

## ДЕЗИНФІКУЮЧА ДІЯ ПЕРЕКИСУ ВОДНЮ ТА ЛІЗОФОРМІНУ НА ГРАМНЕГАТИВНІ БАКТЕРІЇ, ЯКІ КОНТАМІНУЮТЬ ВИРОБНИЦТВА ХАРЧОВОЇ ПРОМИСЛОВОСТІ

У статті представлено результати дослідження дезінфікуючої дії перекису водню та лізоформіну на бактерії родини *Enterobacteriaceae*, що контамінують підприємства харчової промисловості. Встановлено, що досліджені ізоляти є більш стійкими до дії дезінфектантів порівняно з колекційними штамами *Pseudomonas aeruginosa* CCM1961 та *Serratia marcescens* CCM1257. Деякі ізоляти характеризувалися різною чутливістю до лізоформіну та перекису водню. У зв'язку з цим ефективність дезінфекції можна суттєво покращити завдяки наперемінному застосуванню дезінфектантів різної хімічної природи. Для застосування у виробництві можна рекомендувати концентрації лізоформіну 312 ррт і більше та перекису водню - 3,5-7 %.

Розв'язання проблеми контамінації продуктів харчування значною мірою залежить від заходів контролю та профілактики, серед яких важливе місце посідає дезінфекція обладнання та поверхонь. За всього різноманіття існуючих на сьогодні дезінфікуючих засобів кількість хімічних інгредієнтів, що входять до їх складу, досить обмежена. Найбільш поширеними є дезінфектанти, розроблені на основі четвертинних амонійних сполук (ЧАС), альдегідів, фенолів і спиртів, а також кисневмісні препарати. Антимікробний спектр дії дезінфектантів може посилюватися завдяки створенню комплексних препаратів, до складу яких входить кілька хімічних агентів [1; 2]. Проблема вибору та доцільності застосування дезінфектантів є актуальною для кожного виробництва, оскільки необхідно враховувати ефективність дезінфікуючого препарату, його вартість, концентрацію та час дезінфекції, що є особливо важливим у безперервному виробництві. Крім того, фірми-виробники дезінфектантів та антисептиків проводять тестування препаратів на колекційних штаммах, які за своїми властивостями можуть відрізнятися від свіжовиділених ізолятів, що часто призводить до помилок при виборі концентрацій та часу експозиції з дезінфектантом. Відмінності у властивостях штамів, які циркулюють на різних підприємствах, також є однією з причин вивчення дії різноманітних дезінфектантів на бактерії, що контамінують виробництво. Зважаючи на викладене вище, метою даної роботи було дослідити дезінфікуючу дію перекису водню та лізоформіну на представників родини *Enterobacteriaceae*, які контамінують підприємства харчової промисловості.

Об'єктами досліджень були культури Чеської колекції мікроорганізмів (CCM): *Pseudomonas aeruginosa* CCM 1961 та *Serratia marcescens* CCM 1257, а також штами, ізовані з поверхні технологічного обладнання підприємства з виробництва безалкогольних напоїв: *Serratia liquefaciens* 8; *Serratia marcescens* 9; *Pantoea sp.* 4; *Morganella morganii* 3; *Citrobacterfreundii* 6, 10 і 12; *Enterobacter asburiae* 2; *Klebsiella oxytoca* 5. У роботі використовували перекис водню та лізоформін 3000 («Лізоформ Др. Ханс Роземан ГмбХ», Німеччина) – комбінований дезінфікуючий засіб, до складу якого, крім ЧАС, входять дидецилдиметиламонію хлорид, гліоксаль; глутаровий альдегід та ПАР.

Бактерицидну дію дезінфектантів визначали суспензійним методом. У досліджах застосовували суспензію ( $1 \cdot 10^9$  кл/мл) добових культур бактерій, що вирости на агарі CASO («Merck», Німеччина). Суспензії бактерій та 2-кратні серійні

