МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ ТА БІОТЕХНОЛОГІЙ ІМЕНІ С. З. ҐЖИЦЬКОГО

Кваліфікаційна освітньо-наукова
праця на правах рукопису

КОЖИН ВЛАДИСЛАВ АНАТОЛІЙОВИЧ

УДК 619. 615.281.9

ДИСЕРТАЦІЯ
ТЕОРЕТИЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ РОЗРОБКИ ДЕЗІНФІКУЮЧОГО ЗАСОБУ З ВМІСТОМ ЕНЗИМІВ АКТИВНОГО ЩОДО БАКТЕРІЙ У БІОПЛІВКАХ ТА ОРГАНІЧНОГО ЗАБРУДНЕННЯ

211 – ветеринарна медицина

Подається на здобуття наукового ступеня
доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

В. А. Кожин

Науковий керівник – **Салата Володимир Зеновійович**,
доктор ветеринарних наук, професор

ЛЬВІВ – 2023

АНОТАЦІЯ

Кожин В. А. Теоретичне обґрунтування розробки дезінфікуючого засобу з вмістом ензимів активного щодо бактерій у біоплівках та органічного забруднення. **– Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття освітньо-наукового рівня доктора філософії за напрямом підготовки 21 – «Ветеринарія», спеціальність 211 – «Ветеринарна медицина». – Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького, Міністерства освіти і науки України, Львів, 2023.

Незважаючи на достатньо велику кількість дезінфікуючих засобів на ринку, ідеального препарату не існує, так як мікроорганізми доволі швидко адаптуються до нових антибактеріальних субстанцій. Дезінфікуючі засоби для санітарної обробки хірургічного обладнання, операційних столів, допоміжного інвентаря у клініках ветеринарної медицини повинні впливати не тільки на планктонні і біоплівкові форми бактерій, а й проявляти добрий мийний ефект. У зв'язку з цим останнім часом у деззасоби почали вводити ензимні препарати для гідролізу білкових забруднень та руйнування глікопептидного матриксу мікробної біоплівки. Отже, дезінфікуючі засоби, які володіють широким спектром антимікробної дії, активно видаляють органічні забруднення та впливають на біоплівкові форми бактерій, вважаються актуальними і перспективними для розробки.

Дисертаційне дослідження спрямоване на обґрунтування та розробку нового дезінфікуючого засобу для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації у клініках ветеринарної медицини шляхом поєднання дезінфікуючих субстанцій із класу ЧАС, похідних біогуанідину, протеолітичних та гліколітичних ензимів.

Акцентовано увагу на визначенні протимікробної активності дезінфікуючих субстанцій ЧАС (Катамін АБ - алкілдиметилбензиламмоній

хлорид), ПГМБХ (полігексаметиленбігуанідину гідрохлорид) та в сукупності з протеолітичними (*Everlase 16 L)* та гліколітичними *(Termamyl 300 L)* ензимами на планктонні та біоплівкові форми бактерій на різних поверхнях та за можливого органічного навантаження. Використовуючи теоретичні знання про хімічні складові дезінфікуючих субстанцій, їх сумісності між собою та проведення різноманітних експериментальних лабораторних досліджень щодо бактерицидної дії біоцидів, стабільності під час зберігання дослідних зразків препарату, було створено новий дезінфікуючий засіб, який названо «Ензидез». У дезінфектанті поєднано дезінфікуючі субстанції різних класів (ЧАС, похідні бігуанідину), ензими (протеолітичні, гліколітичні), допоміжні речовини та воду. Дезінфікуючий засіб «Ензидез» у своєму складі містить наступні діючі речовини: Катамін АБ – розчин із вмістом 49 − 51 % алкілдиметилбензиламмонію хлориду – 8,0 − 12,0 %; Вантоцил TG – 20 % водний розчин полігексаметиленбігуанідину гідрохлориду – 1,0 − 2,0 %; інгібітор корозії та комплексони – 4,5 %; протеолітичний ензим – *Everlase 16 L* та амілолітичний ензим – *Termamyl 300 L* у кількості 0,5 − 0,75 % та дистильована вода – 81,25−86,50 %. Дезінфектант проявляє бактерицидний ефект щодо музейних штамів бактерій *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis* і грибів роду *Candida spp.* починаючи з 0,1 % концентрації та експозиції 15 хв, добре проникає в капілярну систему будівельних матеріалів (кахель), слабокорозійний відносно оцинкованої і нержавіючої сталі, проявляє мийні властивості та протеолітичну активність. На підставі токсикологічних досліджень встановлено, що деззасіб «Ензидез» є безпечний, не спричиняє подразнюючої та шкірно-резорбтивної дії, не викликає видимих змін слизової оболонки очей кроликів та вірогідних змін крові мишей.

Під час дослідження з вивчення впливу дезінфікуючих субстанцій Вантоцилу TG і Катаміну АБ та їх поєднання з ензимами на бактерії у біоплівках було виявлено, що бактерії у біоплівках витримували мінімальну

бактерицидну концентрацію вантоцилу і катаміну, яка була встановлена на планктонних їх формах. З одного мл змиву з біоплівки після впливу вантоцилу виділяли від $1,9\times10^3$ до $4,3\times10^3$ мікробних клітин, а після обробки катаміном – від $5,6\times10^3$ до $1,7\times10^4$. Водночас, після обробки біоплівок вантоцилом і катаміном разом з ензимами спостерігали зменшення кількості клітин *S. aureus, E. coli* і *P. aeruginosa* в середньому на два порядки до 10^1 КУО/мл, порівнюючи з обробкою тільки біоцидами. Тобто, спостерігається чітко виражений синергізм ензимів і біоцидів, що в кінцевому етапі більш згубно діє на бактерії у біоплівках. Отже, поєднання антибактеріальної речовини з ензимами є доброю перспективою у боротьбі з бактеріями у біоплівках на поверхнях різних матеріалів.

Дослідження з визначення мінімальної бактерицидної концентрації, фенольного коефіцієнту та білкового індексу деззасобу «Ензидез» виявило, що дезінфектант є високоактивним відносно тест-культур мікроорганізмів. Мінімальне бактерицидне розведення деззасобу за експозиції 15 хв відносно *S. aureus* становило 1:1466,3 (0,0691 % за препаратом), а за 30 хв – 1:2834,7 (0,0352 %). *E. coli* і *P. aeruginosa* виявилися більш чутливі до дії дезінфікуючого засобу «Ензидез» порівняно з *S. aureus.* Зокрема, мінімальне бактерицидне розведення деззасобу відносно *E. coli* за експозиції 15 хв становило 1:2834,7 (0,0352 % за препаратом), а відносно *P. aeruginosa* в 1,9 раза ($p < 0,05$) нижче, порівняно з розведенням відносно *E. coli.* Наявність у середовищі білка призводить до деякого зниження бактерицидної активності розчинів Ензидезу. Зокрема, бактерицидна активність Ензидезу відносно *S. aureus* знижується, в середньому, в 1,4 раза за умови присутності у середовищі 10 % сироватки крові. Бактерицидна активність Ензидезу відносно *E. coli* і *P. aeruginosa* за наявності білка знижувалася в 1,35 та 1,45 раза, відповідно.

Аналіз бактерицидної дії розробленого дезінфікуючого засобу «Ензидез» за різних концентрацій щодо бактерій, нанесених на тест-об’єкти, виявив, що деззасіб 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 грибкової мікрофлори на поверхні нержавіючої сталі та у глибині кахелю необхідно, щоб робоча концентрація Ензидезу була 0,1 % та експозиція не менше 15 хв.

