

УДК 578.81

ДОСЛІДЖЕННЯ ВІРУСОЦИДНОЇ АКТИВНОСТІ ДЕЗІНФІКУЮЧИХ ЗАСОБІВ

*Науменко Оксана Василівна к.т.н., ст. науковий співробітник
Інститут продовольчих ресурсів НААН України*

Naumenko O.

Institute of food resources of National Academy of Agrarian Sciences

Анотація: проведено скринінг фізико-хімічних факторів, які інгібують фаголізис заквашувальної мікрофлори. Встановлено терморезистентність вірулентних бактеріофагів, виділених на молокопереробних підприємствах, яка обумовлює їх небезпеку і необхідність пошуку дієвіших інгібіторних факторів впливу на їхню життєздатність. Досліджено інфекційність лактофагів до та після обробки різними дезінфікуючими засобами та визначено ступінь їхньої інактивації. Дезінфікуючі засоби, до складу яких входили пероксид водню та надоцтова кислота, четвертинні амонієві сполуки, активний хлор, характеризувались високою вірусоцидною активністю. Встановлено, що для вибору ефективного режиму протифагової обробки (формула та мінімальна інгібуюча концентрація деззасобу, температура впливу, час експозиції) необхідно визначити рівень фагової контамінації та вид фагів, які циркулюють на конкретному підприємстві.

Ключові слова: лактобактерії, фаги, дезінфікуючий засіб, інактивація.

Постановка проблеми

Однією з головних причин низької активності заквасок під час отримання молочних ферментованих продуктів є лізис культур, спричинений бактеріофагами. Незважаючи на запровадження таких заходів боротьби з фаговою інфекцією, як використання багатоштамових заквасок та їх ротацій, проблема фаголізису залишається однією з найактуальніших для молочної галузі. При створенні системи боротьби з бактеріофагом важливого значення набуває запровадження нових сучасних підходів щодо організації виробництва різноманітної молочної продукції, в тому числі використання ефективних, економічно вигідних програм мийки та дезінфекції, здатних забезпечити не тільки мікробіологічну, а й вірусологічну безпеку виробництва та цільових продуктів, зокрема, здатних попередити чи інгібувати ріст і накопичення фагів молочнокислих бактерій.

Аналіз останніх досліджень та публікацій

На сьогодні в літературі з'явилося чимало повідомлень про дослідження ефективності різних за складом дезінфікуючих засобів за їхньою здатністю забезпечити необхідні санітарно-гігієнічні умови на підприємствах молочної та сироробної галузей. Такі дослідження спрямовані переважно на вивчення механізмів антимікробної активності цих засобів, інколи повідомляється про фунгіцидну, бактерицидну дію на мікобактерії, плісені, мікроміцети тощо [1-2]. В той же час інформація щодо впливу дезінфікуючих засобів на бактеріофаги молочнокислих бактерій є вкрай обмеженою.

Вклад основного матеріалу дослідження

Метою роботи було - дослідити вплив різних за складом дезінфікуючих засобів на інфекційність вірулентних бактеріофагів молочнокислих бактерій.

Об'єктами досліджень були вірулентні, виділені за промислових умов, бактеріофаги з колекції відділу біотехнології ППР; зразки дезінфікуючих засобів, дозволені до застосування на підприємствах молочної галузі, які були люб'язно надані Ю.Ю. Кодаш (ТОВ «Лізоформ», м. Київ).

У роботі застосовували вірусологічні методи досліджень. До стерильної дистильованої води вносили розчин того чи іншого деззасобу (концентрацію контролювали за вмістом діючої речовини згідно з

МВ) та додавали фаголізати молочнокислих бактерій. У дослідах використовували фаги, видоспецифічні щодо *Lactococcus lactis*, вихідний титр 10^6 , 10^8 БУО/см³, відповідно II та III рівні фагового забруднення згідно [3]. Реакційну суміш перемішували, витримували за необхідної температури (20-22), (70-72), (80-82) °С та періодично робили висіви на наявність активних бактеріофагів, використовуючи метод подвійного агару з додаванням 10 мМ CaCl₂ [4]. Вірусоцидну активність деззасобів оцінювали за різницею між величинами залишкового титру фагів у стерильній дистильованій воді без та з додаванням дезінфектанта.