розведення перекису водню (1,75–7 %) і лізоформіну (2–0,125 % та 625–19,5 ррт – мг/л) готували у стерильній дистильованій воді. Кінцева концентрація бактерій, які вносили до розчинів дезінфектантів, становила  $2 \cdot 10^8$  кл/мл. Як контроль використовували суспензії культур у дистильованій воді без дезінфектанту. Оптимальний час дії дезінфектантів визначали через 0, 5, 10, 15, 20 та 30 ХВ при висіванні у чашки Петрі з середовищем CASO за методом Yould [3]. Кількість бактерій, що вижили після такої обробки, визначали за числом колонієутворюючих одиниць (КУО/мл) через 24 год інкубації при температурі  $37^\circ\text{C}$  за вказаним методом. Ефективність бактерицидної дії дезінфектанту визначали за кількістю клітин, що вижили, розраховуючи їх життєздатність за формулою:

$$C = \lg \frac{N_t}{N_{ik}},$$

де  $N_t$  – кількість бактерій, що вижили після дії дезінфектанту,  $N_{ik}$  – кількість бактерій у контролі за той самий проміжок часу [4; 5]. Ефективність препаратів оцінювали за шкалою, наведеною в таблиці [5].

**Таблиця. Шкала оцінки ефективності препаратів**

Значення C, КУО/мл	Кількість клітин, що загинули, %
Від -2,0 до -2,9	99,0
Від -3,0 до -3,9	99,9
Від -4,0 до -4,9	99,99
Від -5,0 до -5,9	99,999
Від -6,0 та менше	> 99,999

Досліди повторювали тричі, отримані результати обробляли математично на персональному комп'ютері.

Дезінфектанти тільки у тому випадку вважаються універсальними, коли вони відповідають таким характеристикам: мають широкий спектр антимікробної активності; швидко діють; легко розчиняються у воді; стабільні та стійкі до забруднення; безпечні у використанні та для навколишнього середовища; нетоксичні; некорозійні; економічні та порівняно дешеві [6]. У даній роботі вивчали три фактори, за якими визначають ефективність дезінфектантів, зокрема: концентрацію, тривалість контакту та спектр мікроорганізмів, на які він діє. Крім того, дезінфектант вважається ефективним лише тоді, коли тест-культури інактивуються більше ніж на -4,0 Іг КУО/мл, тому антимікробну активність лізоформіну та  $\text{H}_2\text{O}_2$  оцінювали саме за цим показником [5].

Відомо, що грамнегативні бактерії характеризуються природною стійкістю до антибактеріальних агентів, дезінфектантів та інших ксенобіотиків. Причиною такої стійкості є низька проникність зовнішнього шару клітинної оболонки. Крім того, деяким з них, наприклад *Pseudomonas aeruginosa*, властиві вторинні механізми резистентності, зокрема наявність цефалоспориноз та активного зворотного транспорту ксенобіотиків. Саме завдяки зазначеним властивостям представників виду *P. aeruginosa* обов'язково використовують як тест-об'єкти для вивчення антимікробної дії препаратів [7-9].

На початку експерименту вивчали вплив лізоформіну та  $H_2O_2$  на колекційні штами *P. aeruginosa* ССМ 1961 і *S. marcescens* ССМ 1257. Потім визначали бактерицидну активність вказаних речовин щодо свіжовиділених ізолятів та порівнювали їхню чутливість з колекційними штамами. Фірма-виробник для дезінфекції приміщень, зокрема стін і підлоги, рекомендує застосовувати 0,75 та 1,5 %-ні розчини лізоформіну при експозиції 60 та 30 ХВ відповідно. У проведених нами дослідженнях лізоформін у концентрації від 2 % до 0,125 % повністю інактивував колекційні штами та свіжовиділені ізоляти - ріст бактерій припинявся взагалі. Враховуючи високу вартість лізоформіну, а також те, що дезінфектант після використання потрапляє у стічні води, а сполуки, які входять до його складу, дуже повільно розкладаються в природних екосистемах, ми вважали за доцільне дослідити дезінфікуючу активність цього препарату в більш низьких концентраціях. Встановлено, що при експозиції більше 10 ХВ лізоформін у концентрації 19,5 ppm справляє бактерицидний ефект лише на ізолят *C. freundii* 10. Життєздатність клітин цього штаму за 10 ХВ зменшувалась на 5,4 lg КУО/мл, залишалась практично незмінною при 15-20 ХВ експозиції та істотно знижувалась за 30 хв ( $> 6,0$  lg КУО/мл). Концентрація лізоформіну 39 ppm була ефективною лише щодо деяких представників *Citrobacter* і *Klebsiella*. Зокрема, лізоформін через 20 хвилин інактивував *K. oxytoca* 5 на 6,0 lg КУО/мл, тоді як *C. freundii* 10 - на 8,3 lg КУО/мл за 10 ХВ. Для інших досліджених штамів концентрації 19,5 і 39 ppm були взагалі неефективні (рис. 1, А). Малоефективною щодо більшості досліджених штамів (70 %) виявилася концентрація лізоформіну 78 ppm. Інактивація клітин за цієї концентрації була нестабільною перші 20 ХВ експозиції, і лише за 30 ХВ лізоформін на 5,0-7,5 lg КУО/мл пригнічував ізоляти *S. marcescens* 9, *K. oxytoca* 5, *C. freundii* 6, 10 та 12, а також колекційний штам *P. aeruginosa* ССМ 1961.

