

УДК 648.14

Н.М. Грегірчак, N.Cregirchak, канд. техн. наук,
О.А. Гуцалюк, O.Gytsalyuk

**ДІЯ ДЕЯКИХ БІОЦИДНИХ ПРЕПАРАТІВ НА БАКТЕРІАЛЬНУ І
ГРИБНУ МІКРОФЛОРУ**
**ACTION OF THE SOME BIOSIDE PREPARATIONS ON BACTERIAL
AND MUSHROOM MICROFLORA**

Проведено дослід з визначення мінімальних інгібуючих та статичних концентрацій дезінфекційних засобів, які відрізняються за хімічною природою. Встановлено відповідність препаратів інструкціям до застосування. Підтверджено переваги застосування препаратів нового покоління поліалкіленгуанідинової природи. Встановлено залежність біоцидної активності препаратів від часу експозиції.

Ключові слова: *дезінфекція, біоциди, мікроорганізми.*

Experiments on determination of minimal inhibitory and static concentrations of disinfectant agents, which differ in chemical nature, were carried out. Conformity of the chemicals to their application instructions was established. Advantages in application of new generation chemicals of polyalkylene and guanidine nature were confirmed.

Key words: *Disinfection, bioside, microorganisms*

У системі санітарно-гігієнічних заходів, що забезпечують благополуччя виробництва щодо інфекційних хвороб, підвищення санітарної якості продуктів, сировини, одне з важливих місць належить дезінфекції. Відомо, що джерелом сторонніх, у тому числі патогенних мікроорганізмів, можуть виступати сировина, повітря приміщень, устаткування, що його

обслуговує персонал [3]. Тому правильний підбір і грамотне використання дезінфекційних засобів, як одного з важливих засобів зниження обсіменіння набуває важливого значення.

Відповідно до сучасних вимог, що ставляться до біоцидних препаратів, хімічні сполуки, використовувані як діюча речовина у складі дезінфекційних засобів, повинні мати широкий спектр біоцидної дії, швидко і надійно придушувати різноманітну патогенну мікрофлору. Причому бажано, щоб їхні антимікробні властивості зберігалися якомога довше. Засоби мають бути зручними в користуванні: не мати різкого запаху, бути стабільними при зберіганні і транспортуванні, сполучатися з різними матеріалами і, захищаючи від біопошкоджень, не спричиняти корозійних ушкоджень. І, безумовно, вони мають бути абсолютно безпечними для людини і середовища її існування. Важливою і актуальною вимогою є екологічна безпека дезінфекційних засобів. Йдеться про їх повне біологічне розкладання в зовнішньому середовищі до нейтральних хімічних компонентів. Суттєвим фактором у виборі дезінфекційного засобу є те, що сам мікробний фон постійно змінюється, адаптуючись до традиційних дезінфектантів [2].

Нині на ринку біоцидів є багато дезінфектантів з різними діючими речовинами. В основі дії біоцидних сполук лежить їхня здатність інгібувати активність компонентів і деякі реакції метаболізму, внаслідок яких змінюється механізм дихання, порушується структура мікробної клітини.

Більшість традиційно використовуваних як в Україні, так і за кородоном дезінфекційних засобів можна визначити таким чином:

хлорактивні препарати (хлорне вапно, хлорамін, гіпохлориди тощо) – мають високу ефективність щодо більшості мікроорганізмів, за винятком спорових форм бацил, вірусів, синегнійної палички, цист найпростіших. Крім того, вони мають різкий запах, справляють подразливу дію на шкіру і слизові оболонки очей і верхніх дихальних

шляхів, а також завдають серйозної шкоди екології, оскільки є основними першоджерелами діоксинів. Унаслідок високої леткості й інгаляційної токсичності застосування хлорактивних дезинфекційних засобів дозволено тільки з використанням персоналом засобів індивідуального захисту. Ці засоби руйнують поверхні будь-яких матеріалів, спричиняють корозію металів і металевих покриттів і підлягають обов'язковому змивові з поверхні обробки. Крім того, хлор і його сполуки відносяться до сильних гепатоксинів з канцерогенною активністю. У високорозвинених країнах заборонено використання таких засобів;

