



Дослідження фунгіцидної дії дезінфекційного препарату «Діолайд»

О. М. Чечет¹, В. Л. Коваленко²

kovalenkodoktor@gmail.com

¹Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики і ветеринарно-санітарної експертизи, вул. Волинська, 12, м. Київ, 03151, Україна

²Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, вул. Донецька, 30, м. Київ, 03151, Україна

На сьогодні актуальним є розроблення для птахівництва нових дезінфекційних засобів — простих у застосуванні, нетоксичних у дезінфекції за присутності птиці, із широким бактерицидним спектром, які не спричиняють звикання патогенної мікрофлори, санують повітряне середовище, зв'язують аміак і дезодорують повітря. Одним із показників ефективності препарату є контролювання різними методами на тест-культурах мікроміцетів, які стійкі на поверхнях приміщення і потребують високих фунгіцидних концентрацій діючих речовин. Результати досліджень впливу дезінфекційного препарату «Діолайд» на основі натрію хлориту 42% та натрію хлориду 46% показало фунгіцидну активність щодо еталонних штамів *Candida albicans* ATCC 10231 і *Aspergillus niger* ATCC 16404. Методом серійних розведень з використанням паперових дисків на середовищі Чапека та на агар солодовому екстракті за дії дезінфекційного засобу «Діолайд» встановлено ефективну 0,1% концентрацію. Дезінфектант «Діолайд» в 0,1% концентрації за експозиції 60 хв. повністю знезаражував тест-об'єкти — поверхні з дерева, заліза, цегли та штукатурки, контаміновані мікроміцетами. Встановлено, що ефективність дезінфекційного препарату «Діолайд» прямо пропорційно залежить від терміну експозиції, тому необхідно дотримуватися цих режимів і на виробництві.

Ключові слова: мікроміцети, дезінфектант, тест-об'єкти, тест-мікроорганізми, фунгіцидність

Противіробкова безпека в господарствах птахівництва є основним фактором ефективності виробництва. Порушення оптимальних зоотехнічних та ветеринарно-санітарних умов утримання птиці впливає на продуктивність птиці і становить потенційну загрозу скорочення чисельності поголів'я. За результатами аналізу в господарствах, такої шкоди завдають мікроміцети родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Saccharomyces cerevisias*, *Candida albicans* тощо [14].

У боротьбі з мікроміцетами в птахівництві необхідний комплексний системний підхід, який передбачає поєднання пробіотиків та сучасних дезінфекційних препаратів з адаптацією до умов конкретних господарств у системі противіробкової безпеки. У промисловому птахівництві дезінфекція є складовою частиною технологічного процесу. Дезінфекція водопостачання, повітря приміщень, поверхонь шаф — необхідні та важливі елементи боротьби з хворобами птиці. Дезінфекція повинна забезпечувати повне знищення умовно-патогенних і патогенних мікроорганізмів [7].

Діоксид хлору має потужну бактерицидну, віруліцидну, фунгіцидну та альгіцидну дію. Його потужну окисну здатність як дезінфекційного засобу для оброблення води і поверхонь дедалі більше використовують в багатьох розвинених країнах світу. Діоксид хлору добре окиснює тривалентне залізо, марганець, феноли, ціаніди, нітрати. Діоксин хлору не реагує з багатьма органічними сполуками і, як наслідок, ClO_2 не виробляє екологічно небезпечних хлорорганічних сполук (тригалометанів, канцерогенів тощо). Крім того, використання діоксиду хлору сприяє різкому падінню хлорованих органічних речовин у воді [9].

Засоби з активним киснем характеризуються високим ступенем безпеки для людей, екологічністю і ефективною здатністю очищати. Основою їх дії є утворення вільних радикалів, які пошкоджують ліпіди клітинної мембрани, ДНК та інші важливі компоненти мікробної клітини. Їхні позитивні якості — широкий спектр активності (зокрема на спори бактерій та грибів), здатність розчиняти біологічні речовини, швидкий розпад на нетоксичні продукти в зовнішньому середовищі [2].