Найвищу бактерицидну активність щодо досліджених штамів мав лізоформін у концентрації 156 та 312 ppm (рис. 1, Б, В). У концентрації 156 ppm цей дезінфектант інактивував клітини *S. marcescens* 9, *K. oxytoca* 5, *C. freundii* 10, *Pantoea* sp. 4 та *P. aeruginosa* ССМ 1961 більше ніж на 5,0 lg КУО/мл одразу після внесення культур у розчин дезінфектанту. Починаючи з п'ятої хвилини контакту з лізоформіном 156 ppm, ефективну дезінфікуючу дію (на 6,5-7,9 lg КУО/мл) реєстрували щодо 6 з 10 досліджених штамів, за винятком ізолятів *C. freundii* 6 і 12, *S. marcescens* 9 та *M. morgani* 3, у яких життєздатність клітин знижувалась на 4,7 lg, 4,5, 3,8 і 2,5 lg КУО/мл відповідно. При подовженні часу експозиції до 10-20 ХВ 90 % досліджених культур втрачали життєздатність більше ніж на 5,0 lg КУО/мл. Водночас ізоляти *M. morgani* 3 та *C. freundii* 12 залишались резистентними до даної концентрації лізоформіну навіть при збільшенні часу експозиції до 20 ХВ. Отже, оптимальною для лізоформіну 156 ppm можна вважати експозицію протягом 30 ХВ, оскільки за цей час усі без винятку штами зазнавали дезінфікуючої дії лізоформіну (рис. 1, Б). Причому 10 % культур інгібувались на 9,4 lg КУО/мл, 50 % - на 7,5 lg КУО/мл та 20 % - на 5,5 lg КУО/мл.

Максимальний бактерицидний ефект на досліджені культури проявляв лізоформін у концентрації 312 ppm: одразу після його внесення у всіх штамів, за винятком *E. asburiae* 2, зменшувалась кількість живих клітин (більше ніж на 4,5 lg КУО/мл). Після 5 ХВ контакту межу ефективною дезінфекції ( $-4,0$  lg КУО/мл) перейшли 9 з 10 досліджених штамів (рис. 1, В), а за 10 хвилин у всіх без винятку штамів загинуло більше ніж 5,0 lg КУО/мл клітин. Під дією лізоформіну в концентрації 312 ppm життєздатність клітин усіх штамів пригнічувалась у середньому на 7,0 lg КУО/мл і більше, що свідчить про високу ефективність дезінфектанту. Ці результати збігаються з отриманими нами раніше даними про те, що саме комбіновані препарати, до складу яких входять ЧАС у поєднанні з іншими хімічними агентами, є найбільш перспективними для створення ефективних дезінфікуючих засобів [11].

Далі було досліджено бактерицидну дію перекису водню в концентрації 1,75-7 %, оскільки для дезінфекції використовують переважно 3-6 %-ні розчини  $H_2O_2$  [12]. Встановлено, що 7 %-й розчин  $H_2O_2$  згубно впливав на всі досліджені штами одразу після внесення у розчин дезінфектанту. Проте у більшості з них кількість життєздатних клітин зменшувалась до рівня, який вважається недостатнім для ефективною дезінфекції. Так,