сильні окисники, наприклад перекис водню, персульфати калію, натрію тощо, з широким спектром антимікробної дії, – будучи екологічно безпечними, характеризуються низькою ефективністю щодо більшості мікроорганізмів. До того ж вони знебарвлюють і руйнують оброблювані матеріали, викликають корозію металевих деталей устаткування, що робить їх не прийнятними для використання на багатьох об'єктах;

альдегідні сполуки (формальдегід, ацетальдегід, глутаровий альдегід) – широко використовуються як для дезінфекції як приміщень, так і повітря, оскільки ефективні проти бактерій, вірусів, грибів. Проте, вони належать до сильних алергенів, що різко обмежує їхнє застосування. При попаданні на шкіру вони викликають хімічні опіки; низька стабільність створює незручності при їхньому використанні, збереженні й транспортуванні;

четвертинні амонієві сполуки (ЧАС) на основі катіонних поверхнево-активних сполук – більш стабільні, мало агресивні щодо багатьох матеріалів і безпечніші для людини й навколишнього середовища. Однак вони поступаються за біоцидними властивостями хлоровмісним сполукам, сильним окисникам. Останнім часом з'являються критичні публікації щодо ЧАС, у яких наголошується на недостатній їх активності щодо грамнегативних бактерій, збудників туберкульозу, пикновірусів, псевдомонад і мукоїдних штамів

стафілококів. Крім природної стійкості до ЧАС в деяких мікроорганізмів спостерігається швидке звикання до дії цих препаратів. Крім цього, відомі випадки, коли засоби на основі ЧАС викликали алергійні реакції в людей [4].

Останнє покоління дезинфекційних засобів розроблено на основі полімерних біоцидних препаратів – **поліалкіленгуанідинів (ПГМГ)**. Для дезінфекції ПГМГ особливо привабливі тим, що поєднують широкий спектр біоцидної дії щодо мікроорганізмів з низькою токсичністю для макроорганізмів (людину і тварин), екологічною безпекою і зручними для застосування фізичними формами. В Україні на основі вказаних солей випускається препарат «Полідез» та інші.

Широкі можливості ПГМГ пов'язані з відносно великою реакційною здатністю гуанідинових груп. В той час як низькомолекулярні сполуки втрачають свої біоцидні властивості при будь-якому хімічному перетворенні, біоцидні властивості ПГМГ при багатьох хімічних реакціях зберігаються, оскільки гуанідинові групи об'єднані в загальний полімерний ланцюг і в хімічній реакції завжди бере участь лише частина з них; при цьому незмінні групи зберігають у новій сполуці біоцидні властивості

Низька токсичність ПГМГ пояснюється тим, що в організмі теплокровних є ферментні системи, які викликають деградацію гуанідинвмісних полімерів. Першою стадією метаболізму фосфату чи хлориду ПГМГ є заміна хлоридного чи фосфатного аніону на аніон глюконата, далі іде гідроліз гуанідинових груп з перетворенням їх на сечовину, а також деструкція полімерних ланцюгів на окремі фрагменти [3].

Метою цієї роботи є порівняльна характеристика дії біоцидних препаратів різних за своєю хімічною природою на бактеріальну і грибну мікрофлору, визначення переваг та недоліків препаратів нового покоління на основі похідних поліалкіленгуанідинів. В зв'язку з

ситуацією, що склалася на ринку, особливо актуальною також буде перевірка відповідності дії різноманітних препаратів діючим інструкціям. Це дасть можливість проводити ефективну дезінфекцію і водночас запобігти погіршенню екологічної ситуації.

Матеріали та методи

Як об'єкти дослідження ми обрали такі мікроорганізми: бактерії *Escherihia coli* (грамнегативні неспороутворювальні) та *Bacillus subtilis* (грампозитивні спороутворювальні), *P. aureofaciens*, *S. aureus*; і гриби роду *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*. Досліджували дію на мікроорганізми таких препаратів: Полідез, Біодез (поліалкіленгуанідинової природи), Вантоцил (бігуанідинової природи), Жавель-Клейд (активний хлор), Фогнет (містить альдегіди), Віроцид (амонієві сполуки).