Таким чином, діоксид хлору — дезінфекційна речовина нехлорного типу, яка не утворює вільний хлор завдяки будові її молекули, основною діючою речовиною якої є кисень. Перевага двокомпонентного способу отримання діоксиду хлору полягає у тому, що два безпечні компоненти під час змішування у воді утворюють найпотужніший дезінфектант для водних систем і поверхонь практично для будь-якої галузі промисловості. Це робить діоксид хлору ідеальним засобом для дезінфекції та знезараження навіть тоді, коли вихідна вода містить органічні забруднення — наприклад, поверхневі води або води з вмістом гумусових речовин [2, 3, 5, 12].

Мета — встановити фунгіцидну ефективність препарату «Діолайд» щодо еталонних штамів *Candida albicans* ATCC 10231 і *Aspergillus niger* ATCC 16404.

Матеріали та методи

Дослідження проводили у лабораторії Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи. Застосовували дезінфекційний препарат «Діолайд» на основі натрію хлориту 42% та натрію хлориду 46%.

Дослідження фунгіцидної дії препарату «Діолайд» та експозиції проведено згідно із загальноприйнятими рекомендаціями: «Методи контролю ефективності дії дезінфектантів на мікроміцети», затвердженими науково-методичною радою Державного комітету ветеринарної медицини (Протокол №1 від 23.12.2009 р.), та стандартом ДСТУ EN 1275:2004 «Засоби хімічні дезінфекційні та антисептичні основна фунгіцидна активність. Метод випробування та вимоги» (стадія 1) [1, 5, 6, 17]. Вивчення і встановлення ефективних концентрацій препарату «Діолайд» проводили суспензійним методом і методом паперових дисків. З цією метою готували водні розчини «Діолайд» у концентраціях 0,005; 0,01; 0,05; 0,1%. Підготували суспензії спор з еталонних штамів *C. albicans* ATCC 10231 ($2,5 \times 10^7/\text{см}^3$) і *A. niger* ATCC 16404 ($1,8 \times 10^7/\text{см}^3$) з музею Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів (ДНКІБШМ). Контроль — культури мікроорганізмів досліджували в робочому розведенні. Застосовували *Neutralizing fluid* — середовище для нейтралізації активності антимікробних агентів відповідно до ЄФ (*Himedia*, Lot 0000342787; придатний до травня 2022). Нейтралізуючі речовини: твін 80 — 30 г/дм³, лецитин — 3 г/дм³, гістидину гідрохлорид — 1 г/дм³.

Суспензійний метод: розчин дезінфектанту «Діолайд» у кількості 0,1 мл змішували з робочими розведеннями мікроорганізмів. Експозиція контакту становила 30 та 60 хв. Після цього висівали на тверде поживне середовище Чапека та на агар солодовий екстракт. Посіви культивували в термостаті за температури +27°C впродовж 14 діб. Спостереження проводили через 3, 5, 7, 10 і 14 діб. Облік результатів проводили за наявністю чи відсутністю росту гриба [4, 6, 9].

Метод паперових дисків: робочі розведення еталонних штамів *C. albicans* ATCC 10231 і *A. niger* ATCC 16404 у кількості 0,2 мл висівали на тверде поживне середовище Чапека та на агар солодовий екстракт у чашках Петрі. Для дифузії культур в агар чашки культури грибів витримували впродовж 15–30 хв. за кімнатної температури. Стерильні диски з фільтрувального паперу діаметром 5 мм змочували водними розчинами дезінфектанту у відповідних концентраціях у кількості 0,1 мл на диск і розкладали стерильним пінцетом на чашки Петрі, притискаючи до агару. У кожен чашку розкладали по 5 дисків, які витримували в термостаті за температури 27°C упродовж 10 діб. Облік результатів проводили через 7 і 10 діб, визначали діаметр зон затримки росту грибів навколо паперових дисків за допомогою лінійки [4].