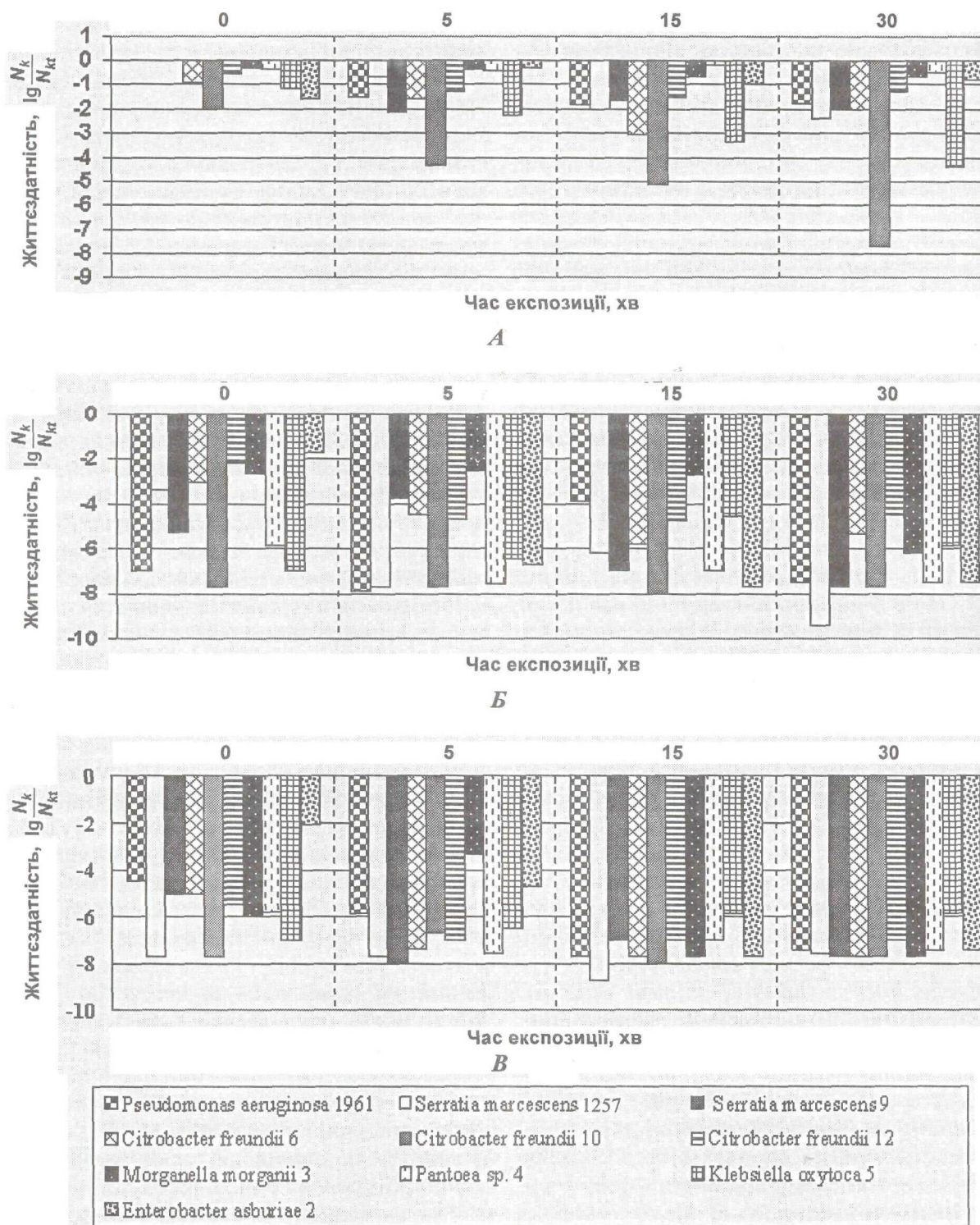


Рис. 1. Вплив лізоформіну на життєздатність досліджених мікроорганізмів:  
Л-39 ppm, Б-156 ppm, В-312 ppm

культури 5. *liquefaciens* 8, 5. *marcescens* 9, *C. freundii* 10 і 12 та *P. aeruginosa* CCM 1961 інактивувались лише на 1,2-2,8 lg КУО/мл. Більш ефективно 7 %-й  $H_2O_2$  впливав на АТ. *oxytoca* 5, *C. freundii* 6, *E. asburiae* 2 і *Pantoea sp.* 4. У цих штамів кількість життєздатних клітин зменшувалася на 3,7 - 4,0 lg КУО/мл, а у колекційного шта-

му *S. marcescens* CCM 1257 - на 4,6 lg КУО/мл. Тільки у *M. morganii* 3 під дією 7 %-го  $H_2O_2$  миттєво гинуло понад 5,0 lg КУО/мл клітин. За менших концентрацій  $H_2O_2$  (1,75-3,5%) подібного ефекту не спостерігали.