Встановлено, що дезінфікуючий засіб «Ензидез» руйнує біоплівки музейних тест-культур *S. aureus, E. coli і P. aeruginosa*. Зокрема, за впливу найнижчої взятої у дослід концентрації 0,075 % оптична густина промивних розчинів з біоплівок *S. aureus* зменшилася в 2,6 раза, біоплівок *E. coli і P. aeruginosa* в 2,9 раза відповідно, порівнюючи з біоплівками після обробки водою. За дії такої концентрації засобу «Ензидез» біоплівки хоч значно деградували, проте вони ще були середньої щільності – більше 0,5 од. Підвищення концентрації засобу з 0,075 % до 0,5 % сприяло інтенсивності деградації біоплівки тест-культур, в середньому в 3,0 раза ($p < 0,05$) і вони ставали слабкої щільності (0,24 – 0,20 од). Підвищення концентрації засобу «Ензидез» до 1,0 % і більше не суттєво руйнувало матрикс біоплівки мікроорганізмів, так як оптична густина промивних розчинів була як у контролі. При визначенні впливу температури робочих розчинів засобу «Ензидез» на його плівкоруйнуючу активність встановлено, що із підвищенням температури дезінфікуючого засобу «Ензидез» з + 20 до + 60 °С відбувається збільшення деградації біоплівок, сформованих *S. aureus, E. coli і P. aeruginosa*. Деззасіб можна ефективно використовувати в 0,5 % концентрації за кімнатної температури розчинів. При обґрунтуванні часу експозиції деззасобу «Ензидез» виявлено, що для видалення біоплівок *S.*

aureus, E. coli і P. aeruginosa 0,5 % засобом за температури розчинів + 20 ± 1°С необхідно, щоб час дії становив від 15 до 30 хв.

Дезінфікуючий засіб «Ензидез» добре розчинний у воді, має pH 0,25 – 1,0% розчинів у межах 8,4 – 8,0 од. За температури розчинів + 20 ± 1 °С має поверхневий натяг не вище 37,63 ± 0,50 мН/м та краєвий кут змочування 69,5 ± 0,7 град. За корозійною активністю щодо оцинкованої і нержавіючої сталі «Ензидез» вважається слабо корозійноактивним – величина корозії в сотні разів нижча допустимої нормативної межі. Протеолітична активність дезінфектанта становила 41,3 ± 0,4 % за 0,5 % концентрації та температури розчину + 20 °С і експозиції 15 хв. Збільшення температури розчину до + 60°С та експозиції 30 хв забезпечувало зростання протеолітичної активності до 70%. Встановлено, що 1 % розчин деззасобу «Ензидез» належить до малотоксичних речовин (LD_{50} більша 5000 мг/кг маси тіла – 4 клас), не спричиняє подразнюючої та шкірно-резорбтивної дії, не викликає видимих змін слизової оболонки очей кроликів, концентрований засіб має слабовиражену кумулятивну дію (коефіцієнт 1,4 од). Морфологічні дослідження переферичної крові та біохімічні сироватки мишей за внутрішньошлункового введення робочої концентрації розчину дезінфектанту через 12 діб спостереження не виявили значних змін, які б виходили за фізіологічні величини. Дезінфікуючий засіб «Ензидез» виявився слаботоксичним щодо клітин паспортизованого штаму *Tetrachymena pyriformis* у 0,5 % концентрації протягом 30 хв впливу за температури розчинів + 20 °С та протягом 15 хв впливу за температури розчинів + 30 °С.

Запропоновано застосовувати дезінфектант «Ензидез» для дезінфекції стін і столів у 0,25 % концентрації, а для повного знищення мікроорганізмів на підлозі – розчини 0,25 – 0,5 % концентрації протягом 15 хв експозиції. Для проведення достерилізаційного очищення та стерилізації інструментів, обладнання чи виробів ветеринарного призначення у клініках ветеринарної медицини з органічним навантаженням використовувати 0,25 % розчин Ензидезу за температури від + 20 до + 60 °С і експозиції 15 хв.

ANNOTATION

Kozhyn V.A. Theoretical Justification for the Development of Disinfectant Containing Enzymes Active against Bacteria in Biofilms and Organic Pollution. **– Qualifying scientific work on manuscript rights.**

Dissertation for obtaining the educational and scientific level of Doctor of Philosophy in the field of training 21 – «Veterinary», specialty 211 – «Veterinary Medicine». – Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies of Lviv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Lviv, 2023.

Despite the large number of disinfectants on the market, there is no perfect agent, as microorganisms adapt to new antibacterial substances quite quickly. Disinfectants for sanitizing surgical equipment, operating tables and auxiliary equipment in veterinary medicine clinics should affect not only planktonic and biofilm forms of bacteria, but also show a good washing effect. In this regard, recently, enzymic agents for the hydrolysis of protein contaminants and the destruction of glycopeptide matrix of the microbial biofilm have been introduced into disinfectants. Therefore, disinfectants, which have a wide spectrum of antimicrobial action, actively remove organic pollution and affect the biofilm forms of bacteria, are considered relevant and promising for development.

The dissertation research is aimed at substantiation and development of a new disinfectant for disinfection, pre-sterilization cleaning and sterilization in veterinary medicine clinics, by combining disinfectant substances from the class of QAC, biguanide derivatives, proteolytic and glycolytic enzymes.

Attention is focused on determining the antimicrobial activity of the disinfectant substances QAC (Catamine AB - alkyldimethylbenzylammonium chloride), PHMG (polyhexamethylenebiguanidine hydrochloride) and in combination with proteolytic (*Everlase 16 L*) and glycolytic (*Termamyl 300 L*) enzymes on planktonic and biofilm forms of bacteria on various surfaces and for possible organic load. Using theoretical knowledge about the chemical components

of disinfectant substances, their compatibility with each other and carrying out various experimental laboratory studies on the bactericidal effect of biocides, stability during storage of test samples of the drug, a new disinfectant has been created, which is called «Enzidez». Disinfectant substances of different classes (QAC, biguanide derivatives), enzymes (proteolytic, glycolytic), auxiliary substances and water are combined in the disinfectant. Disinfectant «Enzidez» contains the following active substances in its composition: Catamine AB – a solution with a content of 49-51 % alkyldimethylbenzylammonium chloride -8.0 - 12.0%; Vantocil TG – 20 % aqueous solution of polyhexamethylenebiguanidine hydrochloride – 1.0-2.0%; corrosion inhibitor and complexones - 4.5%; proteolytic enzyme – *Everlase 16 L* and amylolytic enzyme – *Termamyl* 300 *L* in the amount of 0.5-0.75% and distilled water – 81.25-86.50%. The disinfectant exhibits a bactericidal effect against archival strains of bacteria *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis* and fungi of the genus *Candida spp.* starting from 0.1% concentration and exposure for 15 minutes, it penetrates well into the capillary system of building materials (tiles), is slightly corrosive to galvanized and stainless steel, shows washing properties and proteolytic activity. On the basis of toxicological studies, it has been established that the disinfectant «Enzidez» is safe, does not cause irritation and skin resorptive effect, does not cause visible changes in the mucous membrane of the eyes of rabbits and likely changes in the blood of mice.

During a study on the effect of the disinfectant substances Vantocil TG and Catamine AB and their combination with enzymes on bacteria in biofilms, it has been found that bacteria in biofilms can withstand the minimum bactericidal concentration of Vantocil and Catamine, which has been established on their planktonic forms. From 1.9×10^3 to 4.3×10^3 microbial cells have been isolated from one ml of biofilm wash after exposure to Vantocil, and from 5.6×10^3 to 1.7×10^4 after treatment with Catamine. At the same time, after treatment of biofilms with Vantocil and Catamine together with enzymes, a decrease in the number of *S. aureus, E. coli* and *P. aeruginosa* cells has been observed, on average by two

orders of magnitude to 10^1 CFU/ml, compared to treatment with only biocides. That is, there is a clearly expressed synergism of enzymes and biocides, which in the final stage has a more harmful effect on bacteria in biofilms. Therefore, the combination of an antibacterial substance with enzymes is a good prospect in the fight against bacteria in biofilms on the surfaces of various materials.

