

Pregledni rad DOI: 10.5937/DDD26025Z

**MORFOLOŠKE PROMENE BAKTERIJA PRI DEZINFEKCIJI****MORPHOLOGICAL CHANGES OF BACTERIA DURING DISINFECTION**

**Nemanja Zdravković<sup>1\*</sup>, Milan Ninković<sup>1</sup>, Ivan Pavlović<sup>1</sup>,  
Zorica Zdravković<sup>2</sup>, Biljana Aleksić<sup>2</sup>, Teodora Grujović<sup>3</sup>,  
Oliver Radanović<sup>1</sup>**

**Kratak sadržaj**

Prema izveštajima Svetske zdravstvene organizacije (WHO) i Evropskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC) otkrivaju da gotovo 10% hospitalizovanih pacijenata dobije infekcije povezane sa zdravstvenom negom (HAIs), odnosno nozokomijalne infekcije. Neke od bakterijskih vrsta koje ih izazivaju su uslovno patogene a mogu izazvati infekcije ljudi kod imuno kompromitovanih stanja a posledično i do životno ugrožavajućih situacija. Morfološke promene kod bakterije *Escherichia coli* su uočene nakon što je bila podvrgnuta dekontaminacionim tretmanima na sub letalnim nivoima minimalne inhibitorne koncentracije različitih dezinfekcionih sredstava. Identifikovane morfološke modifikacije bakterijske ćelije predstavljaju odgovor u zaštiti na različite mehanizme delovanja ispitanih dezinficijensa. Tokom poslednjih decenija, mikroskopija atomske sile se sve više koristi za ispitivanje mikrobijalnih površina u visokoj rezoluciji. Rezultati ukazuju da *E. coli* ima manju otpornost na najkompleksniju proučavanu supstancu. Tretman natrijum hipohloritom ima najzabrinjavajući efekat pri ovoj niskoj koncentraciji zbog neujednačenog odgovora u populaciji. Iz tog razloga, sposobnost preživljavanja na nivou kolonije ostaje visoka. Smanjenje broja flagela za sve vrste tretmana ukazuje na odgovor na stres i borbu za preživljavanje čak i pri nižim koncentracijama dezinficijensa.

**Ključne reči:** mehanizam delovanja, morfološka modifikacija, toksični efekat

**Abstract**

According to reports from the World Health Organization (WHO) and the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), nearly 10% of hospitalized

<sup>1</sup> Dr sci. vet. med. Nemanja Zdravković, viši naučni saradnik; spec. dr vet. Oliver Radanović, stručni savetnik; dr Ivan Pavlović, naučni savetnik; dr vet. Milan Ninković, istraživač saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, 11000 Beograd, R. Srbija

<sup>2</sup> Spec. dr vet. Zorica Zdravković; spec. dr vet. Biljana Aleksić, Javna poljoprivredna služba Zavod za mlekarstvo, 11000 Beograd, R. Srbija

<sup>3</sup> Mast. Ing. Teodora Grujović, Hemofarm, Vršac, R. Srbija.

\* e-mail kontakt osobe: nemanja.zdravkovic@nivs.rs

*patients acquire healthcare-associated infections (HAIs), also known as nosocomial infections. Some of the bacterial species responsible are opportunistic pathogens that can cause infections in immunocompromised individuals, leading to potentially life-threatening conditions. Morphological changes in Escherichia coli have been observed after exposure to decontamination treatments at sub-lethal levels of the minimum inhibitory concentration of various disinfectants. These morphological modifications represent a protective response to the different mechanisms of action of the tested disinfectants. Over the past decades, atomic force microscopy has been increasingly used to examine microbial surfaces at high resolution. The results indicate that E. coli shows lower resistance to the most complex substance studied. Treatment with sodium hypochlorite has the most concerning effect at low concentrations due to the uneven response across the population, which allows high survival capacity at the colony level. The reduction in flagella observed across all treatments indicates a stress response and a struggle for survival, even at lower disinfectant concentrations.*