Для підтвердження остаточної ефективної концентрації дезінфектанту «Діолайд» проводили дослідження на тест-об'єктах: залізо, штукатурка, дерево та цегла.

Результати й обговорення

У табл. 1 наведені результатами досліджень щодо фунгіцидної дії дезінфекційного препарату «Діолайд» на еталонних штамів *C. albicans* ATCC 10231 і *A. niger* ATCC 16404. Розчини препарату «Діолайд» 0,05% концентрації за експозиції 120 хв. виявляють фунгіцидну активність, оскільки не спостерігали росту мікроорганізмів. Встановлено, що 0,1% концентрації розчину препарату ефективно впливають на мікроорганізми за експозиції 60 хв.

Таблиця 1. Фунгіцидна дія препарату «Діолайд» у суспензійному методі
Table 1. Fungicidal action of "Diolide" disinfectant in the suspension method

Мікроорганізми Microorganisms	Контроль Control	Концентрація препарату, % The disinfectant concentration, %							
		0,005		0,01		0,05		0,1	
		Експозиція, хв / Exposition, min							
		60	120	60	120	60	120	60	120
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-

Примітка. «+» — наявність, «-» — відсутність росту гриба.
Note. "+" — the presence of fungal growth; "-" — no fungal growth.

У суспензійному методі ефективна експозиція 60 хв., тому її застосовували в методі з паперовими дисками (табл. 2, 3). У табл. 2 показано, що на сьому добу, починаючи з 0,05% та 0,1% концентрацій, препарат «Діолайд» активно затримував ріст вегетативних клітин *C. albicans* відповідно (зона затримки росту >5 мм). Затримка росту суспензії спор плісняви *A. niger* була 9,0 мм вже за 0,05% концентрації досліджуваного розчину препарату.

Таблиця 2. Фунгіцидна дія препарату «Діолайд» з використанням паперових дисків за експозиції 60 хв. (7 діб) (M±m, n=5)

Table 2. Fungicidal effect of "Diolide" disinfectant using paper discs at 60 min. exposure (7 days) (M±m, n=5)

Дослідні мікро-організми Experimental micro-organisms	Діюча концентрація, % Active concentration, %			
	0,005	0,01	0,05	0,1
	Діаметр зон затримки росту, мм Diameter of growth retardation zones, mm			
<i>Aspergillus niger</i>	2,0±0,1	4,0±0,1	9,0±0,3	11,0±0,3
<i>Candida albicans</i>	4,0±0,1	5,0±0,2	11,0±0,3	13,0±0,3

Таблиця 3. Фунгіцидна дія препарату «Діолайд» з використанням паперових дисків за експозиції 60 хв. (10 діб) (M±m, n=5)

Table 3. Fungicidal effect of "Diolide" disinfectant using paper discs at 60 min. exposure (10 days) (M±m, n=5)

Дослідні мікро-організми Experimental micro-organisms	Діюча концентрація, % Active concentration, %			
	0,005	0,01	0,05	0,1
	Діаметр зон затримки росту, мм Diameter of growth retardation zones, mm			
<i>Aspergillus niger</i>	3,0±0,1	7,0±0,2	10,0±0,3	13,0±0,3
<i>Candida albicans</i>	5,0±0,1	9,0±0,2	12,0±0,2	14,0±0,2

Таблиця 4. Фунгіцидна активність препарату «Діолайд»

Table 4. Fungicidal activity of "Diolide" disinfectant

Штами Strains	Концентрація / Concentration, %	
	0,05	0,1
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	$2,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
<i>A. niger</i> ATCC 16404	$1,8 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$

Показник зниження рівня життєздатності вегетативних клітин *C. albicans* та суспензії спор плісняви *A. niger* за зазначених випробовуваних концентрацій продукту
Indicator of viability reduction in the of *C. albicans* vegetative cells and *A. niger* mold spore suspension at the specified tested product concentrations