Було досліджено вірусоцидні властивості 7 дезінфікуючих засобів, до складу яких входять різні хімічні речовини. Склад засобів та режими дезобробки згідно з методичними вказівками щодо їхнього застосування (надалі МВ) подано в таблиці 1.

Таблиця 1

Характеристика дезінфікуючих засобів

Засіб	Діюча речовина	Режими обробки (згідно з МВ)
№ 1	надоцтова кислота – не менше 15%, пероксид водню	(0,01-0,2)% (за препаратом), (0,5-20) хв, холодна дезінфекція
№ 2	гіпохлорит натрію - не менше 10% (за активним хлором)	(0,1-3,0)% (за препаратом), (10-20) хв, (5-20)°С
№ 3	алкілдиметилбензиламоній хлорид - 15%	(0,03-10,0)% (за препаратом), (1-240) хв, (50-90)°С
№ 4	похідні алкіламіну - 23,2%, похідні гуанідину - 8,9%, дидецилдиметиламоній хлорид – 5,0%	(0,25-2,0)% (за препаратом), (5-60) хв, холодна дезінфекція
№ 5	похідні гуанідину - 2,9%, дидецилдиметиламоній хлорид – 9,8%	(0,75-2,0)% (за препаратом), (30-60) хв, холодна дезінфекція
№ 6	фосфорна кислота, похідні бігуанідину	(0,5-1,5)% (за препаратом), (1-5)с/хв, (60-80)°С
№ 7	пероксид водню - 35%	(0,1-1,0)% (за препаратом), (5-15) хв, (20-80)°С

Встановлено, що найбільшу згубну дію на бактеріофаги молочнокислих бактерій під час проведення «холодної дезінфекції», тобто за температури (20-22)°С, виявили деззасоби №1 та №3. Результати досліджень представлено на рис. 1.

Показано, що вже після (5-10) хв після такої обробки було зафіксовано 100% інактивацію фагів. Необхідно зауважити, що засіб №3 згідно МВ рекомендовано застосовувати за (50-90)°С, але навіть за температури (20-22)°С цей дезінфектант характеризувався високою протифаговою дією.

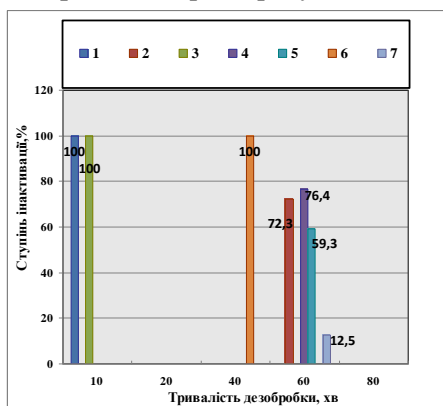


Рис. 1. Ефективність інгібуючого впливу деззасобів на бактеріофаги

Усі інші деззасоби були дещо менш ефективними в умовах «холодної дезінфекції», але також

проявляли вірусцидну активність в тому чи іншому ступеню. Цікавим фактом є те, що пероксид водню, як єдина діюча речовина (деззасіб №7), за температури (20-22)°C був значно слабкішим за протифагову дією, ніж у сполученні з надоцтовою кислотою (деззасіб №1).

Високий фагоцидний вплив деззасобів з такими діючими речовинами, як пероксид водню та надоцтова кислота, та комплекс четвертинних амонієвих сполук (ЧАС) було встановлено також і науковцями з Росії [5].

У таблиці 2 подано результати випробувань впливу температури на фаги лактобактерій у стерильній воді без додавання дезінфектанту. Як видно із наведених даних підвищення температури не забезпечувало повного фагоцитного ефекту – навіть за температури 90°C титр фагів не знижувався нижче за 10^2 БУО/см³. Отримані експериментальні данні вказують на значну резистентність бактеріофагів, виділених на молокопереробних підприємствах, до дії високих температур, яка обумовлює їх небезпеку і необхідність пошуку додаткових або інших інгібіторних факторів впливу на їхню життєздатність.

