

# Проучване върху възможността за прилагане на екологично дезинфекциращо средство в хранително-вкусовата промишленост

Милена Николова<sup>1</sup>, Стоил Караджов<sup>2</sup>, Светлана Йорданова<sup>1</sup>, Ирена Христоскова<sup>1</sup>

*1 – НЦЗПБ, София; [disinfection@abv.bg](mailto:disinfection@abv.bg)*

*2 – Дружество „Активирани води“*

# УВОД:

- От 1 септември 2013 г. във всички държави членки на Европейския съюз се прилага Регламент (ЕС) № 528/2012 на Европейския парламент и на Съвета относно предоставянето на пазара и употребата на биоциди.
- Считано от 1 септември 2015 г. на пазара на Европейския съюз могат да се предлагат биоциди само ако активното вещество или доставчикът на биоцида са включени в списъка по член 95 от Регламента за биоцидите.
- Списъкът по член 95 е публикуван и периодично се актуализира в страницата на Европейска агенция по химикали (ECHA).
- На страница 139 от този списък е вписано активното вещество „Активен хлор, произведен от натриев хлорид чрез електролиза“.
- Биоцидите с това активно вещество са предназначени за използване в продуктови типове от 1 до 5.

# Съгласно Приложение V на Регламент No 528/2012:

ПТ1 - Хигиена на човека.

ПТ2 - Дезинфектанти и алгициди, които не са предназначени за пряка употреба върху хора или животни;

ПТ3 - Ветеринарна хигиена;

ПТ4 - Област на употреба, свързана с храни и фуражи;

ПТ5 - Питейна вода.

- Продуктът, който съдържа активен хлор и се получава чрез електролиза на воден разтвор на натриев хлорид, в литературата е познат под името **анолит** (мъртва вода, йонизирана вода, електрохимично активирана, структурирана, киселинна вода).
- При електролизата на слабо минерализиран воден разтвор се получава разтвор със специфичен вкус и мирис, повишена киселинност ( $\text{pH} < 7.0$ ) и висок окислително-редукционен потенциал ( $\text{ОРП} > 500 \text{ mV}$ ).
- За дезинфекциращите способности на анолитите има редица съобщения в световната литература, но **до този момент такъв биоцид не е регистриран у нас.**

## ЦЕЛ:

Да се установи и проследи за 6-месечен период от време ефективността на електрохимично активиран 0,5% воден разтвор на NaCl, както и промяната в основните параметри на получения продукт - рН, концентрация на активен хлор и окислително-редукционен потенциал (ОРП).

## ЗАДАЧИ:

1. Да се установи и проследи бактерицидното и дрождецидно действие на продукта;
2. Да се установи и проследи промяната в концентрацията на активен хлор в продукта;
3. Да се установи и проследи промяната на окислително-редукционен потенциал (ОРП) и рН на анолита.

# МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ:

## 1. ЗА УСТРОЙСТВОТО:

Процесът на електролиза е осъществен чрез високотехнологично съоръжение „СТЕЛ 6м 11“, снабдено с наномембрана. На електролиза е подложен 0,5% разтвор на химически чист NaCl с дестилирана вода (5g NaCl/L H<sub>2</sub>O).

Основният анолит, с който са извършени изпитванията е произведен на 25 март 2016 г.

## 2. ЗА ЕФЕКТИВНОСТТА:

- За определяне на основното бактерицидно и основно фунгицидно действие на анолита са използвани два суспензионни метода - **БДС EN 1040:2006** и **БДС EN 1275:2006**.



- **Изпитвани тест-щамове:**

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Candida albicans* ATCC 10231

- **Начална гъстота на тест-суспензиите:**

- 1,5x10<sup>8</sup>-5x10<sup>8</sup> кое/ml за бактериите;
- 1,5x10<sup>7</sup>-5x10<sup>7</sup> кое/ml за *C. albicans*.

- **Същност на методите:**

Смесване на изготвената тест-суспензия с изпитвания анолит.

- **Изпитвани времена на въздействие:**

- За бактериите - 5 min задължително; 1 min допълнително;
- За *C. albicans* -15 min задължително; 5 min допълнително.