Штами Strains	0,05			0,1		
	15 хв. 15 min	30 хв. 30 min	60 хв. 60 min	15 хв. 15 min	30 хв. 30 min	60 хв. 60 min
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	$1,8 \times 10^7$	$5,2 \times 10^6$	$2,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^7$	$3,4 \times 10^5$	$5,1 \times 10^2$
<i>A. niger</i> ATCC 16404	$1,6 \times 10^7$	$6,3 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$	$1,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^5$	$2,7 \times 10^3$

Таблиця 5. Фунгіцидна дія препарату «Діолайд» 2,0% за експозиції 60 хв., %

Table 5. Fungicidal effect of "Diolide" disinfectant 2.0% at 60 min. exposure, %

Штами Strains	Тест-об'єкти / Test objects			
	дерево wood	залізо iron	цегла bricks	штукатурка plaster
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	100	100	100	100
<i>A. niger</i> ATCC 16404	100	100	100	100

Встановлено (табл. 3), що «Діолайд» виявляв фунгіцидну дію у 0,05% концентрації на 10-у добу, де затримка росту *A. niger* становила 10 мм. Аналізуючи результати, спостерігали зону затримки росту до 13 мм за концентрації 0,1%. Результати дослідження показали, що за збільшення концентрації препарату «Діолайд» зростає зона затримки росту грибів *A. niger* та *C. albicans*.

Згідно з ДСТУ EN 1275:2004 (табл. 4), продукт відповідає нормам, якщо показник зниження рівня життєздатності бактерій не є меншим від 10^4 впродовж часу випробування до 60 хв. за температури $+20^\circ\text{C}$ в умовах, визначених для аналізування з використанням випробовуваних мікроорганізмів *C. albicans* ATCC 10231 та *A. niger* ATCC 16404. За цим показником 0,1% препарату «Діолайд» забезпечує фунгіцидну дію щодо еталонних штамів *C. albicans* ATCC 10231 та *A. niger* ATCC 16404.

Дезінфекційний препарат «Діолайд» в 0,1% концентрації та експозиції 60 хв. на 100% знезаражував *C. albicans* ATCC 10231 і *A. niger* ATCC 16404 на тест-об'єктах із дерева, заліза, цегли та штукатурки (табл. 5). Це підтверджує ефективність такої концентрації для застосування на виробництві.

Для дезінфекції тваринницьких приміщень протиранням або зрошенням за інфекційних захворювань, спричинених грибковими мікроорганізмами, щодо еталонних штамів *C. albicans* ATCC 10231 і *A. niger* ATCC 16404 рекомендовано використовувати робочий розчин «Діолайд» з концентрацією двоокису хлору 0,1% (250 мг/л) з розрахунку 0,5–1,0 л на 1 m^2 за експозиції 60 хв.

Застосування нових методів інфекційного контролю та поява нових клінічних патогенів, а особливо грибів, дасть вирішення завдань, пов'язаних з ринком дезінфектантів [15]. Агентство з охорони навколишнього середовища США (*Environmental Protection Agency*, EPA) систематично розробляє та оцінює нові кількісні методи ефективності інфекційного контролю. Наші дослідження показали, що оцінка ефективності фунгіцидного методу випробувань у лабораторії є прийнятною як нормативної процедури декількома методами. Ці дослідження можуть використовуватися для оцінки ясності та точності протоколів випробувань і для визначення показників ефективності методу — таких, як стандартне відхилення повторюваності (показник мінливості в кількох тестах, проведених в одній і тій же лабораторії) та стандартне відхилення відтворюваності (показник загальної мінливості у кількох лабораторіях). Невеликі значення стандартного відхилення повторюваності та відтворюваності для контрольної та обробленої популяції носіїв є показниками прийнятної ефективності методу [8, 11, 14, 15].