Таблиця 2

Вплив температурної обробки на життєздатність бактеріофагів

Час обробки, хв.	Температура обробки					
	20-24°C		70-72°C		90°C	
	I*	II	I	II	I	II
0	10^{8**}	10^6	10^8	10^6	10^9	10^7
20	10^8	10^6	10^5	10^3	10^5	10^3
40	10^8	10^6	10^5	10^3	10^4	10^2
60	10^8	10^6	10^4	10^3	10^3	10^2

Примітка: * I, II – групи фагів (розрізняються за морфотипами та інфекційністю);

** - титр бактеріофагів, БУО/см³

Цілий ряд деззасобів виробники пропонують застосовувати за збільшення температури реакційного розчину від 20 до 80°C. Тому досліджували залежність величини впливу таких засобів від температури обробки.

Результати досліджень деззасобу № 7 показали, що під час «холодної дезінфекції» титр фагів знизився неістотно. Після 60 хв такої обробки за максимальної концентрації хімічного фактору (згідно МВ) загинуло в середньому лише 12,5% фагів, в той час як при нагріванні за температури 70°C загинуло у 3,6 - 4,0 разів більше фагів, залежно від початкового рівня фагового забруднення. При збільшенні температури до 80-82°C обробка 1,0% дезрозчином упродовж 20 хв давала стійкий противірусний ефект незалежно від рівня вихідного забруднення (табл. 3). Отже, одночасне поєднання фізико-хімічних чинників (температура та хімічна речовина) мало дієвіший протифаговий ефект.

Таблиця 3

Динаміка впливу деззасобу №7 на бактеріофаги

Час, хв.	Концентрація робочого розчину, % (за препаратом)							
	0,3%, 20-24°C	0,3%, 70-72°C	0,6%, 20-24°C	0,6%, 70-72°C	1,0%, 20-24°C	1,0%, 70-72°C	1,0%, 80-82°C	3,0%,80- 82°C
	10 ⁸ * БУО/см ³ III рівень фагового забруднення							
20	10^8	10^5	10^8	10^5	10^8	10^5	10^1	0
40	10^8	10^5	10^7	10^5	10^7	10^5	0	0
60	10^8	10^5	10^7	10^4	10^7	10^4	0	0
	10 ⁶ * БУО/см ³ II рівень фагового забруднення							
20	10^6	10^5	10^6	10^5	10^6	10^3	0	0
40	10^6	10^5	10^5	10^5	10^5	10^3	0	0
60	10^6	10^5	10^5	10^4	10^4	10^3	0	0

Примітка: * - титр бактеріофагів, БУО/см³

Дослідження вірусцидної активності засобу №6 також показало прискорення знезаражувального впливу під час нагрівання. Так, його мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) за 70-72°C для фагів II рівня фагового забруднення становила 0,3%, а для фагів III рівня фагового забруднення - 0,6%, відповідно, в 5 та 2,5 разів менша ніж без прогрівання. Максимальний протифаговий ефект встановлено за наступних умов: температура обробки 80-82°C, тривалість експозиції від 1 до 5 хв, МІК - 0,5% (див. табл. 4).

Таблиця 4

Вірусцидна активність деззасобу №6

Початковий рівень фагів	Мінімальна інгібуюча концентрація МІК, %	Тривалість обробки, хв	Температура обробки, °C
III рівень (10^8 БУО/см ³)	1,5	60	20-24
	1,7	40	
	3,0	10	
	0,6	30	70-72
	3,0	10	
	0,5	5	
	1,5	менше 5	
II рівень (10^6 БУО/см ³)	1,5	60	20-24
	3,0	10	
	0,3	40	70-72
	0,6	30	
	1,5	10	
	0,5	менше 5	80-82
	1,5	1	

Порівняння швидкості інактивації фагів залежно від рівня початкового забруднення показало, що фаги у високому титрі 10^8 БУО/см³ (III рівень, самий небезпечний) характеризувались більшою стійкістю до дії препарату порівняно з фагами з середнім титром 10^6 БУО/см³ (II рівень, критичний).

Висновки

Показано, що ефективність антифагової дії залежить від збалансованості формули деззасобу - вона повинна містити декілька активних діючих речовин у співвідношеннях, які дозволяють досягти максимального синергічного впливу щодо бактеріофагів лактобактерій. Встановлення оптимальних режимів протифагової обробки (МІК деззасобу, температура, час експозиції) потребує враховувати рівень фагового забруднення, вид та властивості фагів, які циркулюють на конкретному підприємстві.