- **Пробите са култивирани на 37°C за 48 часа.**

- **Необходима редукция за постигане на дезинфекциращо действие:**

IgR ≥ 5 Ig - бактерицидна активност;

IgR ≥ 4 Ig - фунгицидна (дрождецидна) активност.

- След 6 месечно проследяване на ефективността на анолитната проба е изготвена нова проба анолит, която е изпитана по стандартни методи **БДС EN 1276:2009** и **БДС EN 1650:2008+A1:2013**, които определят бактерицидното и фунгицидно действие на дезинфектанти, използвани в хранително-вкусовата промишленост.
- Методите и използваните тест-щамове микроорганизми са идентични на вече описаните, с тази разлика че към изготвената тест-суспензия се добавя натоварваща субстанция - 10% обезмаслено мляко на прах (1% в изпитваната проба).

### 3. ЗА ХИМИЧНИЯ АНАЛИЗ:

- Концентрацията на активен хлор е установена една седмица след производството на анолита и е проследявана по време на всички изпитвания за ефективност.
- Съдържанието на активен хлор е определено по стандартизиран метод от Европейска фармакопея 1997:0381.
- Методът се основава на реакция на активния хлор с калиев йодид и отделяне на свободен йод в кисел разтвор.
- Разширената неопределеност на метода:  $\pm 0,0002\%$  (2 ppm).

### 4. ЗА ОПРЕДЕЛЯНЕ НА pH И ОРП:

- Стойностите на pH и ОРП са измерени непосредствено след получаването на анолита и в края на шест-месечния период на изпитване чрез портативни измервателни уреди.





# РЕЗУЛТАТИ:

## 1. ЕФЕКТИВНОСТ:

Табл. 1 Изпитване по БДС EN 1040 и БДС EN 1275 на 01.04.2016 г.:

Тест- микроорганизми	Начална гъстота на тест- суспензиите		Брой жизнеспособни клетки (lgNa) след дезинфекция при съответната експозиция	Редукция в броя на жизнеспособните клетки (lgR) при съответната експозиция
	кое/ml	lgN <sub>0</sub>	100% р-р	100% р-р
<i>S. aureus</i> - 5 min	2.50x10 <sup>8</sup>	7.40	< 2.15	> 5.25
<i>P. aeruginosa</i> - 5 min	4.85x10 <sup>8</sup>	7.69	< 2.15	> 5.54
<i>C. albicans</i> - 15 min	2.21x10 <sup>7</sup>	6.34	< 2.15	> 4.19

При първия проведен опит бактерицидна и дрождецидна активност е постигната на петата минута.

В пробите след дезинфекцията не е отчетен растеж на микроорганизмите.

Въз основа на получените резултати, се реши при следващо изпитване на пробата, бактерицидната и дрождецидна активност да бъде установена, както на готовата концентрирана проба, така и на 50% работен разтвор (разреждане 1:1 с вода) и да се намали времето на въздействие при 100%-ия разтвор на 1 минута.

**Табл. 2 Изпитване по БДС EN 1040 и БДС EN 1275 на 02.05.2016 г.:**

Тест- микроорганизми	Начална гъстота на тест- суспенсиите		Брой жизнеспособни клетки (lgNa) след дезинфекция при съответната експозиция		Редукция в броя на жизнеспособните клетки (lgR) при съответната експозиция	
	кое/ml	lg N <sub>0</sub>	100% p-p	50% p-p	100% p-p	50% p-p
<i>S. aureus</i> - 1 и 5 min	2.12x10 <sup>8</sup>	7.33	< 2.15		> 5.18	
<i>S. aureus</i> - 5 min			< 2.15	> 5.18		
<i>P. aeruginosa</i> - 1 и 5 min	2.07x10 <sup>8</sup>	7.32	< 2.15		> 5.17	
<i>P. aeruginosa</i> - 5 min			2,23	5.09		
<i>C. albicans</i> - 15 min	1.98x10 <sup>7</sup>	6.30	< 2.15	< 2.15	> 4.15	> 4.15

След втория проведен опит се установи наличие на бактерицидна активност още на първата минута. Наличие на бактерицидна и дрождецидна активност се установи и при 50% разтвор на анолита, но получената редукция на *P. aeruginosa* след времето на въздействие клони към граничната стойност за наличие на ефективност.