1. Визначення мінімальної інгібуючої концентрації

Для вирощування бактерій використовували МПБ (м'ясо-пептонний бульйон), до якого додавали досліджувані препарати таким чином, щоб їхня концентрація становила відповідно 1, 0,5, 0,25, 0,1 та 0,05 %, а для грибів – пивне сусло, до якого додавали досліджувані препарати таким чином, щоб їхня концентрація становила відповідно 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2 %. В пробірки вносили 0,5 мл суспензії досліджуваних культур з фіксованим вмістом мікробних клітин. Через добу вирощування при 30 °C для бактерій та 25 °C для грибів відмічали пробірки з помутнінням середовища. Мінімальну інгібуючу концентрацію препарату знаходили як середнє значення між концентраціями в останній пробірці, де ріст був відсутнім і в першій пробірці, де він був помічений. З пробірок, де не був помічений ріст, проводили висів по 0,1 мл на чашки Петрі; через дві доби вирощування за температури 30 і 25 °C відмічали наявність росту мікроорганізмів на поверхні середовища і проводили підрахунок колоній та визначали мінімальну бактерицидну (фунгіцидну) концентрацію (МБК, МФК) за аналогічним принципом [5].

2. Встановлення залежності біоцидної активності від часу експозиції

Для проведення дослідів готували серію розведень дезінфекційних препаратів концентрацією 0,1, 0,25, 0,5, 1 % для бактерій та 0,25, 0,5, 0,75, 1, 2 % для грибів. В пробірку з 4,5 мл розчину біоцидного препарату вносили вихідну суспензію мікроорганізма по 0,5 мл. Фіксували час початку досліду і залишали пробірки при кімнатній температурі. Паралельно проводився кількісний облік мікроорганізмів. Через 5, 10, 15, 30, 60 хв експозиції і добу для бактерій та 30, 60, 180 хв експозиції та добу для грибів проводили кількісний облік досліджуваних культур.

Результати та їх обговорення

Результати дослідження бактерицидної і фунгіцидної активностей біоцидних препаратів зведені в табл.1 та 2.

Таблиця 1

Порівняння бактерицидної активності біоцидних препаратів

Культура	Полідез		Віроцид		Фогнет		Жавель-Клейд		Початкова концентрація клітин, КУО/см ³
	МІК, %	МБК, %	МІК, %	МБК, %	МІК, %	МБК, %	МІК, %	МБК, %	
<i>E.coli</i>	0,17	0,37	0,07	0,17	0,17	0,75	0,17	0,37	$5,6 \times 10^4$
<i>B.subtilis</i>	0,17	0,37	0,17	0,37	0,17	0,75	0,17	0,37	$3,93 \times 10^4$
<i>P.aureofaciens</i>	0,17	0,37	<0,0	0,07	0,17	0,75	0,17	0,17	$5,4 \times 10^4$
<i>ns</i>	0,07	0,37	5	5	0,17	0,75	0,17	0,75	$6,58 \times 10^4$
<i>S.aureus</i>	5		0,07	0,37					
			5						

Примітка: МІК- мінімальна інгібуюча концентрація, МБК – мінімальна бактерицидна концентрація.

При дослідженні дії біоцидних препаратів на бактеріальну мікрофлору встановлено, що найнижчі МІК і МБК має препарат Віроцид (містить альдегіди) на грамнегативну *P.aureofaciens* та препарат Полідез (містить похідні ПАГів) на грампозитивну неспороутворювальну *S.aureus*.

Препарати Фогнет (містить альдегіди) та Жавель-Клейд мають вищі МІК і МБК, особливо для спороутворювальної *B.subtilis*, що зумовлене, очевидно, будовою клітинної стінки та змінами у складі клітини під час процесу спороутворення.