**Keywords:** *mechanism of action, morphological effect, toxic effect*

## UVOD

Hemijske supstance kao što su sredstva za svakodnevno čišćenje/dezinfekciju, moraju da prođu odgovarajuća ispitivanja i validaciju što pogotovo važi za sredstva namenjena za profesionalnu upotrebu u smanjenju/kontroli mikrobnе kontaminacije. Proces ispitivanja započinje od opštih parametara kao što su: formulacija, koncentracija koja se koristi (MIC), vreme kontakta, efikasnost protiv određenih mikroorganizama, aktivnost u prisustvu ili odsustvu organskih supstrata, rezidue nakon upotrebe i efekat na životnu sredinu (Jiménez, 2004; Lundén i sar., 2003; Mondin i sar., 2014). Još jedno važno pitanje je stalno praćenje njihove efikasnosti. Testiranje se mora vršiti na standardnim mikrobiološkim kulturama i na mikroorganizmima izolovanim iz okruženja objekta gde se dezinfekcionо sredstvo koristi (Jiménez, 2004). Uspostavljanje MIC za svako sredstvo za čišćenje/dezinfekciju namenjeno određenim mikroorganizmima predstavlja ključni korak u procesu validacije. Upotreba biocidnih supstanci u sub-MIC koncentracijama, iz različitih razloga (nepravilna validacija, ljudski faktor, razblaživanje, modifikacija formulacije biocida), može izazvati adaptivni odgovor kod nekih vrsta mikroorganizama. Adaptacija na dezinfekcionо sredstvo može dovesti do povećane stope preživljavanja mikroorganizma, ali i do ukrštene adaptacije na druga dezinfekcionа sredstva (Lundén i sar., 2003; McDonnell i Russell, 1999). Adaptacija i ukrštena adaptacija na različite supstance sa sličnim mehanizmima delovanja, korišćene u procesu čišćenja/dezinfekcije, prijavljene su u prehrambenој industriji, bolnicama i drugim zdravstvenim ustanovama prema preporukama WHO i ECDC.

## BOLNIČKE INFEKCIJE

Izveštaji Svetske zdravstvene organizacije (WHO) i Evropskog centra za prevenciju i kontrolu bolesti (ECDC) otkrivaju da skoro 10% hospitalizovanih Evropljana dobije bolničke infekcije tj. nozokomijalne infekcije, sa najmanje jednim mikroorganizmom. Većina ovih vrsta su bezopasne, komensalne bakterije koje se nalaze u normalnoj flori zdravih ljudi i imaju zaštitnu ulogu sprečavanjem kolonizacije patogenih bakterija. Neke od ovih vrsta mogu izazvati infekcije kod svog prirodnog domaćina ako dođe do kompromitacije, što izaziva ozbiljne probleme. Jedan od najčešćih i najlakše prenosivih mikroorganizama je *Escherichia coli*. Poslednjih godina primećen je značajan porast pojave i širenja u Evropi kod vrsta Enterobacteriaceae, poput *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae*, koje su rezistentne na karbapeneme. U zdravstvenim ustanovama i srodnim industrijama, širenje rezistentnih organizama se olakšava kada pranje ruku, barijerne mere, čišćenje površina i opreme nisu optimalni (Jiménez, 2004).

