buckle., The antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA)., *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 2009; Volume 15(3), 275-279;
- Russell A., Bacterial spores and chemical sporicidal agents., *Clin Microbiol Rev.* 1990; 3(2): 99–119.
- Russell A., Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2002, Volume 49, 597–599.
- Samoilenko I., EI. Vasil'eva, BI. Pavlova, MA Tumanian., Mechanisms of the bactericidal action of hydrogen peroxide., *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*, 1983, (12), 30-3.
- Shih K., J. Lederberg., Effects of chloramine on *Bacillus subtilis* deoxyribonucleic acid., *Journal of Bacteriology*, 1976; 125(3): 934-45, 811–825.
- Silver S., Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds., *FEMS Microbiology Reviews*, 2003, Volume 27, 341–353.
- Silvestry-Rodriguez N., E. Sicairos-Ruelas, C. Gerba, K. Bright., Silver as a disinfectant., *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007; 191: 23-45.
- Sim W., R. Barnard, M. Blaskovich and Z. Ziora., Antimicrobial Silver in Medicinal and Consumer Applications: A Patent Review of the Past Decade (2007–2017)., *Antibiotics (Basel)*. 2018; 7(4): 93, doi: 10.3390/antibiotics7040093.
- Singh J., F. Adams and M. Brown., Diversity and Function of Capsular Polysaccharide in *Acinetobacter baumannii*., *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, Volume 9, 1-8.
- Swamy M., M. Akhtar and U. Sinniah., Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review., *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, doi: 10.1155/2016/3012462.
- Taylor T., G. Unakal., *Staphylococcus aureus*, *StatPearls*, 2020.
- Totaro M., B. Casini, S. Profeti, B. Tuvo, G. Privitera and A. Baggiani., Role of Hydrogen Peroxide Vapor (HPV) for the Disinfection of Hospital Surfaces Contaminated by Multiresistant Bacteria., *Pathogens*, 2020; Volume 9(5), doi: 10.3390/pathogens9050408.
- WHO., Infection Prevention and Control of Epidemic- and Pandemic-Prone Acute Respiratory Infections in Health Care., Geneva, 2014.
- Wińska K., W. Mączka, J. Łyczko, M. Grabarczyk, A. Czubaszek and A. Szumny., Essential Oils as Antimicrobial Agents – Myth or Real Alternative?, *Molecules (journal)*, 2019; 24(11): 2130, doi: 10.3390/molecules24112130.
- Wohlgemuth S., P. Kämpfer, BACTERIA, *Bacterial Endospores in Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd ed), 2014.

- Yang S.C., C.H. Lin, I. Aljuffali, J.Y. Fang., Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development., *Archives of Microbiology*, 2017;199(6); 811-825.
- Ziętek J., B. Dzięciel, A. Wójcik, A. Wilczyńska, Ł. Adaszek and S. Winiarczyk., Effect of Bathing in a 0.1% Aqueous Solution of Ethacridine Lactate on Selected Physiological Parameters of *Cornu Aspersum* Müller Edible Snails. *Journal of Veterinary Research*., 2020, 64(2), 313–318.
- Zou L., J. Meng, P. McDermott, F. Wang, Q. Yang, G. Cao, M. Hoffmann, S. Zhao., Presence of disinfectant resistance genes in *Escherichia coli* isolated from retail meats in the USA., *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2014, Volume 69, 2644–2649.