Вивчення дезінфікуючої дії  $H_2O_2$  концентрацією 1,75 % показало, що при експозиції 5 хв



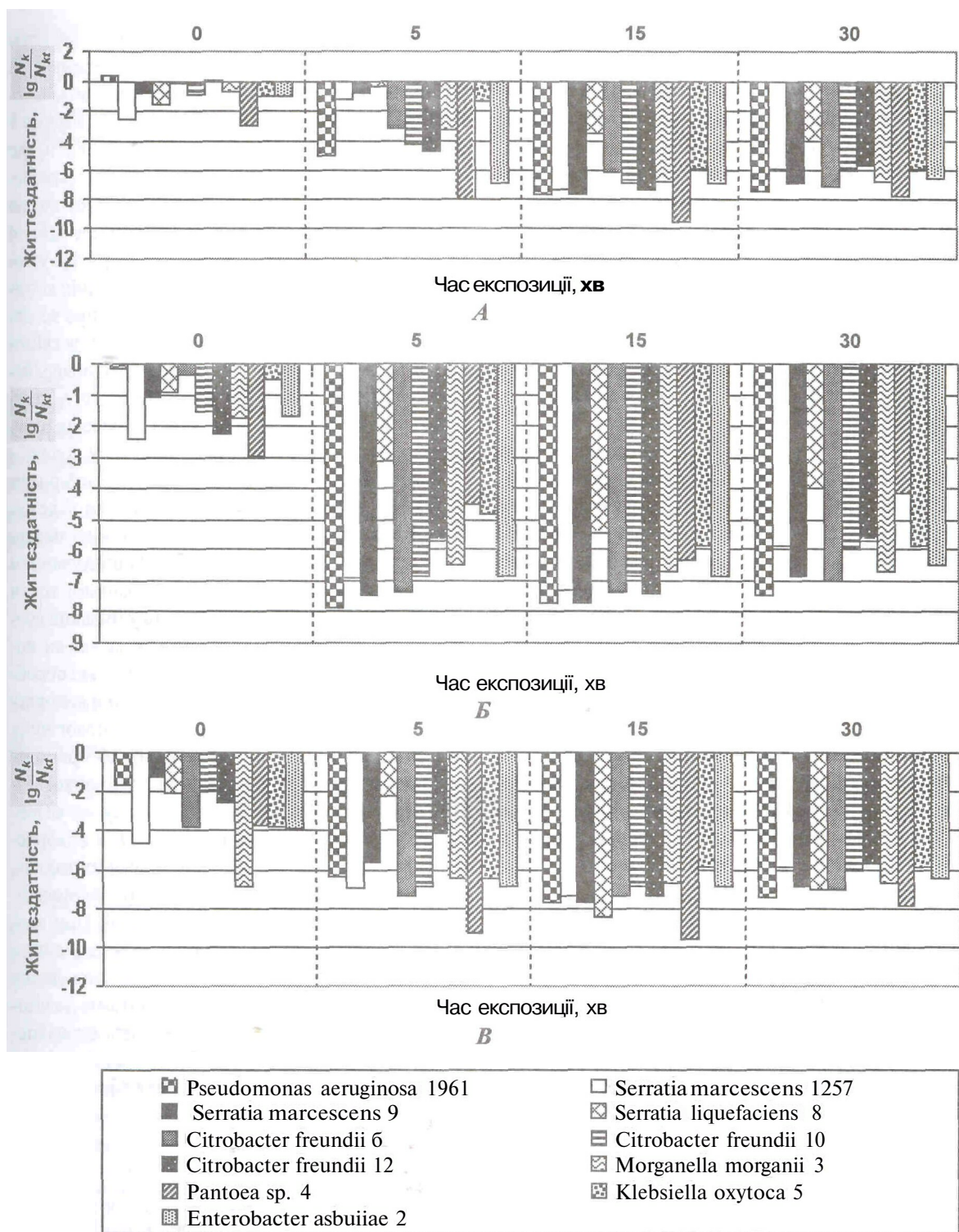


Рис. 2. Вплив перекису водню на життєздатність досліджених бактерій:  
 -А-1,75 %  $H_2O_2$ , Б- 3,5 %  $H_2O_2$ , В -1 %  $H_2O_2$

