

## ВПЛИВ ДЕЗИНФІКУЮЧОГО ЗАСОБУ "ЕНЗИДЕЗ" НА ТЕСТ-ОБ'ЄКТИ КОНТАМІНОВАНІ МІКРООРГАНІЗМАМИ

М. Кухтин<sup>1</sup>, В. Кожин<sup>2</sup>, Ю. Горюк<sup>2</sup>, В. Горюк<sup>2</sup>, Н. Гриневич<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

<sup>2</sup>Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»

<sup>3</sup>Білоцерківський національний аграрний університет

У статті наведено дослідження з визначення бактерицидної активності дезінфікуючого засобу "Ензидез" за різних концентрацій щодо бактерій нанесених на тест-об'єкти. Встановлено, що деззасіб "Ензидез" за 0,05 % концентрації протягом 15 хв дії не забезпечував знезараження поверхні кахельної плитки та нержавіючої сталі від штамів *S. aureus* *B. subtilis* та *Candida spp.* Для знищення бактерійної і грибової мікрофлори на поверхні нержавіючої сталі та у глибині кахелю необхідно, щоб робоча концентрація Ензидезу була не нижче 0,1 % та експозиція не менше 15 хв.

**Ключові слова:** засіб "Ензидез", кахельна плитка, нержавіюча сталь, дезінфекція, бактерицидна дія.

**Постановка проблеми** Хімічні дезінфікуючі засоби широко використовуються у медицині, ветеринарії, харчовій промисловості для знищення або зменшення рівня контамінації різних об'єктів та у боротьбі з інфекціями у лікарнях, тваринницьких приміщеннях та виробничих цехах [1, 2, 3]. Залежність народного господарства від дезінфікуючих засобів постійно зростає через профілактичні стратегії і розвиток резистентності у мікроорганізмів [4, 5]. Тому на ринку з'являються все нові дезінфікуючі засоби з різним механізмом біоцидної активності щодо широкого кола патогенів.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** Нині на ринку України наявна значна кількість дезінфікуючих засобів, як вітчизняного, так закордонного виробництва [6, 7]. Дезінфікуючі засоби містять біоцидні речовини різного походження, зокрема на основі хлору – хлорвмісні засоби, на основі активного йоду, з четвертино амонієвими сполуками, з вмістом перекису водню, надаптової кислоти, альдегідів, наночасточок металів, гуанідину, тощо [8, 9, 10, 11].

Однак, навіть за значної кількості дезінфікуючих засобів із різними антибактеріальними речовинами, ідеальних засобів, які в повній мірі забезпечують потреби виробництва, практично немає через постійно зростаючі вимоги та швидку адаптацію мікрофлори [12, 13]. Тому науковці постійно проводять дослідження із синтезу нових антибактеріальних субстанцій та створення сучасних дезінфікуючих засобів.

Перш, ніж впровадити у виробництво кожен дезінфікуючий засіб на шляху від розробки до закінчення виробничих експериментів піддається ретельному лабораторному дослідженню за комплексом показників: мікробіологічна характеристика, фізико-хімічна оцінка, токсикологічні параметри, тощо [14, 15]. У дослідженнях [16, 17] повідомляється, що на етапі мікробіологічної характеристики новоствореного дослідного зразку деззасобу необхідно визначити його активність щодо різних родів паспортизованих штамів мікроорганізмів. Глибока мікробіологічна оцінка дезінфектанту дозволяє підібрати орієнтовні режими його апробації у виробництві. Нами розроблено новий дезінфікуючий засіб "Ензидез" із вмістом четвертинних амонієвих сполук, похідних гуанідину та протеолітичних і ліполітичних ензимів. Попередні лабораторні дослідження [18, 19] показали, що створений деззасіб є високоактивним відносно бактерій у біоплівках та мікрофлори навіть за значного органічного забруднення. Тому проведення подальших лабораторних досліджень з використанням різних тест-об'єктів дасть змогу всебічно встановити його протимікробний ефект.