A study on determining the minimum bactericidal concentration, phenolic coefficient and protein index of the disinfectant «Enzidez» has revealed that the disinfectant is highly active against test cultures of microorganisms. The minimum bactericidal dilution of the disinfectant after exposure for 15 minutes relative to *S. aureus* has been 1:1466.3 (0.0691% by agent), and after 30 minutes – 1:2834.7 (0.0352%). *E. coli* and *P. aeruginosa* turned out to be more sensitive to the effect of disinfectant «Enzidez» compared to *S. aureus*. In particular, the minimum bactericidal dilution of the disinfectant against *E. coli* after exposure for 15 minutes has been 1:2834.7 (0.0352% by agent), and against *P. aeruginosa* it has been 1.9 times ($p < 0.05$) lower, compared to the dilution relative to *E. coli.* The presence of protein in the environment leads to a certain decrease in the bactericidal activity of Enzidez solutions. In particular, the bactericidal activity of Enzidez against *S. aureus* decreases by an average of 1.4 times, provided that 10% of blood serum is present in the medium. The bactericidal activity of Enzidez against *E. coli* and *P. aeruginosa* in the presence of protein has decreased by 1.35 and 1.45 times, respectively.

Analysis of the bactericidal effect of the developed disinfectant «Enzidez» at different concentrations in relation to bacteria applied to the test objects has revealed that the disinfectant at a concentration of 0.05% within 15 minutes of action do not provide disinfection of the surface of tiles and stainless steel from strains of *S. aureus, B subtilis* and *Candida spp.* At the same time, this regime has ensured the destruction of *E. coli* on the surface of the test objects. Increasing the exposure to 30 min provided a disinfecting effect on the surface of the test objects against *S. aureus, B. subtilis* and *E. coli.* The absence of a bactericidal effect of the product at a concentration of 0.05% in the thickness of the tile after 30 minutes of

exposure due to its inability to fill the capillary system of the tile has been revealed. It has been established that for the destruction of bacterial and fungal microflora on the surface of stainless steel and in the depth of the tile, it is necessary that the working concentration of Enzidez be 0.1% and exposure for at least 15 minutes.

It has been established that the disinfectant «Enzidez» destroys biofilms of archival test cultures of *S. aureus, E. coli* and *P. aeruginosa*. In particular, under the influence of the lowest concentration taken in the experiment, 0.075%, the optical density of washing solutions from *S. aureus* biofilms has decreased by 2.6 times, *E. coli* and *P. aeruginosa* biofilms by 2.9 times, respectively, compared to biofilms after treatment with water. Under the action of such a concentration of «Enzidez», the biofilms have been significantly degraded, but they are still of medium density, more than 0.5 units. Increasing the concentration of the agent from 0.075% to 0.5% contributed to the intensity of degradation of the biofilm of the test cultures by an average of 3.0 times ($p < 0.05$) and they became less dense (0.24-0.20 units). Increasing the concentration of «Enzidez» to 1.0% or more has not significantly destroyed the matrix of the biofilm of microorganisms, since the optical density of the washing solutions is the same as in the control. When determining the effect of the temperature of the working solutions of the agent «Enzidez» on its film-destructive activity, it has been established that with an increase in the temperature of the disinfectant «Enzidez» from + 20 to + 60 °C, there is an increase in the degradation of biofilms formed by *S. aureus, E. coli* and *P. aeruginosa*. The tool can be effectively used in 0.5% concentration at room temperature solutions. When substantiating the exposure time of the disinfectant «Enzidez», it has been found that to remove biofilms of *S. aureus, E. coli* and *P. aeruginosa* with a 0.5% agent at a solution temperature of +20±1 °C, it is necessary that the action time be from 15 to 30 minutes.

Disinfectant «Enzidez» is well soluble in water, has a pH of 0.25-1.0% of solutions in the range of 8.4-8.0 units. At a solution temperature of + 20 ± 1 °C, it has a surface tension of no higher than 37.63 ± 0.50 mN/m and a marginal wetting

angle of 69.5 ± 0.7 degrees. In terms of corrosion activity against galvanized and stainless steel, «Enzidez» is considered weakly corrosive, the amount of corrosion is hundreds of times lower than the permissible regulatory limit. Proteolytic activity of the disinfectant is 41.3 ± 0.4% for 0.5% concentration and solution temperature + 20 °C and exposure for 15 minutes. Increasing the temperature of the solution to + 60 °C and exposure for 30 minutes has provided an increase in proteolytic activity up to 70%.

It has been established that 1% solution of disinfectant «Enzidez» belongs to low-toxic substances (LD_{50} greater than 5,000 mg/kg of body weight – class 4), does not cause irritation and skin resorptive effect, does not cause visible changes in the mucous membrane of eyes of rabbits, the concentrated agent has a weakly expressed cumulative effect (coefficient 1.4 units). Morphological studies of peripheral blood and biochemical serum of mice after intragastric administration of the working concentration of the disinfectant solution after 12 days of observation did not reveal significant changes that would exceed physiological values. Disinfectant «Enzidez» turned out to be mildly toxic to the cells of the certified strain of *Tetrachymena pyriformis* at a concentration of 0.5% during 30 minutes of exposure at a solution temperature of + 20 °C and during 15 minutes of exposure at a solution temperature of + 30 °C.

It is suggested to use the disinfectant «Enzidez» for disinfection of walls and tables at a concentration of 0.25%, and for the complete destruction of microorganisms on the floor – solutions of 0.25-0.5% concentration during 15 minutes of exposure. To carry out pre-sterilization cleaning and sterilization of instruments, equipment or veterinary products in veterinary medicine clinics with organic load, use 0.25% solution of Enzidez at temperatures from + 20 to + 60 °C and exposure for 15 minutes.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Стаття у закордонному виданні, яке проіндексоване у базі даних Scopus:

1. Kukhtyn, M., Kozhyn, V., Horiuk, V., Malimon, Z., Horiuk, Y., Yashchuk, T., & Kernychnyi, S. (2021). Activity of Disinfecting Biocides and Enzymes of Proteases and Amylases on Bacteria in Biofilms. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, *27*(4), 495-502. *(Здобувач провів дослідження впливу біоцидів на біоплівки та підготовив матеріали до друку).*

Статті у фахових наукових виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних:

2. Kozhyn, V. A., Horiuk, V. V., Kukhtyn, M. D., & Boltyk, N. P. (2021). Дослідження бактерицидної активності катаміну АБ залежно від значення pH розчинів. *Podilian Bulletin: Agriculture, Engineering, Economics*, (34), 166-174. *(Здобувач визначив мінімальну бактерицидну концентрацію катаміну залежно від pH розчинів, проаналізував отримані дані та підготовив їх до друку).*

3. Kozhyn, V. A. (2021). Бактерицидні властивості дезінфікуючого засобу «Ензидез». *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування*, (8), 27-33.

4. Кухтин, М., Кожин, В., Горюк, Ю., Горюк, В., & Гриневич, Н. (2022). Вплив дезінфікуючого засобу «Ензидез» на тест-об’єкти контаміновані мікроорганізмами. *Аграрний вісник Причорномор'я*, 102-103. *(Здобувач визначив антимікробну дію деззасобу «Ензидез» на тест-об’єкти (нержавіюча сталь, кахельна плитка, бетон, проаналізував отримані дані та підготовив їх до друку).*

5. Kozhyn, V., Kukhtyn, M., Horiuk, V., Vichko, O., & Kryzhanivsky, Y. (2021). The activity of the disinfectant «Enzidez» against bacteria in biofilms. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 23(101), 67–74. *(Здобувач визначив*

вплив деззасобу «Ензидез» на біоплівкові форми бактерій, проаналізував отримані дані та підготовив їх до друку).