Деякі дослідники вважають, що розроблення, оцінка, незалежний технічний аналіз та публікація нормативних методів мають вирішальне значення у тому, що зареєстровані EPA та фармакологічною комісією України дезінфекційні засоби здатні досягати запропонованого рівня антимікробної активності при використанні їх за призначенням, і дають змогу отримувати безпечну продукцію [5, 10, 13, 16, 18].

Висновки

Дезинфекційний засіб «Діолайд» в концентрації 0,1% має фунгіцидну дію щодо еталонних штамів *C. albicans* ATCC 10231 і *A. niger* ATCC 16404. Розчин препарату «Діолайд» у 0,1% концентрації за експозиції 60 хв. виявляє фунгіцидні властивості на тест-об'єктах.

Перспективи подальших досліджень

Наступним етапом буде дослідження віруліцидності активності дезінфектанта «Діолайд».

1. Chemical disinfectants and antiseptics main fungicidal activity. Test method and requirements (stage 1). NSU EN 1275:2004. Available at: https://budstandart.ua/normativ-document.html?id_doc=53724 (in Ukrainian)
2. Ge Y, Zhang X, Shu L, Yang X. Kinetics and mechanisms of virus inactivation by chlorine dioxide in water treatment: a review. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2021; 106 (4): 560–567. DOI: 10.1007/s00128-021-03137-3.
3. Gilbert P, Moore LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *J. Appl. Microbiol.* 2005; 99 (4): 703–715. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x.
4. Kovalenko VL, Garkavenko VM. Investigation of "Barez" bactericidal preparation efficiency by fungicidal action. *Sci. Bull. Vet. Med. Bila Tserkva*, 2017; 2 (136): 56–59. Available at: <https://nvvm.btsau.edu.ua/uk/content/doslidzhennya-efektyvnosti-bakterycydnogo-zasobu-barez-za-vyznachennyam-fungicydnoyidiyi> (in Ukrainian)
5. Kovalenko VL, Liasota VP, Synytsyn VA, Holovko AM, Kukhtyn MD. *General methods of prophylaxis using complex disinfectants*. A tutorial. Nizhyn: Lysenko MM, 2017: 408 p. ISBN 978-617-640-332-6. (in Ukrainian)
6. Kovalenko VL, Vasianovych OM, Zahrebelnyi OV. Studies on the effect of "Orgasept" disinfectant on *Aspergillus*, *Penicillium* and *Candida* fungi species. *Vet. Biotechnol.* 2016; 29: 132–137. Available at: <http://vetbiotech.kiev.ua/uk/arhiv/31-29/325-kovalenko-v-l> (in Ukrainian)
7. Kovalenko VL, Zasiakin DA (eds.). *Disinfectant Development and Control*. A monograph. Kyiv, 2013: 166 p. (in Ukrainian)
8. Li X, Wu Z, Dang C, Zhang M, Zhao B, Cheng Z, Chen L, Zhong Z, Ye Y, Xia Y. A metagenomic-based method to study hospital air dust resistome. *Chem. Eng. J.* 2021. 406: 126854. DOI: 10.1016/j.cej.2020.126854.
9. Mokienko AV. *Chlorine dioxide: application in water treatment technologies*. A monograph. 2nd ed. Odesa, Phoenix, 2021: 336 p. Available at: <https://www.onmedu.edu.ua/xmlui/bitstream/handle/123456789/10872/Mokienko%20%282%29.pdf>
10. Ortiz S, López-Alonso V, Rodríguez P, Martínez-Suárez JV. The connection between persistent, disinfectant-resistant *Listeria monocytogenes* strains from two geographically separate Iberian pork processing plants: evidence from comparative genome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 2015; 82 (1): 308–317. DOI: 10.1128/AEM.02824-15.
11. Rabenau HF, Schwebke I, Blümel J, Eggers M, Glebe D, Rapp I, Sauerbrei A, Steinmann E, Steinmann J, Willkommen H, Wutzler P. Guideline for testing chemical disinfectants regarding their virucidal activity within the field of human medicine. *Bundesgesundheitsblatt. Gesundheitsforschung. Gesundheitsschutz.* 2020; 63 (5): 645–655. DOI: 10.1007/s00103-020-03115-w.
12. Rodionova KO, Paliy AP. Analysis of quality and safety indicators of poultry meat during primary processing. *J. Vet. Med. Biotechnol. Biosaf.* 2017; 3 (2): 5–9. Available at: <http://jvmbbs.kharkov.ua/archive/2017/volume3/issue2/article1.php>
13. Stonehouse GG, Evans JA. The use of supercooling for fresh foods: a review. *J. Food Engineer.* 2015; 148: 74–79. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2014.08.007.
14. Synytsyn VA (ed.), Kovalenko VL, Zavriukha AI, Nychyk SA, Nedosiekov VV. *Problems of Infectious Animal Diseases*. A monograph. Kyiv, Lysenko MM, 2015: 543 p. ISBN 978-617-640-237-4. (in Ukrainian)
15. Tomasino SF. Development and assessment of disinfectant efficacy test methods for regulatory purposes. *Am. J. Infect. Contr.* 2013; 41 (5): S72–S76. DOI: 10.1016/j.ajic.2012.11.007.
16. Wang J, Tao D, Wang S, Li C, Li Y, Zheng F, Wu Z. Disinfection of lettuce using organic acids: an ecological analysis using 16S rRNA sequencing. *RSC Adv.* 2019; 30 (9): 17514–17520. DOI: 10.1039/C9RA03290H.
17. Yefimova OM, Kasianchuk VV. Analysis of microbiological safety of national products of animal origin intended for export. *Vet. Med. Ukr.* 2014; 1: 30–34. (in Ukrainian)
18. Zwirzitz B, Wetzels SU, Dixon ED, Stessl B, Zaiser A, Rabanser I, Thalgueter S, Pinior B, Roch FF, Strachan C, Zanghellini J, Dzieciol M, Wagner M, Selberherr E. The sources and transmission routes of microbial populations throughout a meat processing facility. *npj Biofilm. Microbiom.* 2020; 6: 26. DOI: 10.1038/s41522-020-0136-z.