**Мета дослідження:** визначити бактерицидну активність розробленого дезінфікуючого засобу "Ензидез" за різних концентрацій щодо бактерій нанесених на тест- об'єкти.

**Матеріал і методика досліджень.** Дослідження проведені на факультеті ветеринарної медицини і технологій у тваринництві Закладу вищої освіти «Подільський державний

університет». У роботі використані паспортизовані штами бактерій *E. coli* (055K59 №3912/41), *S. aureus* (ATCC 25923), *B. subtilis* (6633 ATCC) і дріжджів *Candida spp.* (ATCC 885-653). Пластинки з нержавіючої сталі марки AISI 321 розміром 10×10 см та кахельної плитки того ж розміру. Для підготовки тест-об'єктів їх ретельно промивали чистою водопровідною водою, висушували та стерилізували автоклавуванням за температури  $121 \pm 1$  °C протягом 60 хв. Під час проведення досліджень готували суспензію тест-культур за оптичним стандартом каламутності МакФарланда – standard 2 з кількістю мікробних клітин  $2,0 \times 10^9$  КУО/см<sup>3</sup> [12]. Потім на кожен тест-пластинку наносили суспензію культури (*E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* або *Candida spp.*) у кількості 5 см<sup>3</sup> та рівномірно розтирали за допомогою шпателя по всій поверхні. Висушували за кімнатної температури  $21 \pm 0,5$  °C протягом 3 годин. Далі тест-пластинки ставили в кювети та дезінфікували їх дезінфікуючим засобом "Ензидез" за різних концентрацій та температури розчинів  $20 \pm 0,5$  °C методом нанесення 5,0 см<sup>3</sup> розчину на тест-об'єкт з подальшим розтиранням по всій поверхні. Після експозиції 15 та 30 хв відбирали змиви за допомогою тампону з поверхні та після розколювання кахелю з глибини 0,5 – 1 см. Змиви засівали у стерильний м'ясопептонний бульйон та інкубували протягом 24 год за температури  $37 \pm 0,5$  °C. За наявності помутніння бульйону робили відсів з нього на кров'яний агар з натрієм хлоридом для встановлення росту *S. aureus*, на середовище Ендо для *E. coli*, на МПА для *B. subtilis* та на середовище Сабуро для встановлення наявності дріжджів *Candida spp.*

Усі дослідження проводили в трьох разовій повторності, а отримані дані статистично обробляли з використанням комп'ютерної програми Statistica 6.0 (StatSoft Inc., USA). Результати вважали достовірними за  $p < 0,05$ .

**Результати досліджень.** У виробничих умовах дезінфікуючі засоби повинні бути активні не тільки на поверхні об'єкту, що дезінфікується, але й проникати в глибину будівельних матеріалів. Найчастіше об'єкти ветеринарного нагляду стіни, підлога виробничих приміщень вистелені кахельною плиткою або шліфованим бетоном. Столи, вікна, двері та інший інвентар виготовлені з нержавіючої сталі або пластику, тому при розробці нових дезінфікуючих засобів проводять серію дослідів щодо знезаражувальної дії як поверхні об'єкту, так і можливість їх проникати в середину капілярної системи матеріалу. Проведені у лабораторних умовах на тест-об'єктах такі дослідження дозволяють глибше проаналізувати бактерицидну ефективність деззасобу та точніше обґрунтувати його можливу робочу концентрацію. У досліді використали мінімальну дезінфікуючу концентрацію деззасобу "Ензидез", яка була активна у суспензійному методі до даних тест-штамів бактерій [18]. У табл. 1 наведено дослідження активності деззасобу "Ензидез" відносно шт. *S. aureus* нанесеного на тест-об'єкти кахельна плитка і нержавіюча сталь.