6. Kukhtyn, M., Kozhyn, V., Horiuk, V., Horiuk, Y., & Boltyk, N. (2022). Evaluation of disinfectant «Enzidez» according to physical and chemical parameters. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, *24*(105), 3-9. *(Здобувач визначив основні фізико-хімічні властивості деззасобу «Ензидез» та проаналізував отримані дані та підготовив їх до друку).*

7. Kozhyn, V. A., Kukhtyn, M. D., Horiuk, Y. V., Horiuk, V. V., Perkiy, Y. B., & Gufrij, D. F. (2021). Дослідження токсичного впливу дезінфікуючого засобу «Ензидез» на клітини інфузорій. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, *9*(4), 191-194. *(Здобувач визначив вплив деззасобу «Ензидез» на клітини інфузорій проаналізував отримані дані та підготовив їх до друку).*

8. **Kozhyn**, V., Salata, V., Kukhtyn, M., Horiuk, Y., & Matviishyn, T. S. (2023). Production studies of the disinfectant «Enzidez». Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 25(111), 78–83. (*Здобувач проводив дезінфекцію, відбирав змиви та мікробіологічні дослідження).*

Патенти України на корисну модель:

9. **Кожин В. А.,** Кухтин М. Д., Горюк Ю. В., Горюк В. В. Спосіб дезінфекції обладнання, інструментів, об’єктів ветеринарного нагляду у ветеринарній медицині: пат. 150859 Україна: МПК 20.06 A61L 2/16 (2006.01), A61L 101/00, A61L 101/32 (2006.01). № u 202102797; заявл. 27.05.2021; опубл. 04.05.2022, Бюл. №18/22. *(Здобувач брав участь у лабораторних дослідженнях, підготовці та подані матеріалів до патентування).*

Технічні умови України:

10. **Кожин В. А.,** Кухтин М.Д. Технічні умови ТУ У 21.2–22769675–002:2022 Дезінфікуючий засіб «Ензидез». Кам'янець-Подільський, 2022. 17 с. *(Здобувач приймав участь у розробці деззасобу, організації і проведенні експериментальних досліджень та підготовці відповідної документації).*

Методичні рекомендації:

11. **Кожин В. А.,** Кухтин М. Д., Горюк В. В. Застосування дезінфікуючого засобу «Ензидез»: методичні рекомендації. Кам'янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 2022. 19 с. *(Здобувач проводив експериментальні дослідження та оформлював методичні рекомендації).*

Матеріали і тези наукових конференцій та інші наукові видання, які додатково відображають наукові результати дисертації:

12. **Кожин, В**., Горюк, В., & Кухтин, М. Д. (2021). Вплив якості води на ефективність миття і дезінфекції. *Тези доповідей І Міжнародної науково-технічної конференції «Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти»*, 63-63.

13. **Кожин В. А.,** Кухтин М. Д., Болтик Н. П. Вплив біоцидів та ензимів на мікробні біоплівки. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин:* щоріч. наук.- практ. конф. молодих вчених (Київ, 30 червня 2021 р.). Київ: Компринт, 2021. С. 13–14.

14. Кухтин М.Д., **Кожин В. А.** Дія дезінфікуючого засобу «Ензидез» на бактерії у біоплівках. *ІІ конференція «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині» присвячена 140-річчю відкриття навчального закладу «Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові»*: тези доповідей, 18–19 листопада 2021 р. Львів: СПОЛОМ, 2021. С. 45.

15. **Кожин В.А.,** Кухтин М.Д., Болтик Н.П. Оцінка дезінфікуючого засобу «Ензидез» за фізико-хімічними властивостями. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин:* щоріч. наук.-практ. конф. молодих вчених (Київ, 21 липня 2022 р.). Київ: Компринт, 2022. С. 7.

16. **Кожин**, В., Салата, В., & Кухтин, М. (2023). Протимікробна дія біоцидів в асоціації з ензимами на бактерії у біоплівках. Матеріали науково-практичної онлайн конференції «Безпечність та якість харчових продуктів у концепції «Єдине здоров'я» (м. Львів, 1–2 червня 2023 р.)**,** *ЛНУВМБ***,** 68-69.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ **2**

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ **12**

ЗМІСТ **15**

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ **18**

ВСТУП **19**

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ **25**

1.1. Дезінфекція, її види. Рекомендації до застосування 25

1.2. Ринок дезінфікуючих засобів в Україні. Основні діючі речовини у деззасобах 26

1.3. Оцінка якості дезінфекції. Чинники, які впливають на активність дезінфікуючих засобів у виробничих умовах 28

1.3.1. Вплив органічних речовин на дезінфікуючу дію біоцидів 29

1.3.2. Значення твердості води для приготування робочих розчинів та ефективність дезінфекції 30

1.3.3. Вплив рельєфу поверхні об’єктів ветеринарного нагляду на дію дезінфікуючих засобів 30

1.3.4. Залежність бактерицидної дії деззасобів від концентрації, часу та температури розчинів 32

1.3.5. Мікробна біоплівка, як форма захисту та формування стійких мікроорганізмів до дезінфікуючих засобів 33

1.4. Ензими, як складові компоненти біоцидних зсобів для деградації мікробних біоплівок 39

1.5. Підсумки з огляду літератури 44

РОЗДІЛ 2. ВИБІР НАПРЯМКІВ ДОСЛІДЖЕНЬ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ **45**

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ **54**

3.1. Підбір дезінфікуючих субстанцій для створення дезінфікуючого засобу з мийним ефектом для застосування у клініках ветеринарної медицини та інших об'єктів ветеринарного нагляду 54
3.1.1 Дослідження бактерицидної дії Катаміну АБ залежно від значення pH розчинів 54
3.1.2 Дослідження активності дезінфікуючих біоцидів та ензимів протеаз і амілаз на бактерії у біоплівках 59
3.2. Розробка регламенту виробництва комплексного дезінфектанту «Ензидез» 69
3.3. Дослідження бактерицидних властивостей дезінфікуючого засобу «Ензидез» 72
3.4. Вплив дезінфікуючого засобу «Ензидез» на тест-об'єкти, контаміновані мікроорганізмами 77
3.5. Активність дезінфікуючого засобу «Ензидез» щодо бактерій у біоплівках 84
3.6. Оцінка дезінфікуючого засобу «Ензидез» за фізико-хімічними показниками 93
3.7. Токсикологічні дослідження дезінфікуючого засобу «Ензидез» 101
3.7.1. Дослідження токсичного впливу дезінфікуючого засобу «Ензидез» на клітини інфузорій 102
3.7.2. Дослідження показників гострої токсичності дезінфікуючого засобу «Ензидез» на лабораторних тваринах 106
3.7.3. Дослідження подразнюючої дії деззасобу «Ензидез» та його 1% розчину 109
3.7.4. Дослідження шкірно-резорбтивної дії деззасобу «Ензидез» та його 1 % розчину 110
3.7.5. Дослідження впливу деззасобу «Ензидез» та його 1 % розчину на слизові оболонки очей кроликів 110

3.7.6. Дослідження кумулятивних властивостей деззасобу «Ензидез» та його 1 % розчину 112
3.7.7. Дослідження морфологічних та біохімічних показників крові мишей за застосування 1 % розчину деззасобу «Ензидез» 113
3.8. Виробничі дослідження дезінфікуючого засобу «Ензидез» у клініках ветеринарної медицини 116
3.8.1 Дослідження впливу деззасобу «Ензидез» за дезінфекції поверхонь стін, підлоги, столів 116
3.8.2 Дослідження впливу деззасобу «Ензидез» під час достерилізаційного очищення хірургічних інструментів та виробів ветеринарного призначення у клініках ветеринарної медицини 118
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ 121
ВИСНОВКИ 134
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ 137
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ 138
ДОДАТКИ 165