## BAKTERIJE

Bakterija *E. coli* je dobro poznat test mikroorganizam, Gram-negativna bakterija koja se nalazi u digestivnom traktu ljudi i životinja, u životnoj sredini ali i u hrani. Čelije su tipično štapićastog oblika, duge oko 2  $\mu\text{m}$  i široke 0,25–1,0  $\mu\text{m}$  (Krieg i sar., 2010). Intestinalne *E. coli* su najčešći uzrok urinarnih infekcija (ECDC, 2025). *E. coli* (ATCC 25923) iz kosog agara čuvanog u frižideru reanimirana je na tryptic soya agar (TSA) preko noći na 37 °C. Nakon inkubacije, pripremljena je suspenzija u PBS na približno 10<sup>6</sup> CFU/ml (Cui i sar., 2012). Procena efekta na *E. coli* pokazala je sledeće MIC vrednosti: 12,5% za etanol *abs*, 0,75% za natrijum-hipohlorit. Istovremeno je procenjen i efekat ubijanja metodom zasejavanja po ploči, iz sadržaja bunara u kojima nije primećen rast. Minimalna baktericidna koncentracija je iznosila: 50% za etanol, 3% za natrijum-hipohlorit. Čelije su kultivisane u prisustvu 1/2  $\times$  MIC dezinficijensa. Korišćenjem AFM-a, nasumično su odabrana vidna polja 50  $\times$  50  $\mu\text{m}$  koja su skenirana da bi se procenilo da li su bakterijske čelije dobro fiksirane na površini (Zhang i sar., 2011). Čelije *E. coli* bakterije su čvrsto vezane za površinu. Iako su čelije bile grupisane, prečnik, dužina i visina svake pojedinačne bakterije mogli su se izmeriti korišćenjem opcije „section analysis” softvera. Za svaki tip tretmana skenirano je više od četiri oblasti i analizirano 10–20 pojedinačnih čelija.

## MORFOLOGIJA

Morfološke promene nastale različitim tretmanima su uočene. AFM slike vinsine i analiza preseka netretiranih *E. coli* pokazale su karakterističan štapićast oblik sa dimenzijama nešto većim od literaturnih podataka (Krieg i sar., 2010), ali u skladu sa Bergey's Manual of Determinative Bacteria. Razlike nastaju jer su čelije sakupljene nakon 48 h inkubacije (kao i tretirane), u stacionarnoj fazi

(Wu i Liu, 2007). Iako je većina ćelija intaktna, a neke još u procesu deobe, na slikama se primećuje efekat starenja na strukturu bakterijske ćelije, pri čemu je najznačajniji efekat kolaps apikalnog kraja kod većine. Većina analiziranih ćelija je intaktna, čvrsto vezana za supstrat, većina u procesu deobe. Krajevi ćelija su simetrični, zaobljeni, bez kolapsa zida.

### EFEKAT ETANOLA

Etanol, spada u najčešće korišćene dezinficijense. Nisu poznati svi mehanizmi delovanja, ali povećana efikasnost u prisustvu vode (60–90% koncentracija alkohola) podržava teoriju da izazivaju brzu koagulaciju proteina (McDonnell i Russell, 1999). Etanol deluje kao rastvarač, rastvarajući lipide, pri nižoj koncentraciji (7,5%) izaziva perturbacije membrane, promene u sadržaju masnih kiselina i sastavu membrana kod *E. coli*. Efekat perturbacije etanola na propustljivost membrane usled modifikacija fosfolipida i sadržaja ergosterola prijavljen je i kod kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (Schiavone i sar., 2016). Istovremeno, tretman smanjuje stopu rasta, inhibira deobu ćelija i dovodi do smrti ćelija. Kod tretmana etanolom od 6,25%, vide se nagomilane bakterijske ćelije smanjenih dimenzija i vrlo glatkog površinskog izgleda, koje formiraju strukture slične biofilmovima. Modifikacija oblika i dimenzija pomaže bakterijskim ćelijama da se prilagode spoljnim uslovima, adaptivne promene kompenzuju direktnu fizičko-hemijsku interakciju etanola sa ćelijskom membranom. Chatterjee i saradnici opisali su sličan fenomen kod populacije *Staphylococcus aureus* (Van Der Hofstadt i sar., 2015).

### EFEKAT NATRIJUM-HIPOHLORITA

Kod tretmana natrijum-hipohloritom, AFM slike pokazuju značajne morfološke promene. Na koncentraciji od 0,75% (MIC) primećuje se oštećenje ćelijske površine, dok se pri višim koncentracijama (3%) javlja potpuni efekat ubijanja. Promene uključuju deformacije ćelijskog zida, gubitak simetrije i kolaps krajeva ćelija. Ove promene su u skladu sa poznatim mehanizmom delovanja hipohlorita, koji se zasniva na oksidaciji proteina i lipida ćelijske membrane, što dovodi do gubitka integriteta ćelijske strukture (Jiménez, 2004; McDonnell i Russell, 1999). AFM analiza pokazuje povećanu hrapavost površine (Rq), što ukazuje na razaranje spoljašnjeg sloja bakterijskog ćelijskog zida.