Таблиця 2

Порівняння фунгіцидної активності біоцидних препаратів

Культура	Полідез		Віроцид		Фогнет		Жавель-Клейд		Початкова концентрація клітин, КУО/см ³
	МІК, %	МФК %	МІК, %	МФК %	МІК, %	МФК %	МІК, %	МФК %	
<i>Pen.chrysogenum</i>	0,38	1,5	<0,3	<0,5	0,38	0,83	0,38	0,83	2,7x10 ⁴
<i>Asp.niger</i>	0,38	0,88	<0,3	<0,5	0,38	0,63	0,38	0,63	3,5x10 ⁴
<i>Fus.moniliforme</i>	0,38	0,88	<0,3	<0,5	0,38	0,63	0,38	0,63	1,8x10 ⁴

Примітка: МФК – мінімальна фунгістатична концентрація.

При дослідженні дії препаратів на грибну мікрофлору виявлено, що найнижчі МІК і МФК має препарат Віроцид. Препарати Фогнет та Жавель-Клейд для культур *Asp.niger* та *Fus.moniliforme* мають низькі значення МФК, тому для проведення якісної дезінфекції недоцільно використовувати їх концентрації вищі 0,63 %.

Якщо проаналізувати в цілому дію препаратів на різну мікрофлору, то можна сказати, що препарати діють як на спороутворювальні так і неспороутворювальні мікроорганізми, грампозитивні і грамнегативні бактерії. Мінімальні інгібуючі концентрації варіюють від 0,08 – 0,17 % для бактерій та 0,25 – 0,38 % для грибів, а мікробіцидні концентрації варіюють для бактерій в межах 0,17 – 0,75 %, для грибів 0,5 – 1,5 %. Ці значення співпадають з робочими концентраціями препаратів, які наведені в інструкціях. Бачимо, що активність хлоровмісного препарату і препаратів поліалкіленгуанідинової природи майже однакові. На відміну від них препарат, який в якості діючої речовини містить альдегіди –

Фогнет має значно меншу активність. Препарат Віроцид має найнижчі робочі концентрації практично для всіх досліджуваних культур, проте він містить токсичні сполуки. Отже, тільки препарати, які містять похідні поліалкіленгуанідину є водночас і активними, і повністю безпечними для людини та навколишнього середовища.

Проте необхідно зазначити, що ці дані отримані для чутливих до дезінфектантів стандартних лабораторних культур, а в реальних виробничих умовах необхідно застосовувати концентрації робочих розчинів біоцидних препаратів вищі за середні з метою запобігання виникнення популяцій мікроорганізмів резистентних до дезінфектантів [6]. Крім того, один дезінфекційний препарат не можна використовувати більше 3 місяців. Для того, щоб мікроорганізми не адаптувались до конкретного препарату необхідно періодично змінювати біоцидні засоби.

Для проведення якісної дезінфекції важливо знати, яка повинна бути тривалість обробки приміщень для знищення бактеріальних та грибних шкідників. Адже довготривала дезінфекція не тільки веде до економічних витрат, а й може завдати шкоди оточуючому середовищу і здоров'ю працівників. Щоб цього уникнути, необхідно визначити як змінюється активність препаратів залежно від тривалості експозиції. Це дасть можливість підібрати оптимальні для дезінфекції умови (тривалість обробки та концентрацію препарату).

Для проведення дослідів були обрані санітарно-показові мікроорганізми та найпоширеніші шкідники сільського господарства та промисловості (*E.coli*, *B.subtilis*, *S.aureus*, *P.aureofaciens*, *Fus.moniliforme*, *Pen.chrysogenum*, *Asp.niger*). Використовували препарат поліалкіленгуанідинової природи Полідез, дію якого на досліджувану мікрофлору наведено в табл.3 – 9.