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ І СКОРОЧЕНЬ

АлАТ – аланін-амінотрансфераза

АсАТ – аспартат-амінотрансфераза

БА – бактерицидна концентрація

БГКП – бактерії групи кишкових паличок

КУО – колонієутворюючі одиниці

МАФАнМ – мезофільні аеробні та факультативно анаеробні мікроорганізми

МПА – м’ясо-пептонний агар

МПБ – м’ясо-пептонний бульйон

ПАР – поверхнево-активні речовини

ПГМБГХ − полігексаметиленбігуанідину хлорид

ЧАС – четвертинні амонійні сполуки

ВСТУП

Актуальність теми. Дезінфекція, як складова усіх ветеринарно-санітарних заходів, забезпечує благополуччя тваринництва, підвищення продуктивності тварин та отримання безпечної сировини [28, 12, 183, 7]. Проте, вона може бути дієва лише за умови застосування ефективних дезінфікуючих засобів, активних щодо широкого кола збудників хвороб тварин і людей [115, 149, 79]. Метою дезінфекції є знищення або зниження мікроорганізмів до прийнятного рівня, а також запобігання та контроль утворення біологічних відкладень на технологічному обладнанні [28, 69, 39, 4]. Сучасні дезінфектанти включають застосування таких хімічних речовин як спирти, альдегіди, аніліди, бігуаніди, біс-феноли, діамідини, галоген-вивільняючі агенти, галофеноли, кислоти, похідні важких металів, пероксиди, феноли та крезоли, четвертинні амонієві сполуки (ЧАС), хлор-вивільняючі агенти та озон [110, 21, 79, 43, 142]. Водночас, мікробні популяції доволі швидко адаптуються до нових антибактеріальних субстанцій завдяки різним механізмам стійкості і захисту [102, 192]. Одним із механізмів захисту бактерій від дії біоцидів є їх здатність формувати біоплівки [177, 97, 141]. Мікробна біоплівка – це утворення, яке складається з одного або декількох видів чи родів бактерій, які прикріплені до біогенної чи абіогенної поверхні та оточені власно продукуючим екзополісахаридним матриксом [111, 167]. Саме завдяки матриксу багато протимікробних засобів не проникають у біоплівку, який діє як бар'єр, що захищає бактеріальні клітини всередині [213]. Перебування бактерій у біоплівці створює серйозні проблеми з інфікуванням різних поверхонь у медицині, ветеринарії та харчовій промисловості [174, 177, 208]. Бактерії у біоплівках набагато складніше знищити антимікробними препаратами, що потенційно може призвести до накопичення і поширення небезпечних збудників. У результаті цього постійно проводяться зусилля щодо поліпшення роботи існуючих дезінфікуючих засобів, або розробки нових для впливу на мікроорганізми у

біоплівковому стані. Тому науковці при створенні дезінфікуючих засобів використовують та поєднують між собою дезінфікуючі субстанції із різних класів, дія яких направлена на пригнічення активності різних ферментних систем бактеріальної клітини, руйнування її структурних елементів та деградації біоплівки [117, 136, 211].

В Україні питанням розробки дезінфікуючих засобів для ветеринарної медицини займаються науковці різних установ та наукових шкіл [79, 183, 115, 69, 62, 12, 206, 7, 4]. Проте, незважаючи на достатньо велику кількість дезінфікуючих засобів на ринку, ідеального препарату не існує, так як мікроорганізми доволі швидко адаптуються до нових антибактеріальних субстанцій [116, 149, 127]. Дезінфікуючі засоби для санітарної обробки хірургічного обладнання, операційних столів, допоміжного інвентаря у клініках ветеринарної медицини повинні впливати не тільки на планктонні і біоплівкові форми бактерій, а й проявляти добрий мийний ефект [120, 89]. У зв'язку з цим останнім часом у деззасоби почали вводити ензимні препарати для гідролізу білкових забруднень та руйнування глікопептидного матриксу мікробної біоплівки [83]. Отже, дезінфікуючі засоби, які володіють широким спектром антимікробної дії, активно видаляють органічні забруднення та впливають на біоплівкові форми бактерій, вважаються актуальними і перспективними для розробки.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційну роботу виконано в Подільському державному аграрно-технічному університету (нині Заклад вищої освіти «Подільський державний університет») на кафедрі інфекційних та інвазійних хвороб та кафедрі ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії за ініціативною тематикою «Розробка нових антимікробних препаратів і засобів для профілактики і лікування хвороб тварин та дезінфекції у ветеринарній медицині», номер державної реєстрації 0122U200511.

Мета і задачі досліджень. Метою роботи було експериментально обґрунтувати та розробити дезінфікуючий засіб на основі ЧАС, похідних

біогуанідину та протеолітичних і гліколітичних ензимів активних щодо бактерій у біоплівках та органічного забруднення для застосування у клініках ветеринарної медицини.

Для досягнення поставленої мети необхідно було виконати наступні завдання:

– теоретично та експериментально підібрати діючі речовини та вивчити їх сумісність під час створення дезінфікуючого засобу з ензимами;

− дослідити бактерицидні властивості створеного дезінфікуючого засобу та його вплив на тест-об’єкти, контаміновані мікроорганізмами;

− дослідити ефективність розробленого деззасобу за різних концентрацій і температури розчинів відносно бактерій у біоплівках та за органічного навантаження;

− визначити фізико-хімічні властивості дезінфікуючого засобу "Ензидез" за різних концентрацій;

− дослідити токсикологічні, гематологічні показники та біохімічні показники сироватки крові лабораторних тварин за впливу дезінфікуючого засобу «Ензидез»;

− встановити безпечну концентрацію деззасобу «Ензидез» за показниками активності клітин інфузорій *Tetrahymena pyriformis;*

− розробити ефективні режими дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації дезінфекційним засобом «Ензидез» у клініках ветеринарної медицини;

Об’єкт дослідження: дезінфікуючі субстанції, ензими, розробка дезінфікуючого засобу.

Предмет досліджень: бактерицидні, фізико-хімічні, токсикологічні властивості дезінфікуючого засобу «Ензидез», ефективність дезінфектанту у клініках ветеринарної медицини.

Методи досліджень: мікробіологічні (бактерицидна активність дезінфікуючих субстанцій та деззасобу, фенольний коефіцієнт, білковий індекс, вплив на біоплівки, ефективність дезінфекції), фізико-хімічні (pH,

поверхневий натяг, змочувальна, мийна, піноутворююча здатність, величина корозії, протеолітична активність), токсикологічні (встановлення міри токсичності засобу, подразнюючої, кумулятивної дії) та статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше науково обґрунтовано розробку нового дезінфікуючого засобу для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації у клініках ветеринарної медицини шляхом поєднання дезінфікуючих субстанцій із класу ЧАС, похідних біогуанідину, протеолітичних та гліколітичних ензимів. Встановлено, що деззасіб «Ензидез» активний щодо біоплівкових форм бактерій та за можливого органічного навантаження. Дезінфектант проявляє бактерицидний ефект щодо музейних штамів бактерій *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis* і грибів роду *Candida spp.* починаючи з 0,1 % концентрації та експозиції 15 хв, добре проникає в капілярну систему будівельних матеріалів (кахель), слабокорозійний відносно оцинкованої і нержавіючої сталі, проявляє мийні властивості та протеолітичну активність. На підставі токсикологічних досліджень встановлено, що деззасіб «Ензидез» є безпечний, не спричиняє подразнюючої та шкірно-резорбтивної дії, не викликає видимих змін слизової оболонки очей кроликів та вірогідних змін крові мишей.