За следващото изпитване на продукта се реши ефективността да се установи както на 100% разтвор, така и на 10% работен разтвор, а концентрираната проба да бъде изпитана отново при две времена на въздействие - 1 и 5 минути.

Табл. 3 Изпитване по БДС EN 1040 и БДС EN 1275 на 07.07.2016 г.:

Тест- микроорганизми	Начална гъстота на тест-суспенсиите		Брой жизнеспособни клетки (lgNa) след дезинфекция при съответната експозиция		Редукция в броя на жизнеспособните клетки (lgR) при съответната експозиция	
	кое/ml	lg N <sub>0</sub>	100% p-p	10% p-p	100% p-p	10% p-p
<i>S. aureus</i> - 1 и 5 min	2.46x10 <sup>8</sup>	7.39	< 2.15		> 5.24	
<i>S. aureus</i> - 5 min				> 3.52		< 3.87
<i>P. aeruginosa</i> - 1 и 5 min	2.80x10 <sup>8</sup>	7.45	< 2.15		> 5.30	
<i>P. aeruginosa</i> - 5 min				> 3.52		< 3.93
<i>C. albicans</i> - 15 min	2.25x10 <sup>7</sup>	6.35	< 2.15	> 3.52	> 4.2	< 2.83

Бактерицидна активност се отчете още на първата минута при неразредения разтвор, а дрождецидна активност - на 15-та минута.

При 10%-ия разтвор се отчете масов растеж на тест-микроорганизмите, т.е. липса на бактерицидна и дрождецидна активност.

Последния опит за определяне на ефективността на анолита е направен 6 месеца след неговото получаване, но е изпитан само неразредения анолит при контактено време:

- 1 и 5 минути за бактерицидно действие и
- 5 и 15 минути за дрождецидно действие.

Табл. 4 Изпитване по БДС EN 1040 и БДС EN 1275 на 07.10.2016 г.:

Тест- микроорганизми	Начална гъстота на тест- суспензиите		Брой жизнеспособни клетки (lgNa) след дезинфекция при съответната експозиция	Редукция в броя на жизнеспособните клетки (lgR) при съответната експозиция
	кое/ml	lg N <sub>0</sub>	100% p-p	100% p-p
<i>S. aureus</i> - 1 min	2.02x10 <sup>8</sup>	7.31	> 3.52	< 3.79
<i>S. aureus</i> - 5 min			2.57	4.74
<i>P. aeruginosa</i> - 1 min	1.74x10 <sup>8</sup>	7.24	> 3.52	< 3.72
<i>P. aeruginosa</i> - 5 min			2.43	4.81
<i>C. albicans</i> - 5 min	1.85x10 <sup>7</sup>	6.27	> 3.52	< 2.75
<i>C. albicans</i> - 15 min			2.19	4.08

- От получените резултати ясно се вижда, че след 6-я месец неразредената проба на анолита е ефективна само по отношение на *C. albicans* и то само при 15 минути време на въздействие.
- Отчетената дрождецидна ефективност може би е резултат именно на по-дългото (15 минути), но изисквано от методиката контактно време за фунгицидна активност.
- Въпреки това, получената редукция на *C. albicans* след 15-та минута клони към граничната стойност за наличие на ефективност.
- Стойността на получената бактерицидна активност се доближава до долната граница за ефективност, но е по-ниска от изискваната от стандартния метод редукция.
- От всички получени до момента резултати може да се обобщи, че ефективността на изпитвания продукт се запазва в рамките на, но не повече от 6 месеца.



Като следващ етап от проучването се изпита нова проба анолит за определяне на нейното бактерицидно и дрождецидно действие при прилагането ѝ като дезинфектант в ХВП.

Табл. 5 Изпитване по БДС EN 1276 и БДС EN 1650 на анолит произведен на 17.09.2016 г.