Таблиця 3

Залежність бактерицидної активності препарату Полідез від тривалості експозиції для *Escherichia coli*

Концентрація препарату, %	Концентрація клітин, КУО/см ³				
	5 хв	10 хв	30 хв	60 хв	1 доба
0,1	$2,7 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$	80	-
0,25	$1,8 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	90	-	-
0,5	$1,2 \times 10^2$	60	30	-	-
1	-	-	-	-	-

Примітки:

1. „-“ – відсутність росту на чашці.
2. Початкова концентрація клітин $N=4,7 \times 10^4$ КУО/см³

Із дослідних даних бачимо, що для санітарно-показового мікроорганізму *E.coli* дієвою є вже концентрація 0,1 % при тривалості експозиції 1 доба. Для більш швидкої дезінфекції можна використовувати розчин препарату Полідез 0,25 %-ий при тривалості обробки 1 год або ж 1 %-ий, тоді час дезінфекції скорочується до декількох хвилин. Тобто бактерицидна активність препарату пропорційно залежить від тривалості експозиції.

Таблиця 4

Залежність бактерицидної активності препарату Полідез від тривалості експозиції для *Bacillus subtilis*

Концентрація препарату, %	Концентрація клітин, КУО/см ³				
	5 хв	10 хв	30 хв	60 хв	1 доба
0,1	$4,2 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$	70	-
0,25	$2,9 \times 10^2$	$2,2 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	50	-
0,5	$2,4 \times 10^2$	$1,2 \times 10^2$	80	-	-
1	$1,3 \times 10^2$	90	50	-	-

Примітки: початкова концентрація клітин $N=9 \times 10^4$ КУО/см³

Для спороутворювальної бактерії *B.subtilis* дослід показав, що робочою може бути концентрація 0,5 %-ий розчин препарату Полідез при тривалості експозиції 1 год. Однак, для ефективної дезінфекції за наявності спороутворювальних бактерій необхідна досить тривала обробка. Збільшивши тривалість експозиції до однієї доби бачимо, що біоцидно діє розчин препарату концентрацією 0,1 %.

Таблиця 5

Залежність бактерицидної активності препарату Полідез від тривалості експозиції для *Pseudomonas aureofaciens*

Концентрація препарату, %	Концентрація клітин, КУО/см ³				
	5 хв	10 хв	30 хв	60 хв	1 доба
0,1	$3,2 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	90	-
0,25	$2,6 \times 10^2$	10^2	50	30	-
0,5	$1,8 \times 10^2$	70	40	-	-
1	$1,3 \times 10^2$	50	-	-	-

Примітки: початкова концентрація клітин $N=6 \times 10^4$ КУО/см³

Для грамнегативної неспороутворювальної бактерії *P. aureofaciens* дослід показав, що за часу дезінфекції 30 хв бактерицидно діє лише розчину препарату Полідез концентрацією 1 %. Збільшивши ж час експозиції до однієї години ефективним є використання препарату концентрацією 0,5 %. Якщо ж тривалість дії препарату складає добу, то біоцидно діє вже концентрація 0,1 %.

Таблиця 6

Залежність бактерицидної активності препарату “Полідез” від тривалості експозиції для *Staphylococcus aureus*

Концентрація препарату, %	Концентрація клітин, КУО/см ³				
	5 хв	10 хв	30 хв	60 хв	1 доба

0,1	$2,2 \times 10^2$	90	10	-	-
0,25	$1,9 \times 10^2$	50	-	-	-
0,5	$1,1 \times 10^2$	20	-	-	-
1	70	-	-	-	-

Примітки: початкова концентрація клітин $N=7,18 \times 10^4$ КУО/см³

За результатами дослідів для *S.aureus* можна зробити висновок, що ефективною є концентрація 0,25 %-ого розчину препарату Полідез за часу експозиції 30 хв. Протягом годинної обробки бактерицидну дію виявили всі концентрації, починаючи з 0,1 %. Для швидкої дезінфекції протягом 10 хв можна використовувати розчин препарату концентрацією 1 %. Таким чином, залежно від потреб можна підбирати концентрації і час експозиції біоцидних препаратів.

Таблиця 7.