Розроблено режими застосування дезінфектанту в клініках ветеринарної медицини для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації об’єктів (стіни, підлога, столи, тощо) та усіх видів виробів, інструментів та обладнання ветеринарного призначення, визначено його ефективні концентрації.

Наукова новизна розробки підтверджена деклараційним патентом на корисну модель «Спосіб дезінфекції обладнання, інструментів, обєктів ветеринарного нагляду у ветеринарній медицині», № 150859 від 05.05.2022 р., Бюл. № 18.

Практичне значення отриманих результатів. На підставі проведених лабораторних (мікробіологічних, фізико-хімічних, токсикологічних) та

клінічних досліджень встановлено, що дезінфікуючий засіб «Ензидез» ефективний за дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації об'єктів, виробів, інструментів та обладнання у клініках ветеринарної медицини.

Отримані результати щодо бактерицидної та протигрибкової дії дозволяють використовувати його для руйнування біоплівкових форм бактерій навіть за органічного забруднення, що відображено у методичних рекомендаціях «Застосування дезінфікуючого засобу «Ензидез», які затверджено на засідані науково-методичної ради ЗВО «ПДУ», протокол №8 від 22 листопада 2022 року.

На підставі результатів досліджень запропоновано ТУ У 21.2–22769675–002:2022) на розроблений дезінфікуючий засіб «Ензидез»,

Особистий внесок здобувача. Дисертант самостійно провів огляд та аналіз доступної наукової літератури, підібрав методи та склав схему досліджень, практично використав описані в дисертації методики, провів лабораторні та виробничі дослідження. Розробив робочі режими використання дезінфектанту для дезінфекції та достерилізаційного очищення і стерилізації інструментів, обладнання чи виробів ветеринарного призначення у клініках ветеринарної медицини, провів статистичну обробку отриманих результатів. В дисертації використано ідеї та положення особистої роботи здобувача та опубліковано їх в наукових працях у співавторстві. За участю наукового керівника доктора ветеринарних наук, професора Салати В.З. здійснено узагальнення результатів досліджень, написання висновків і пропозицій.

Апробація результатів дисертаційних досліджень. Основні результати досліджень доповідались, обговорювалися та отримали схвалення на засіданнях науково-технічної ради Подільського державного аграрно-технічного університету та на конференціях і семінарах: І Міжнародній науково-технічній конференції «Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти» (Тернопіль, 2021); щорічній науково-

практичній конференції молодих вчених «Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин» (Київ, 2021; 2022); ІІ конференції «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині», присвяченій 140-річчю відкриття навчального закладу «Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові» (Львів, 2021);

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 7 друкованих наукових праць, із них 6 статей у наукових фахових виданнях України, 1 стаття у закордонному виданні, яке входить у науково-метричну базу Scopus, 4 праці – у матеріалах конференцій, отримано деклараційний патент на корисну модель, розроблено і затверджено технічні умови України на дезінфікуючий засіб «Ензидез» та методичні рекомендації.

Структура і обсяг роботи. Дисертаційна робота викладена на 178 сторінках комп'ютерного тексту, ілюстрована 25 таблицями, 19 рисунками і складається зі анотації, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, результатів досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел, додатків. Список використаної літератури включає 221 джерело, з яких 133 – латиницею та 5 додатків.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Дезінфекція, її види. Рекомендації до застосування

Дезінфекція, як складова усіх ветеринарно-санітарних заходів, забезпечує благополуччя тваринництва, підвищення продуктивності тварин, та отримання безпечної сировини [142, 116, 47]. Проте, вона може бути дієва лише за умови застосування ефективних дезінфікуючих засобів, активних щодо широкого спектру збудників хвороб тварин і людей [115, 177]. Метою дезінфекції є знищення або зниження мікроорганізмів до прийнятного рівня, а також запобігання та контроль утворення біологічних відкладень на технологічному обладнанні. Основне завдання проведення дезінфекційних заходів у ветеринарній медицині – це розірвати механізми передачі збудника через об'єкти і предмети навколишнього середовища від одних тварин іншим [89, 94, 149]. Тому дезінфекційні заходи – це основа благополучного утримання тварин, проведення лікувально-профілактичних заходів у клініках ветеринарної медицини.

Загалом розрізняють наступні види дезінфекції: осередкову та профілактичну. Осередкову дезінфекцію проводять у вогнищі інфекційної хвороби, тобто у місці, де було виявлено хворих тварин чи людей (приміщення, певна територія) [74, 33, 10]. Профілактична дезінфекція – це сануюча обробка об'єктів, на яких можлива наявність патогенних мікроорганізмів без виявлення інфекційного джерела (дезінфекція кормів, води, приміщень, тощо) [26, 27, 188].

Осередкова дезінфекція, в свою чергу, поділяється на поточну і заключну. Осередкову поточну дезінфекцію, зазвичай, проводять у присутності хворих тварин (джерела інфекції) і спрямована вона на негайне знищення інфекційних збудників у місці їхнього існування. Дану дезінфекцію проводять постійно упродовж всього періоду часу поки наявні

хворі тварини, тобто до закінчення їхньої заразності [33, 88]. Особливо актуальна поточна дезінфекція за кишкових інфекціях тварин [5, 2].

Осередкову заключну дезінфекцію проводять в епізоотичному осередку після звільнення від джерела інфекції, після видужування тварини або її загибелі. Мета заключної дезінфекції – це повне знищення збудників інфекції, які залишилися в приміщенні перебування хворих тварин. Зазвичай даний вид дезінфекції проводять одноразово, на відмінну від поточної [5, 26]. Найбільш вагомий вплив заключна дезінфекція має на збудники інфекційних хвороб, які тривалий час існують у навколишньому середовищі (збудник туберкульозу, тощо) [74, 33]. Тому обсяги і терміни проведення осередкової дезінфекції та застосування деззасобів для її проведення напряму залежать від біологічних властивостей патогенних збудників та санітарного стану осередку [88, 5].

Профілактичну дезінфекцію здійснюють за відсутності наявного джерела інфекції, проте, передбачається можлива його наявність. Даний вид дезінфекції постійно виконують на об’єктах громадського харчування, водопостачання, підприємствах харчової промисловості, забійних цехах, ветеринарних клініках, тощо [26, 27].

1.2. Ринок дезінфікуючих засобів в Україні. Основні діючі речовини у деззасобах

Дезінфікуючі засоби відповідно до класифікатора нормативних документів ДК 004:2008 поділяються на дві групи: 1) дезінфікуючі та антисептичні засоби; 2) хімікати для промисловості та побутової дезінфекції [96]. Дезінфікуючі засоби − це хімічні речовини, що застосовуються на об'єктах неживої природи для інактивації практично всіх визнаних патогенних мікроорганізмів [189, 54, 92, 67]. Відповідно до даних реєстру дезінфікуючих засобів на 2020 рік кількість деззасобів, які були зареєстровані становила близько 200 штук, водночас, на частку засобів вітчизняного виробництва припадало близько 40 % [54, 115, 8]. Серед

великого асортименту зареєстрованих сучасних дезінфікуючих засобів діючі речовини, в основному, відносяться до четвертинних амонієвих сполук, хлоративних речовин, похідних гуанідину, формалдегідів, глутарового альдегіду, перекису водню, надоцтової кислоти, пероксидів, пергідролів, гідропероксидів, озону, наночасток металів, спиртів, лугів, кислот, тощо та комбінації даних речовин між собою [96, 67]. Найбільшу частку дезінфікуючих засобів іноземного виробництва становлять засоби таких країн, як Німеччина, Англія, Швейцірія, Ізраїль, Білорусь та Росія. На частку відомих вітчизняних дезінфікуючих засобів припадає всього 10 %, серед них це такі деззасоби: Полідез, Біомой, Бланідез, Екодез, Хлорантоїн, Неохлор, Дескозал, Дескосепт, Делаксон, Одоксон, Локодин, Неоцид, Ріапан, Ефект Плюс, Вітасепт, тощо [54]. Крім того, у ветеринарній практиці поширені засоби, які містять у своєму складі ефірні олії, що дозволяє застосовувати їх в присутності тварин. Такі засоби не мають проявляти подразнюючої та сенсибілізуючої дії. У клініках ветеринарної медицини для обробки інструментів (скальпелі, пінцети, зажими) та обладнання, столів, застосовують такі деззасоби, як Бланідез, Екодез, Сульфаніос лемон фреш. Для можливого впровадження у виробництво розроблених дезасобів вони повинні ретельно перевірятися у лабораторних та виробничих умовах та відповідати певним вимогам залежно від мети, де вони будуть застосовуватися: проявляти високу протимікробну активність, навіть проти резистентних штамів мікроорганізмів, бути слабокорозійними та безпечними, як для персоналу, так і для навколишнього середовища (повний біорозпад на нешкідливі речовини), бути стабільними при зберіганні і транспортуванні, добре розчинятися у воді за різних температур, мати низький поверхневий натяг, стабільність робочих розчинів тощо [193, 194, 23, 217].