Тест- микроорганизми	Начална гъстота на тест- суспенсиите		Брой жизнеспособни клетки (lgNa) след дезинфекция при съответната експозиция	Редукция в броя на жизнеспособните клетки (lgR) при съответната експозиция
	кое/ml	lg N <sub>0</sub>	100% p-p	100% p-p
<i>S. aureus</i> - 5 min	2.02x10 <sup>8</sup>	7.31	2.16	5.15
<i>P. aeruginosa</i> - 5 min	1.74x10 <sup>8</sup>	7.24	< 2.15	> 5.09
<i>C. albicans</i> - 5 min	1.85x10 <sup>7</sup>	6.27	< 2.15	> 4.12

Получените резултати показват, че 20 дни след произвеждането на анолита се отчита бактерицидна и дрождецидна ефективност на 5-та минута, въпреки добавяне на белтъчно натоварване (1% обезмаслено сухо мляко в пробата) към пробата.

В следващи етапи от проучването може да се установи периода от време, за който се запазва ефективността на анолита, когато към него има добавена натоварваща субстанция.

Интересно ще бъде да се установи дали този период ще е по-кратък в сравнение с изпитванията, в които няма натоварваща субстанция.

## 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ НА АКТИВЕН ХЛОР:

Табл. 6 Отчитане на концентрацията на активен хлор в произведения на 25.03.2016 г. анолит.

Дата на изпитване	Активен хлор	Бактерицидна ефективност на 100% р-р за 5 min	Дрождецидна ефективност на 100% р-р за 15 min
1 април	0,0094%	v	v
2 май	0,0080%	v	v
7 юли	0,0068%	v	v
7 октомври	0,0053%	x	v

От представената таблица е видно, че през 6-месечния период на изпитване, съдържанието на активен хлор в анолита спада, което съответно води до липса на ефективност в края на периода.

От получените данни може да се направи заключението, че ефективността на анолита зависи от концентрацията на активен хлор.

**Прави впечатление ниското съдържание на активен хлор в анолита, при което се постига бактерицидна и дрождецидна активност.** Това съдържание е много по-ниско от съдържанието на активен хлор в работните разтвори на регистрираните на пазара у нас биоциди.

Така например биоцид, съдържащ натриев хипохлорит, в работния му разтвор за текуща дезинфекция се съдържа минимум 250 ppm активен хлор (0,025%), а в случая с анолита ефективност се отчита дори при 60 ppm активен хлор.

**Това ниско съдържание на активен хлор, при което се отчита ефективност, е едно от предимствата на анолита, което го прави екологичен и на практика нетоксичен дезинфектант. Също така след употреба на анолитния продукт, разтворът се възстановява до първоначалните си градиенти - вода и натриев хлорид.**

### 3. ОТЧИТАНЕ НА рН И ОРП:

Табл. 7 Отчитане стойностите на рН и ОРП в началото и в края на 6-месечния период.

Дата на изпитване	ОРП	рН
1 април	1130	3,2
7 октомври	1126	3,1

Направените замервания в началото и в края на тестовия период показват, че стойностите на рН и ОРП се запазват почти непроменени, от където би могло да се направи извода, че те не оказват съществено влияние върху ефективността на анолита.

# **ИЗВОДИ:**

- 1. Електрохимично активирания 0,5% воден разтвор на NaCl проявява бактерицидна и дрождецидна активност, когато в средата липсва допълнително натоварване и тази ефективност се запазва в рамките на 6 месеца.**
- 2. Анолитът би могъл да се използва в ХВП като надеждно дезинфекциращо средство (т.к. е ефективен и при наличие на белтъчно натоварване), като запазването на ефективността му във времето ще бъде предмет на бъдещи проучвания.**
- 3. Ефективността на анолита зависи от концентрацията на активен хлор в пробата.**
- 4. Стойностите на рН и ОРП се запазват почти непроменени за период от 6 месеца, поради което не оказват съществено влияние върху ефективността на анолита.**
- 5. Ниското съдържание на активен хлор в анолита, при което се отчита ефективност го прави екологичен и на практика нетоксичен дезинфекциращ продукт, който може да се използва в дезинфекционната практика у нас, в случай че официално бъде регистриран като биоцид от Министерство на здравеопазването.**