Таблиця 1. Вплив деззасобу "Ензидез" на тест-об'єкти (кахельна плитка та нержавіюча сталь), які контаміновані шт. *S. aureus*, n=18

Концентрація деззасобу, %	Тест об'єкти					
	кахельна плитка				нержавіюча сталь	
	Час експозиції, хв					
	15		30		15	30
	точка відбору				точка відбору	
	з поверхні	з товщі	з поверхні	з товщі	з поверхні	
0,25	–	–	–	–	–	–
0,1	–	–	–	–	–	–
0,05	+	+	–	+	+	–
Контроль (дистильована вода)	+	+	+	+	+	+

Примітка: "+" – наявність живих клітин; "–" – відсутність живих клітин

З даних табл. 1 видно, що деззасіб "Ензидез" за 0,05 % концентрації протягом 15 хв дії не забезпечував знезараження поверхневого шару кахельної плитки та нержавіючої сталі від штамів *S. aureus*. Водночас збільшення експозиції до 30 хв за даної концентрації забезпечувало

дезінфікуючий ефект відносно *S. aureus* на поверхні даних тест-об'єктів. Проте, з товщі кахельної плитки виділялися бактерії *S. aureus*, що вказує на недостатнє проникнення у капілярну систему кахелю деззасобу у даній концентрації. Недостатній дезінфікуючий ефект деззасобу у 0,05 % концентрації в товщі кахельної плитки на нашу думку пов'язаний із високим поверхневим натягом, внаслідок чого засіб не здатний проникати в глибину будівельних матеріалів і забезпечувати дезінфікуючу дію. Тому в такому випадку рекомендується збільшувати концентрацію засобу або вводити у його склад речовини, які знижують поверхневий натяг. Відповідно до наших фізико-хімічних досліджень деззасобу "Ензидез", поверхневий натяг його 0,05 % розчину становив  $52,61 \pm 0,04$  мН/м, що є недостатнім для доброго змочування капілярної системи тест-об'єктів.

Збільшення концентрації деззасобу до 0,1 % та вище, викликало дезінфікуючий ефект відносно *S. aureus* протягом 15 хв дії, як на поверхні об'єктів, так в товщі кахельної плитки.

Дезінфікуюча активність Ензидезу відносно грамнегативної мікрофлори – паспортизованого штаму *E. coli* наведена в табл. 2.

Таблиця 2. Вплив деззасобу "Ензидез" на тест-об'єкти (кахельна плитка та нержавіюча сталь), які контаміновані шт. *E. coli*, n=18

Концентрація деззасобу, %	Тест об'єкти					
	кахельна плитка				нержавіюча сталь	
	Час експозиції, хв					
	15		30		15	30
	точка відбору				точка відбору	
	з поверхні	з товщі	з поверхні	з товщі	з поверхні	
0,25	–	–	–	–	–	–
0,1	–	–	–	–	–	–
0,05	–	+	–	+	–	–
Контроль (дистильована вода)	+	+	+	+	+	+

Примітка: "+" – наявність живих клітин; "–" – відсутність живих клітин

З даних табл. 2 видно, що деззасіб "Ензидез" за 0,05 % концентрації проявляв дезінфікуючу дію протягом 15 хв експозиції відносно кишкової палички на поверхні тест-об'єктів кахельної плитки і нержавіючої сталі. Проте, дана концентрація не знищувала клітини *E. coli* в товщі кахелю навіть за 30 хв експозиції. Даний факт підтверджує результати попереднього дослідження, щодо поганої змочувальної здатності засобу за 0,05 % концентрації через високий поверхневий натяг.

Якщо порівняти дію дезінфікуючого засобу "Ензидез" на золотистий стафілокок з дією на кишкову паличку, то можна відзначити, що клітини *E. coli* виявилися менш стійкими до 0,05 % концентрації засобу "Ензидез", порівнюючи з бактеріями *S. aureus*. Так, як за 15 хв експозиції засобу на поверхні нержавіючої сталі відмічалася дезінфікуюча дія відносно *E. coli*, а для знищення *S. aureus* необхідно збільшення експозиції до 30 хв за даної концентрації.