Проте, незважаючи на велику кількість, як вітчизняних, так імпортних дезінфікуючих засобів ідеального препарту, який би відповідав усім вимогам не існує. Основні причини зниження ефективності від застосування деззасобів полягають у тому, що мікроорганізми швидкими темпами

виробляють стійкість до діючих речовин, тому виробникам постійно приходиться поєднювати діючі речовини із різних класів та з різним механізмом дії.

1.3. Оцінка якості дезінфекції. Чинники, які впливають на активність дезінфікуючих засобів у виробничих умовах

Дезінфікуючі засоби наносять на неживі поверхні для швидкого знищення або інактивації вегетативних та спорових мікроорганізмів. Водночас, антисептики мають подібну дію до дезінфектантів, але використовуються на живих тканинах, зокрема щодо санації шкіри. Дезінфікуючі засоби, як правило, порушують функцію цитоплазматичної мембрани, нуклеїнових кислот або інших біологічних компонентів клітини мікроорганізмів, які впливають на її життєдіяльність [171, 108, 57].

Під час базового лабораторного тестування біоцидної активності дезінфікуючих засобів встановлюють відповідні робочі концентрації та час експозиції для загального та спеціального застосування, а також враховують безпечність їх для навколишнього середовища. Встановлена робоча концентрація та час дезінфікуючої дії під час лабораторних випробувань повинен бути повторюваним в одній лабораторії та відтворюваним в різних лабораторіях. Результати також повинні давати відповідь на питання ефективності проведеної дезінфекції (ефективна/неефективна або навести кількісні значення щодо виявлених мікроорганізмів) [132].

Під час розроблення нових дезінфікуючих засобів особливе значення має використання методів і методик, які максимально розкривають їх бактерицидний потенціал. При цьому основні дослідження проводяться у лабораторних умовах, а тому застосовані методи мають відтворювати їх ефективність у польових умовах. Чинники, що мають особливе значення для встановлення біоцидного ефекту в лабораторних дослідженнях, включають: температуру, концентрацію дезінфікуючого засобу та час впливу, органічне середовище, біоплівку, якість поверхні та її змочуваність водою, тощо [132].

1.3.1. Вплив органічних речовин на дезінфікуючу дію біоцидів

Органічне середовище (ґрунт) є майже універсальним у тваринницькому приміщенні, тому з такою органічною субстанцією сильно пов'язане зниження ефективності дезінфікуючого засобу [160, 137, 219]. Наявність у середовищі дії дезінфікуючого засобу органічних речовин зумовлює взаємодію засобу із молекулами органіки, що призводить до зниження активності біоциду [121].

Зазвичай, у лабораторних дослідженнях для моделювання біологічної нагрузки на дезінфікуючий засіб та підвищення відтворюваності досліджень використовують сироватку крові тварин, сироватковий альбумін або дріжджі [123, 184, 10, 27, 55]. У дослідженнях було використано суміш високо- та низькомолекулярних поліпептидів (бичачий сироватковий альбумін плюс триптон або дріжджовий екстракт) плюс слизовий матеріал (бичачий муцин) [199, 152]. Деякі дослідження, зосереджені на польових умовах, випробовували більш складні матеріали, включаючи композити молочного жиру/білка, фекалії та курячу підстилку [175, 144, 145]. Однак стандартизація таких матеріалів є складною, але деякі, наприклад, знежирене молоко, може бути використане, так як дає добре відтворювані результати. Оцінка дезінфектантів на біоплівкових формах бактерій наразі не є частиною рутинних оцінок, але зараз уже розроблено стандарти та методики для їх тестування [48, 46]. Проте складність дослідження на біоплівкових мікроорганізмах пов'язана, зокрема, з вирощуванням біоплівок. Існують різноманітні умови вирощування біоплівок, які важче контролювати як планктонні форми мікроорганізмів [114, 207, 49].

Мікроорганізми, які перебувають на поверхні у висушеному стані, можуть проявляти підвищену стійкість до дії дезінфікуючих засобів, але вони також спонтанно втрачають життєздатність протягом кількох годин, що вимагає жорсткого контролю за часом підготовки та проведення тестування на сухих тест-об'єктах [184]. Крім того, види бактерій, які використовуються у мікробіологічних тестах з встановлення режимів дезінфекції, тобто

щільність посівного матеріалу в досліджуваному середовищі, суттєво впливатимуть на структуру поверхневого розподілу та відтворюваність результатів досліджень.

1.3.2. Значення твердості води для приготування робочих розчинів та ефективність дезінфекції

Твердість води (розчинені мінерали кальцію та магнію) має значний вплив на взаємодію між певними комбінаціями бактерій і біоцидів [107], а стандартизовані тести у лабораторних умовах зазвичай використовують деіонізовану чи дистильовану воду [98], або воду певної жорсткості [123, 37]. У польових умовах, зазвичай, використовують водопровідну воду централізованого водопостачання чи із свердловин, яка має різну твердість, pH та може містити вільний хлор, тому ці фізико-хімічні фактори можуть мати вплив на ефективність дезінфекції, а результати будуть відрізнятися від отриманих у лабораторних умовах [99, 131, 35, 80].

1.3.3. Вплив рельєфу поверхні об'єктів ветеринарного нагляду на дію дезінфікуючих засобів

Неабияку роль має вплив поверхні на якість проведеної дезінфекції. Зокрема, шорсткість, пористість, хімічна природа матеріалу та його гідрофобність − це ті параметри, які необхідно контролювати для з'ясування реальної дії дезінфікуючих засобів у виробничих умовах. Наприклад, поверхня поліетиленових систем, бетонних, металевих і дерев'яних конструкційних матеріалів значно відрізняються як за шорсткістю, так і за гідрофобністю [162, 201, 40, 41, 78]. У лабораторних випробуваннях, як правило, використовують високостандартизовані поверхні матеріалів (нержавіюча сталь, скло, алюміній, тощо) певної шорсткості [42, 40, 201]. Результати лабораторних досліджень [162, 172, 126] та польових випробувань [121, 124, 173] підкреслюють тенденцію наявності грубих і пошкоджених поверхонь об'єктів, що дезінфікуються у виробничих умовах,

що, в свою чергу, призводить до зниження ефективності дезінфікуючих засобів. Крім того, пористі поверхні мають велику площу поверхні та, можливо, розширені можливості для прикріплення мікроорганізмів різних видів. Тому рельєф поверхні також впливає на зниження бактерицидної та віруцидної дії дезінфікуючих засобів [161, 143, 170, 177].