# Използвана литература:

1. БДС EN 1040:2006 - Химични дезинфектанти и антисептици. Количествено суспензионно изпитване за оценяване на основно бактерицидно действие на химични дезинфектанти и антисептици. Метод за изпитване и изисквания (фаза 1)
2. БДС EN 1275:2006 - Химични дезинфектанти и антисептици. Количествено суспензионно изпитване за оценяване на основно фунгицидно или основно дрождецидно действие на химични дезинфектанти и антисептици. Метод за изпитване и изисквания (фаза1)
3. БДС EN 1276:2009 - Химични дезинфектанти и антисептици. Количествено суспензионно изпитване за оценяване на бактерицидното действие на химични дезинфектанти и антисептици, използвани в хранителната и индустриалната област, в бита и в обществения сектор. Метод за изпитване и изисквания (фаза 2, стъпка 1)
4. БДС EN 1650:2008+A1:2013 - Химични дезинфектанти и антисептици. Количествено суспензионно изпитване за оценяване на фунгицидното или дрождецидното действие на химични дезинфектанти и антисептици, използвани в хранителната, индустриалната област, в бита и в обществения сектор. Метод за изпитване и изисквания (фаза 2, стъпка 1)
5. Регистър на биоцидните препарати, за които е издадено разрешение за пускане на пазара по реда на Закона за защита от вредното въздействие на химичните вещества и препарати към 29.07.2016 г. <http://www.mh.government.bg/bg/administrativni-uslugi/registri/registar-na-biotsidnite-preparati/>
6. Регламент (ЕС) No 528/2012 на Европейския Парламент и на Съвета от 22 май 2012 година, относно предоставянето на пазара и употребата на биоциди.
7. Ташева, Ю., Й. Петков, С. Караджов Изпитване действието на електрохимично активирани водни разтвори (анолити) върху *Candida albicans*. Сборник доклади от научната конференция „Традиции и съвременност във ветеринарната медицина”, гр. София, 2010 г.
8. Article 95 List. Prepared as of 04 October 2016 [https://echa.europa.eu/documents/10162/17287015/art\\_95\\_list\\_en.pdf/5b06dde8-ab28-46f3-9170-0c04b271ffc1](https://echa.europa.eu/documents/10162/17287015/art_95_list_en.pdf/5b06dde8-ab28-46f3-9170-0c04b271ffc1)
9. Gluhchev G., I. Ignatov, S. Karadzov, G. Miloshev, N. Ivanov, O. Mosin. Electrochemically Activated Water. Biophysical and Biological Effects of Anolyte and Catholyte as Types of Water. Journal of Medicine, Physiology and Biophysics. Vol. 10, 2015
10. Helme, A.J., M.N.Ismail, F.J.Scarano, C.L. Yang. Bactericidal efficacy of electrochemically activated solutions and of commercially available hypochlorite. Br. J. Biomed Sci.; 2010, 67(3):105-8.
11. Karadzov, S., Atanasov, A., Ivanova, E., Mosin, O. V. & Ignatov, I. Mathematical Models of Electrochemical Aqueous Sodium Chloride Solutions (Anolyte and Catholyte) as Types of Water. Study of the Effects of Anolyte on the Virus of Classical Swine Fever Virus, Journal of Health, Medicine and Nursing (2014) 5: 30-55.
12. Marais, J.T. Biocompatibility of electrochemically activated aqueous solutions: an animal study. SADJ.; 2002. Jan; 57(1):12-6.
13. Popova, T., T. Petrova, S. Karadzov. Investigation of the Biocidal Effect of Electrochemically Activated Aqueous Sodium Chloride Solution on Gram-negative Pathogenic Bacteria. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci (2016) 5 (1): 624-632
14. Robinson, G.M., S.W. Lee, J. Greenman, V.C. Salisbury, D.M. Reynolds. Evaluation of the efficacy of electrochemically activated solutions against nosocomial pathogens and bacterial endospores. Lett. Appl. Microbiol. 2010. Mar; 50(3): 289-94.
15. Thorn, R.M.S., S.W. Lee, G.M. Robinson, J. Greenman, D.M. Reynolds. Electrochemically activated solutions: evidence for antimicrobial efficacy and applications in healthcare environments. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2012 May 2;31(5):641-53.

**БЛАГОДАРЯ ЗА ВНИМАНИЕТО!**

disinfection@abv.bg