кількість життєздатних клітин зменшувалась на 4,0 lg КУО/мл і більше лише у *C. freundii* 10 і 12, *E. asburiae* 2, *Pantoea sp.* 4 та *P. aeruginosa* ССМ 1961 (рис. 2, А). Подовження часу експозиції від 15 до 30 хв супроводжувалось інактивацією практично всіх штамів на 5,9-9,6 lg КУО/мл. Найбільш стійким до 1,75 %-го розчину  $H_2O_2$  був ізо-

лят *Sl liquefaciens* 8, у якого після 30 хв кількість КУО/мл зменшувалась лише на 4,0 lg. При збільшенні концентрації  $H_2O_2$  вдвічі (3,5 %) значний бактерицидний ефект спостерігали вже за 5 хв експозиції: у 10 з 11 досліджених штамів гинуло 4,0 lg КУО/мл клітин (рис. 2, Б). Причому 64 % штамів інактивувалися більше ніж на 6,0 lg КУО/мл,

а *S. marcescens* 9, *C. freundii* 6 та *P. aeruginosa* CCM 1961 – на 7,4–7,8 lg КУО/мл. Триваліший контакт з 3,5 %-м  $H_2O_2$  (від 10 до 30 ХВ) забезпечував інактивацію досліджуваних культур більше ніж на 5,0 lg КУО/мл. Оптимальним часом експозиції 3,5 %-го  $H_2O_2$  можна вважати 15 ХВ, оскільки кількість життєздатних клітин у всіх досліджених штамів за цей проміжок часу зменшувалась майже на 5,0 lg КУО/мл. Тобто подовження часу експозиції (зокрема до 30 ХВ) недоцільне, оскільки подальшого пригнічення культур не відбувається (рис. 2, Б). Як вже зазначалося, максимальну бактерицидну дію щодо досліджених культур мав 7 %-й розчин  $H_2O_2$  – 73 % культур миттєво втрачали життєздатність більше ніж на 2,0 lg КУО/мл. За 5 ХВ контакту з 7 %-м  $H_2O_2$  у всіх штамів, за винятком *S. liquefaciens* 8, кількість клітин зменшувалась > 4,0 lg КУО/мл, тоді як за 10 ХВ у всіх культур життєздатність знижувалась більше ніж на 5 lg КУО/мл. Отримані результати свідчать, що підвищення концентрації перекису водню дає змогу максимально скоротити час експозиції. Ми встановили, що практично однаковий дезінфікуючий ефект на досліджені штами досягається як за 30 хв з 1,75 %-м, так і за 10 хв з 3,5 %-м  $H_2O_2$ . Порівняння дезінфікуючої активності 3,5 %-го та 7 %-го розчинів  $H_2O_2$  дозволило також встановити, що при нетривалому контакті (5–10 ХВ) їхня активність була порівняно однаковою. Відмінність між ними полягала в тому, що дезінфікуюча активність 7 %-го  $H_2O_2$  щодо переважної більшості штамів проявлялася миттєво (рис. 2, Б, В).

Таким чином, у результаті проведених досліджень встановлено, що ефективними для застосування у виробництві можуть бути концентрації лізоформіну, нижчі за рекомендовані виробником, зокрема 156–312 ррт, а перекису водню – 3,5–7 %. Показано, що з усіх досліджених видів родини *Enterobacteriaceae* найбільш чутливими до дії лізоформіну були представники родів

*Serratia* та *Citrobacter*, зокрема колекційний штам *S. marcescens* CCM 1257 та ізолят *C. freundii* 10. Стійкими до дії вказаного дезінфектанту виявились ізоляти *E. asburiae* 2, *M. morgani* 3, *K. oxytoca* 5 та *C. freundii* 12. Необхідно підкреслити, що свіжовиділені ізоляти в цілому були більш резистентними до дії лізоформіну та перекису водню порівняно з колекційними штамами *P. aeruginosa* CCM 1961 та *S. marcescens* CCM 1257. Це узгоджується з результатами наших попередніх досліджень та даними наукової літератури про те, що колекційні штами є більш чутливими, ніж свіжовиділені ізоляти, до дії ЧАС та інших поверхнево-активних речовин [8; 9; 12]. Крім того, деякі ізоляти, наприклад *M. morgani* 3, виявляли різну чутливість до лізоформіну та перекису водню.