Research on fungicidal effect of "Diolide" disinfectant

O. M. Chechet¹, V. L. Kovalenko²
kovalenkodoktor@gmail.com

¹State Scientific and Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, 12 Volynska str., Kyiv, 03151, Ukraine

²State Research and Control Institute for Biotechnology and Microorganisms Strains, 30 Donetska str., 03151, Kyiv, Ukraine

Nowadays it is important to develop new disinfectants for poultry which are simple in use, non-toxic if used in the presence of birds, with a broad bactericidal spectrum, not causing the resistance of microflora, maintaining the air environment, linking ammonia and deodorizing the air. One of the product effectiveness indicators comes from testing on micromycetes which are persistent on the indoor surfaces and require high fungicidal concentrations of active substances. Research results of the effect produced by the "Diolide" disinfectant with 42% sodium chlorite and 46% sodium chloride base showed fungicidal activity against the etalon strains of *Candida albicans* ATCC 10231 and *Aspergillus niger* ATCC 16404. By serial digestion method using paper disks on Chapek's medium and on the malt agar in the presence of the "Diolide" disinfectant the effective concentration of 0.1% was established. "Diolide" disinfectant at 0.1% concentration at 60 min. exposure completely disinfected test objects of wood, iron, brick and plaster which were contaminated with micromycetes. It was found that the effectiveness of "Diolide" disinfectant depends directly on the time of exposure and it is therefore necessary to adhere to these conditions in the production process.

Key words: micromycetes, disinfectant, test objects, test microorganisms, fungicidal effect