### ZAKLJUČAK

Rezultati pokazuju da različiti stres faktori izazivaju specifične morfološke promene kod *E. coli*, vidljive tehnikom AFM.

- Etanol dovodi do smanjenja dimenzija i formiranja biofilm-sličnih struktura
- Natrijum-hipohlorit izaziva oksidativna oštećenja, kolaps ćelijskog zida i povećanu hrapavost površine

Ove promene potvrđuju da sub-MIC koncentracije mogu izazvati adaptivno prilagođavanje bakterija, uključujući promene u obliku, dimenzijama i površinskoj strukturi, što im omogućava privremeno preživljavanje u nepovoljnim uslovima. Međutim, dugoročno, ovakvi odgovori mogu doprineti razvoju rezistencije i ukrštene adaptacije na druge biocide, što predstavlja ozbiljan problem u zdravstvenim sistemima.

## Zahvalnica

Rad je finansiralo Ministarstvo za nauku, tehnološki razvoj i inovacije Republike Srbije (Ugovor br. 451-03-33/2026-03/200030).

## LITERATURA

1. Cui, Y., Oh, Y. J., Lim, J., Youn, M., Lee, I., Pak, H. K., Park, W., Jo, W., & Park, S. (2012). AFM study of the differential inhibitory effects of the green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Food Microbiology*, 29(1), 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.08.019>
2. ECDC. (2025). <http://ecdc.europa.eu>.
3. Jiménez, Luis. (2004). Microbial contamination control in the pharmaceutical industry / edited by Luis Jimenez. *Y Microbial contamination control in the pharmaceutical industry*. Marcel Dekker.
4. Krieg, N. R., Staley, J. T., Brown, D. R., Hedlund, B. P., Paster, B. J., Ward, N. L., Ludwig, W., & Whitman, W. B. (Yp.). (2010). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Four The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes*. Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68572-4>
5. Lundén, J., Autio, T., Markkula, A., Hellström, S., & Korkeala, H. (2003). Adaptive and cross-adaptive responses of persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants. *International Journal of Food Microbiology*, 82(3), 265–272. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00312-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00312-4)
6. McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147>
7. Mondin, A., Bogialli, S., Venzo, A., Favaro, G., Badocco, D., & Pastore, P. (2014). Characterization and quantification of N-(3-aminopropyl)-N-dodecyl-1,3-propanediamine biocide by NMR, HPLC/MS and titration techniques. *Chemosphere*, 95, 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.09.049>
8. Schiavone, M., Formosa-Dague, C., Elsztein, C., Teste, M.-A., Martin-Yken, H., De Morais, M. A., Dague, E., & François, J. M. (2016). Evidence for a Role for the Plasma Membrane in the Nano-mechanical Properties of the Cell Wall as Revealed by an Atomic Force Microscopy Study of the Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Ethanol Stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(15), 4789–4801. <https://doi.org/10.1128/AEM.01213-16>
9. Van Der Hofstadt, M., Hüttener, M., Juárez, A., & Gomila, G. (2015). Nanoscale imaging of the growth and division of bacterial cells on planar substrates with the atomic force microscope. *Ultramicroscopy*, 154, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2015.02.018>
10. Wu, G., & Liu, X. (2007). Characterization of predominant bacteria isolates from clean rooms in a pharmaceutical production unit. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 8(9), 666–672. <https://doi.org/10.1631/jzus.2007.B0666>
11. Zhang, T., Chao, Y., Shih, K., Li, X.-Y., & Fang, H. H. P. (2011). Quantification of the lateral detachment force for bacterial cells using atomic force microscope and centrifugation. *Ultramicroscopy*, 111(2), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.ultramic.2010.10.005>