Залежність біоцидної дії препарату Полідез від часу експозиції для *Penicillium chrysogenum*

Концентрація препарату, %	Концентрація клітин, КУО/см ³			
	0,5 год	1 год	3 год	24 год
0,5	$1,4 \times 10^2$	50	10	-
0,75	60	30	-	-
1	15	10	-	-
2	5	-	-	-

Примітки: початкова концентрація клітин $N=2,3 \times 10^4$ КУО/см³

Для досліджуваної культури ефективним є використання розчину препарату концентрацією 0,75 % за тривалості експозиції 3 год. За добової обробки можна застосовувати вже 0,5 % концентрацію. Для швидкої дезінфекції протягом години доцільно застосовувати розчин препарату концентрацією 2 %.

Таблиця 8.

Залежність біоцидної дії препарату Полідез від часу експозиції для *Aspergillus niger*

Концентрація	Концентрація клітин, КУО/ см ³
--------------	---

препарату, %	0,5 год	1 год	3 год	24 год
0,5	$1,5 \times 10^2$	90	50	-
0,75	50	20	15	-
1	30	20	10	-
2	30	10	-	-

Примітки: початкова концентрація клітин $N=2,8 \times 10^4$ КУО/ см³

Ще з попередніх досліджень було виявлено підвищену стійкість клітин культури *Aspergillus niger* до дії всіх дезінфекційних препаратів в різних концентраціях. В цьому випадку також спостерігається підвищена резистентність клітин (порівняно з іншими культурами залишилося більша кількість живих клітин, навіть при високих концентраціях біоцида). Тому навіть за часу експозиції 3 год необхідно застосовувати розчин препарату концентрацією 2 %, а за добової обробки дієвими є всі концентрації препарату починаючи з 0,5 %.

Висновки

Проведена порівняльна характеристика дії біоцидних препаратів – Полідез, Біодез, Вантоцил, Фогнет, Жавель-Клейд, Віроцид, які належать до різних за хімічною природою діючої речовини груп, на бактеріальну (*B.subtilis*, *E.coli*, *P. aureofaciens*, *S. aureus*) і грибну (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*) мікрофлору.

З'ясовано, що препарати на основі ПАГів мають пролонговану дію і їх вплив залежить від особливостей складу клітин мікроорганізмів.

Встановлена відповідність експериментальних даних інструкціям до застосування препаратів. Визначено спектр дії та робочі концентрації для дезінфекційних засобів, які представлені на ринку без належної документації.

Доведено на практиці, що препарати поліалкіленгуанідинової природи мають аналогічну, а в деяких випадках і вищу активність порівняно з традиційними антимікробними препаратами (хлоровмісними, окисниками, препарати, які містять сполуки амонію і т.д.).

Встановлено, що ефективність дії препаратів прямо пропорційна часу експозиції і концентрації препаратів, що дозволяє підбирати робочі концентрації і тривалість обробки ними залежно від потреб.

З'ясовано, що препарат Полідез діє ефективніше на досліджувані мікроорганізми і має нижчі робочі концентрації і час експозиції, ніж препарат Біодез, хоч вони мають однакову хімічну природу.

ЛІТЕРАТУРА

1.Булдаков А.С. Препараты для дезинфекции. – М.: ДеЛи принт, 2001. -436 с.

2.Довідник лікаря ветеринарної медицини / П.І. Вербицький, П.П. Достоевський, В.О. Бусол та ін.; За ред. П.І. Вербицького, П.П. Достоевського.- К.: Урожай, 2004. – 1280 с.

3.Ефимов К. Полиалкиленгуанидины – экологически безопасные биоцидные полимеры и вспомогательные материалы. // Барьер безопасности. Экологический журнал.-2004.-№1.- с. 6-8.

4.Поликарпов Н. Действие ПАГов на микро- и макроорганизмы – две стороны одной медали. // Барьер безопасности. Экологический журнал.-2004.-№1.- с. 9-12.

5.Слюсаренко Т.П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств. М.: Лег. и пищ. пром-сть. 1984.- 137 с.

6. Морозова Н.С., Корженевский С.В., Тюленев А.В. Дезрезистентность микроорганизмов в проблеме внутрибольничных инфекций. // Вестник ассоциации. Ассоциация дезинфекционистов Украины. – 2001. №3. – с. 4-5.

Надійшла до редколегії