Список літератури

1. Кузина Ж.И. Основные пути повышения санитарного состояния молочного производства / Ж.И. Кузина // Молочная промышленность. - 2006. - № 11. - С. 66-67.
2. Пономаренко Г.В. Оцінка ефективності бактерицидної дії дезінфікуючих препаратів на мікобактерії: автореф. дис. канд. вет. наук: 16.00.03 Ветеринарна мікробіологія та вірусологія / Геннадій Володимирович Пономаренко; Ін-т експерим. і клініч. вет. медицини УААН. - X., 2004. - 19 с.
3. Науменко О.В. Вплив фагового забруднення на технологічні показники процесу виробництва та якості кисломолочних продуктів / О.В. Науменко, Н.Ф. Кігель // Вісник аграрної науки. - 2009. - № 10. - С. 63-67.
4. Адамс М. Бактериофаги / М. Адамс. - М.: Мир, 1961. - 527 с. : іл.
5. Нагула М.Н. Функционирование и антифаговые действия дезинфицирующих средств / М.Н. Нагула, Л.С. Кузнецова, В.И. Ганина // Сыроделие и маслоделие. - 2007. - № 1. - С. 38-40.

References

1. Kuzina Zh.I. Osnovnye puti povysheniya sanitarnogo sostojaniya molochnogo proizvodstva / Zh.I. Kuzina //

Molochnaja promyshlennost'. - 2006. - № 11. - S. 66-67.

2. Ponomarenko G.V. *Ocinka effektivnosti baktericidnoї дії dezinfikujuchih preparativ na mikobakterii: avtoref. dis. kand. vet. nauk: 16.00.03 Veterinarna mikrobiologija ta virusologija / Gennadij Volodimirovich Ponomarenko; In-t eksperim. i klinich. vet. medicini UAAN. – H., 2004. – 19 s.*

3. Naumenko O.V. *Vpliv fagovogo zabrudnennja na tehnologichni pokazniki procesu virobnictva ta jakist' kislomolochnih produktiv / O.V. Naumenko, N.F. Kigel' // Visnik agrarnoi nauki. – 2009. - № 10.- S. 63-67.*

4. Adams M. *Bakteriofagi / M. Adams. – M.: Mir, 1961. – 527 s. : il.*

5. Nagula M.N. *Fungicidnye i antifagovye dejstvija dezinficirujushhijh sredstv / M.N. Nagula, L.S. Kuznecova, V.I Ganina // Syrodellie i maslodelie. – 2007. - № 1. - S. 38-40.*

ИССЛЕДОВАНИЕ ВИРУСОЦИДНОЙ АКТИВНОСТИ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ

Аннотация: проведен скрининг физико-химических факторов, которые ингибируют фаголизис заквасочной микрофлоры. Установлена терморезистентность вирулентных бактериофагов, выделенных на молокоперерабатывающих предприятиях, которая обуславливает их опасность и необходимость поиска действенных факторов, ингибирующих их жизнеспособность. Исследована инфекционность лактофагов до и после обработки различными дезинфицирующими средствами и определена степень их инактивации. Дезинфицирующие средства, в состав которых входили перекись водорода и надуксусная кислота, четвертичные аммониевые соединения, активный хлор, характеризовались высокой вирусоцидной активностью. Установлено, что для выбора эффективного режима противфаговой обработки (формула и минимальная ингибирующая концентрация дезсредства, температура воздействия, время экспозиции) необходимо определить уровень фаговой контаминации и вид фагов, которые циркулируют на конкретном предприятии.

Ключевые слова: лактобактерии, фаги, дезинфицирующие средства, инактивация.

RESEARCH OF DISINFECTANTS ACTIVITY AGAINST BACTERIOPHAGES

Summary: a screening of physical and chemical factors that inhibit starter microorganisms phagolysis was conducted. It was established a thermal resistance of virulent bacteriophages, which were selected at dairy plants. This thermal resistance determines their danger and need to find more effective inhibitory factors of impact on their viability. Phages infectivity before and after treatment by various disinfectants was investigated and their inactivation degree was determined. Disinfectants which contained hydrogen peroxide and peroxyacetic acid, quaternary ammonium compounds, active chlorine, were characterized by high activity against bacteriophages. It was established that for antiphage treatment effective mode choice (disinfectant formula and minimum inhibitory concentration, influence temperature, exposure time) it is necessary to determine phage contamination level and phage types circulating at certain plant.

Keywords: lactic acid bacteria, phages, disinfectant, inactivation