Отримані результати свідчать, що вибір концентрації дезінфектанту для ефективної дезінфекції обладнання та різних виробничих поверхонь залежить від часу обробки. Із врахуванням специфіки виробництва та з економічної точки зору застосування дезінфектантів у низьких концентраціях можна рекомендувати за умови подовження часу контакту з поверхнями, які обробляються. Такий підхід, зокрема, можна використовувати на час зупинки роботи технологічних ліній у зв'язку з профілактичними або ремонтними роботами. У разі необхідності швидкої дезінфекції (наприклад у безперервному чи сезонному виробництві) більш доцільним є використання таких концентрацій дезінфікуючих засобів, які на кілька порядків перевищують рекомендовані для використання у виробництві. При цьому час експозиції дезінфектантів можна зменшувати до 5–10 ХВ. На підставі отриманих даних про різну чутливість досліджених штамів до лізоформіну та  $H_2O_2$  можна стверджувати, що наперемінне застосування дезінфектантів різної хімічної природи істотно підвищує ефективність дезінфекції.

1. Rutala W. A., Weber D. J. New Disinfection and Sterilization Methods // Emerging Infectious Diseases. – 2001. – V. 7. – № 2. – P. 348–353.  
 2. Davidson M., Harrison M. Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other Process Controls // Food Technology. – 2002. – V. 56. – № 11. – P. 69–78.  
 3. Youldl. P. Quantity and anality in the diagnosis of urulogy troot infection // Brit. J. Urol. – 1965. – V. 37. – № 1. – P. 7–12.  
 4. Потапенко Н. Г., Савлук О. С., Ильяшенко В. В. Сочетанное действие УФ-излучения ( $\lambda = 254$  НМ) и ионов меди и серебра на выживаемость *Escherichia coli* // Химия и технология воды. – 1992. – Т. 14. – № 12. – С. 935–940.  
 5. Бриан Л. Е. Бактериальная резистентность и чувствительность к химиопрепаратам / Пер. с англ. Ивлевой А. Я. – М.: Медицина, 1984.  
 6. Федорова Л. С., Арефьева Л. И., Путинцева Л. С. и др. Современные средства дезинфекции и дезинсекции. Характерис-

тика, назначение, перспективы / Медицина и здравоохранение. Обзорная информация. – М., 1991. – № 2. – С. 3–25.  
 7. Сазыкин Ю. О., Швеиц А. В., Иванов В. П. Антибиотикорезистентность и системы активного выброса ксенобиотиков у бактерий // Антибиотики и химиотерапия. – 1999. – Вып. 44. – № 9. – С. 3–6.  
 8. Потёмкин А. С. Сравнительная резистентность грамотрицательных микроорганизмов, выделенных с объектов внешней среды, к воздействию дезинфицирующих средств // Актуальные вопросы клинической микробиологии в неинфекционной клинике. – М., 1988. – Ч. II. – С. 227–228.  
 9. Гудзь О. В. Адаптационные возможности возбудителей гнойной инфекции к поверхностно-активным антисептическим средствам // Врачебное дело. – 1989. – № 2. – С. 105–107.  
 10. Степура Л. Г., Радченко О. С., Фуртат І. М., Михальський Л. О. Бактерицидні властивості катіонних та інших

- поверхнево-аісгивних речовин // Агроєкологічний журнал - 2002. - № 4. - С. 60-63.
11. Пхакадзе Т. Я. Антисептические и дезинфицирующие средства в профилактике нозокомиальных инфекций // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. - 2002 - Т. 4 - № 1 - С. 42-48.
12. Радченко О. С., Стенура Л. Г., Фуртат І. М. та ін. Перспективність застосування четвертинних амонійних сполук для санації слизових оболонок та дезінфекції ран // Інфекційні хвороби, - 2002 - № 1 - С. 59-63.

*I. Furtat, T. Nivyevs'ka, L. Gorbat'ko, L. Mykhalsky*

## **ANTIMICROBIAL EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE AND LYSOFORMIN ON GRAM-NEGATIVE BACTERIA CONTAMINATING FOOD PRODUCTION**

*This work represents results of research of hydrogen peroxide and lysoformin antimicrobial effect on the Enterobacteriaceae family strains contaminating food production. It was revealed that isolated strains were more resistant to disinfectants than collection microorganisms Pseudomonas aeruginosa 1961 and Serratia marcescens. Resistance of some isolated strains to hydrogen peroxide and lysoformin differs. Due to this fact it is possible to increase disinfection effectiveness changing in use different chemical based disinfectants. The most effective concentrations of disinfectants such as 312 ppm and more of lysoformin and 3.5-7 % of hydrogen peroxide can be recommended for practical use at plants.*