Поряд із вивченням впливу засобу "Ензидез" на санітарно-показові бактерії нами для більш повної оцінки його дезінфікуючої здатності було досліджено активність дезінфектанту щодо спороутворюючої мікрофлори – *Bacillus subtilis*. Результати дослідження наведено в табл. 3.

З даних наведених у табл. 3 спостерігаємо, що дезінфікуюча дія Ензидезу щодо *B. subtilis* була аналогічна впливу його відносно *S. aureus*. Зокрема, за 0,05 % концентрації протягом 15 хв експозиції відмічається ріст культур бактерій, а за дії протягом 30 хв бактерицидний ефект проявляється на поверхні тест-об'єктів. Також відмічаємо відсутність бактерицидного ефекту засобу у товщі кахельної плитки через 30 хв експозиції у зв'язку з неспроможністю його заповнити капілярну систему кахелю. За 0,1 % концентрації дезінфектанту бактерицидний ефект проявляється на поверхні, так і в товщі кахелю.

Таблиця 3. Вплив деззасобу "Ензидез" на тест-об'єкти (кахельна плитка та нержавіюча сталь), які контаміновані шт. *B. subtilis*, n=18

Концентрація деззасобу, %	Тест об'єкти					
	кахельна плитка				нержавіюча сталь	
	Час експозиції, хв					
	15		30		15	30
	точка відбору				точка відбору	
	з поверхні	з товщі	з поверхні	з товщі	з поверхні	
0,25	–	–	–	–	–	–
0,1	–	–	–	–	–	–
0,05	+	+	–	+	+	–
Контроль (дистильована вода)	+	+	+	+	+	+

Примітка: "+" – наявність живих клітин; "–" – відсутність живих клітин

Активність Ензидезу щодо грибової мікрофлори наведена в табл. 4. Результати досліджень виявили, що грибова (дріжджова) мікрофлора виявилася стійкішою за бактерійну (санітарно-показову і спороутворюючу), так як для її знищення необхідна вища концентрація деззасобу "Ензидез". Зокрема результати показали, що за 0,05 % концентрації деззасобу відмічався ріст дріжджів на поверхні кахелю і нержавіючої сталі навіть протягом 30 хв експозиції. Водночас даний режим санобробки знезаражував поверхні тест-об'єктів, які були контаміновані бактерійною мікрофлорою. Для знищення дріжджів роду *Candida spp.* на поверхні нержавіючої сталі та у глибині кахелю необхідно було підвищити робочу концентрацію Ензидезу до 0,1 % та експозицію не менше 15 хв.

Таблиця 4. Вплив деззасобу "Ензидез" на тест-об'єкти (кахельна плитка та нержавіюча сталь), які контаміновані шт. *Candida spp.*, n=18

Концентрація деззасобу, %	Тест об'єкти					
	кахельна плитка				нержавіюча сталь	
	Час експозиції, хв					
	15		30		15	30
	точка відбору				точка відбору	
	з поверхні	з товщі	з поверхні	з товщі	з поверхні	
0,25	–	–	–	–	–	
0,1	–	–	–	–	–	
0,05	+	+	+	+	+	
Контроль (дистильована вода)	+	+	+	+	+	

Примітка: "+" – наявність живих клітин; "–" – відсутність живих клітин

Отже, отримані дані проведених досліджень дають підставу стверджувати, що розроблений дезінфікуючий засіб "Ензидез" проявляє добрий дезінфікуючий ефект на поверхні і вглибині тест-об'єктів, щодо умовно-патогенних, спороутворюючих бактерій та грибової мікрофлори за 0,1 % концентрації та часу дії не менше 15 хв. Крім того, наші результати узгоджуються з дослідженнями авторів [16, 20], які повідомляють про високу активність дезінфікуючих засобів у склад, яких входять антибактеріальні субстанції похідні гуанідину та четвертино амонієвих сполук (ЧАС). Зокрема, дезінфікуючі засоби "Санактив", "Сандез" з діючою дезінфікуючою речовиною із групи ЧАС – катамін за 0,5 – 1,0 % концентрації проявляли бактерицидну дію на штами золотистого стафілококу, кишкової і синьогнійної палички протягом 10 хв експозиції і температури розчинів  $60 \pm 5$  °C [16]. Дезінфікуючий засіб "Аргіцид", який містить діючу речовину похідну полігуаніду – полігексаметиленгуанідину гідрохлорид (ПМГ) у

0,5 % з концентрації та дії протягом 30 хв, проявляв ефективні бактерицидні властивості щодо *S. aureus* і *E. coli* [20]. У нашому випадку поєднання ЧАС, ПМГ та ензимів в умовах *in vitro* забезпечувало посилення дезінфікуючого впливу, як на грампозитивну, так на грамнегативну мікрофлору. Тому ми вважаємо, що використання деззасобу "Ензидез" буде мати значні перспективи у ветеринарній медицині у боротьбі з широким спектром мікроорганізмів на об'єктах ветеринарного нагляду.

**Висновки.** Встановлено, що деззасіб "Ензидез" за 0,05 % концентрації протягом 15 хв дії не забезпечував знезараження поверхні кахельної плитки та нержавіючої сталі від штамів *S. aureus*, *B. subtilis* та *Candida spp.*. Водночас даний режим забезпечував знищення *E. coli* на поверхні тест-об'єктів. Збільшення експозиції до 30 хв забезпечувало дезінфікуючий ефект на поверхні тест-об'єктів відносно *S. aureus*, *B. subtilis* та *E. coli*. Виявлено відсутність бактерицидного ефекту засобу за 0,05 % концентрації у товщі кахельної плитки через 30 хв експозиції у зв'язку з неспроможністю його заповнити капілярну систему кахелю.

Встановлено, що для знищення бактерійної і грибової мікрофлори на поверхні нержавіючої сталі та у глибині кахелю необхідно, щоб робоча концентрація Ензидезу була 0,1 % та експозиція не менше 15 хв.

**Перспективи подальших досліджень** полягають у проведенні токсикологічних та виробничих досліджень розчинів засобу "Ензидез".

#### Список використаних джерел

1. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments / M. Abdallah et al. *Archives Microbioljgy*. 2014. Vol. 196, №7. P. 453–472. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1>
2. Sub-minimum inhibitory concentrations of biocides induced biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* / S. Hemati et al. *New Microbes and New Infections*. 2020. Vol. 38. P. 1-16. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100794>
3. Changes in lipid composition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* cells under the influence of disinfectants Barez, Biochlor and Geocide / V. Kovalenko et al. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 547–550. [https://doi.org/10.15421/2018\\_248](https://doi.org/10.15421/2018_248)
4. Modeling the process of microbial biofilm formation on stainless steel with a different surface roughness / M. Kukhtyn et al. *Eastern-European journal of Enterprise Technologies*. 2019. Vol. 2/11, № 98. P. 14–21. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2019.160142>
5. Evaluation of acute toxicity of the "Orgasept" disinfectant / A. Palii et al. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2020. Vol. 10, № 4. P. 273-278. [https://doi.org/10.15421/2020\\_199](https://doi.org/10.15421/2020_199)
6. Research of safety and toxicity of drug "Biozapin" / O. Chechet et al. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2021. Vol. 23, № 103. P. 157-161. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10322>
7. Activity of washing-disinfecting means "San-active" for sanitary treatment of equipment of meat processing enterprises in laboratory and manufacturing conditions / V. Salata et al. *Ukrainian journal of veterinary and agricultural sciences*. 2018. Vol. 1, № 1. P. 10-16. <https://doi.org/10.15421/ujvas1-1.02>
8. Formation and control of disinfection byproducts and toxicity during reclaimed water chlorination: A review / Y. Du et al. *Journal of Environmental Sciences*. 2017. Vol. 58. P. 51-63. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.01.013>
9. Poppendieck D., Hubbard H., Corsi R. L. Hydrogen Peroxide Vapor as an Indoor Disinfectant: Removal to Indoor Materials and Associated Emissions of Organic Compounds. *Environmental Science & Technology Letters*. 2021. Vol. 8, № 4. P. 320-325. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0447-5>
10. Lineback C.B., Nkemngong C.A., Wu S.T. Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*. 2018. Vol. 7. P. 1-10. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0447-5>

11. Embryotoxic and teratogenic effects of Vitosept on white rats / M. Soltys et al. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafe*. 2019. Vol. 5, № 4. P. 22-26. <https://doi.org/10.36016/JVMBBS-2019-5-4-6>

12. Методичні рекомендації з визначення бактерицидної активності та контролю відсутності бактериостатичного ефекту дезінфікуючих засобів: методичні рекомендації / В. Л. Коваленко та ін. Київ, 2019. 38 с.

13. Chlorine disinfection promotes the exchange of antibiotic resistance genes across bacterial genera by natural transformation / M. Jin et al. *The ISME Journal*. 2020. Vol. 14. P. 1847-1856. <https://doi.org/10.1038/s41396-020-0656-9>

14. Рекомендації щодо санітарно-мікробіологічного дослідження змивів з поверхонь тест-об'єктів ветеринарного нагляду і контролю: методичні рекомендації / О. М. Якубчак та ін. Київ: Національний аграрний університет, 2005. 18 с.

15. Dynamics of morphological and biochemical parameters in the blood of white mice under the action of the drug "Vitosept" / M. Soltys et al. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2020. Vol. 22, № 99. P. 167-172. <https://doi.org/10.32718/nvlvet9925>

16. Салата В. З., Кухтин М. Д., Перкій Ю. Б., Супрович Т. М. Бактерицидна активність мийно-дезінфікуючого засобу Сан-актив на тест-об'єктах відносно *E. coli* та *S. aureus*. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини*. 2015. Вип. 31, № 2. С. 245-248.

17. Biofilm formation in bovine mastitis pathogens and the effect on them of antimicrobial drugs / Y. Horiuk et al. *Independent journal of management and production*. 2019. Vol. 7, № 10. P. 897-910. <https://doi.org/10.14807/ijmp.v10i7.1012>

18. The activity of the disinfectant "Enzidez" against bacteria in biofilms / V. Kozhyn et al. *Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences*. 2021. Vol. 23, № 101. P. 67-74. <https://doi.org/10.32718/nvlvet10112>

19. Activity of disinfecting biocides and enzymes of proteases and amylases on bacteria in biofilms / M. Kukhtyn et al. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2021. Vol. 27, № 4. P. 495-502. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2021.25770>

20. Визначення бактерицидності комплексного дезінфікуючого препарату на основі полігексаметиленгуанідин гідрохлориду / В. Л. Коваленко та ін. *Ветеринарна біотехнологія*. 2011. Вип. 18. С. 65-70.

## INFLUENCE OF DISINFECTANT "ENZIDEZ" ON TEST OBJECTS CONTAMINATED MICROORGANISMS

Kukhtyn M., Kozhyn V., Horiuk Y., Horiuk V., Grinevich N.

*The article presents studies to determine the bactericidal activity of the Enzidez disinfectant at various concentrations in relation to bacteria applied to test objects. It was found that the disinfectant "Enzidez" at 0.05 % concentration within 15 minutes of action did not provide disinfection of the surface of tiles and stainless steel from *S. aureus*, *B. subtilis* and *Candida* spp. To destroy bacterial and fungal microflora on the surface of stainless steel in the depth of the tile, it is necessary that the working concentration of Enzidez is not less than 0.1 % and the exposure is not less than 15 minutes.*

**Key words:** Enzidez agent, tiles, stainless steel, disinfection, bactericidal action.