Від режимів застосування дезінфікуючого засобу напряму залежить змочувана здатність та ефективність дезінфекції [25, 14]. У стандартизованих тестах певний об'єм дезінфікуючого засобу наноситься на тест-поверхню або наноситься за допомогою встановленої схеми протирання чи розпилення [15, 73, 68]. Водночас, у звичайних виробничих умовах у більшості випадків дезінфекцію у приміщеннях та різних поверхонь проводять методом розпиленням за допомогою різних апаратів [32, 1, 61, 100]. За таких умов при застосуванні малих обсягів дезінфікуючого засобу значний вплив може мати випаровування на ефективність дезінфекції, а більші об'єми можуть збільшити час санітарної обробки [101, 16, 52]. Виявлено, що тривалість сушіння після дезінфекції протягом одного або кількох днів може істотно збільшити бактерицидний ефект даного режиму, принаймні для матеріалів, де відбувається добре висихання [61, 162, 173]. Водночас, нанесення дезінфікуючого засобу на пористі поверхні забезпечує більше поглинання деззасобу [113]. Враховуючи даний факт, необхідно використовувати відповідні та постійні об'єми за певної температури та вологості в лабораторних та польових умовах.

Останнім часом для дезінфекції тваринницьких приміщень використовують такі повітряні системи, як аерозолі (туманні або іонізовані системи «сухого туману») або дезінфікуючий пар [122, 160, 197]. Під час лабораторних випробувань даних систем дезінфекції (використовували несучі поверхні з нержавіючої сталі, які були розміщені в різних місцях кімнати) [150, 90], встановлено що вплив місця розташування, доза розпилення може істотно впливати на вірусоцидну дію дезінфікуючого

засобу [216], тому були розроблені стандартні протоколи випробувань для такого способу дезінфекції.

1.3.4. Залежність бактерицидної дії деззасобів від концентрації, часу та температури розчинів

Відомо, що інактивація збудника на поверхні, що дезінфікується чітко залежить від часу впливу (контакту), концентрації дезінфікуючого засобу та температури робочих розчинів – існує прямий кореляційний зв'язок, який підтверджений, як у лабораторних, так і польових умовах [29, 53, 119]. Різні класи дезінфікуючих засобів суттєво відрізняються за бактерицидною дією залежно від коефіцієнта розведення. Наприклад, активність фенольних і крезолових дезінфектантів швидко знижується зі зменшенням концентрації (високий коефіцієнт розведення), тоді як ЧАС мають низький коефіцієнт розведення, і тому вони можуть проявляти ефективну протимікробну дію за низького діапазону концентрацій [138, 88]. Зазвичай час витримки, тобто впливу дезінфектанта на мікробні клітини у лабораторних тестах застосовується в інтервалах від 5 до 30 хвилин [33]. П'ять хвилин експозиції вважається реалістичним для непінних дезінфікуючих агентів на водній основі, які наносяться на непористі вертикальні поверхні [158]. Хоча в деяких випадках даної експозиції може бути недостатньо для отримання доброї знезаражуючої дії на поверхнях у виробничих умовах. Особливо там, де присутній органічний матеріал, що заважає подовженню терміну дії дезінфектанта [105]. Проте в таких випадках підвищена концентрація дезінфікуючого засобу може вкластися у такий час, однак збільшиться витрата засобу [151, 95]. Дуже короткий час контакту дезасобу з поверхнею, який зустрічається в сільськогосподарській та ветеринарній практиці під час використання занурювань, зазвичай, не враховується стандартними тестами, і вони створюють проблеми для лабораторних досліджень. Тим не менш, ця інформація може бути дуже актуальною для щоденного використання дезінфікуючих засобів на фермах, де є велика кількість мікроорганізмів [132].

Температура навколишнього середовища добре корелює з бактерицидним ефектом навіть у лабораторних і польових випробуваннях [113, 53, 21, 195], але польові температури (особливо в більш холодному кліматі) можуть помітно відрізнятися від тих, які, зазвичай, використовуються в лабораторії, що робить конкретне тестування при таких температурах потенційно більш інформативним і надійнішим, ніж екстраполяція на основі «стандартних» температурних результатів [66, 93, 3].

1.3.5. Мікробна біоплівка, як форма захисту та формування стійких мікроорганізмів до дезінфікуючих засобів

У більшості вологих середовищ мікроорганізми здатні прилипати до поверхні та формувати на них матриці з позаклітинних полімерних речовин – біоплівку [167, 186, 180, 185]. В основному біоплівка складається з власне мікроорганізмів, які перебувають у моно- чи змішаному з іншими видами бактерій, з екзополісахаридів, білків та нуклеїнових кислот [154, 130, 112].

Хоча в літературі [168, 154, 186, 180] наведено багато схематичних моделей процесу формування біоплівок, всі вони включають наступні стадії рис. 1.1.

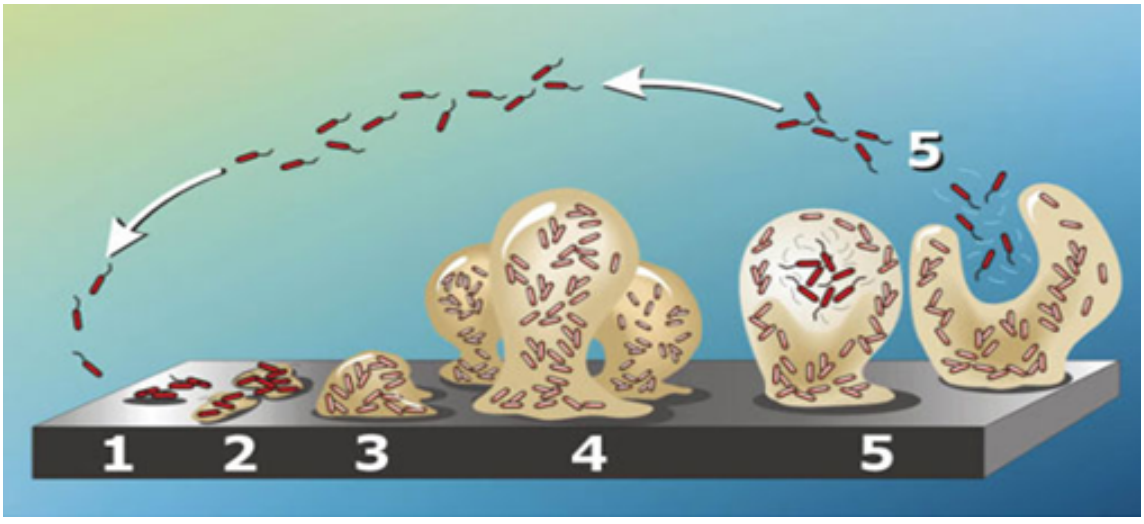

Рис. 1.1. Гіпотетична модель формування мікробної біоплівки [154]

Примітки: стадія 1 –прикріплення (адгезія) бактерій до поверхні; 2–4 стадії – це ріст і розвиток бактерій та формування колоній з одночасним продукування екзополімерного матриксу, тобто процес трьохмірного утворення біоплівки; 5 –

дисперсія (вихід планктонних бактерій із біоплівки). Мікроорганізми, які знаходяться у верхньому шарі екзополімерного матриксу плівки, продукують планктонні клітини, мета яких колонізувати інші поверхні [154, 168].

Формування і дозрівання біоплівки – це складний динамічний процес, який складається з послідовних молекулярних і фізіологічних механізмів, які проходять протягом усіх стадій [140, 220]. Біоплівки складаються з позаклітинного матриксу, який представляє собою стабільну структуру, котра захищає бактерії від дії деззасобів (інших чинників), погіршує їх контроль і забезпечує постійне повторне забруднення інших поверхонь [166, 125]. Другим, не менш важливим механізмом, з яким пов'язують збереження бактеріальних клітин у біоплівці, вважається експерсія генів в багатоклітинній популяції, що спричиняє перехід деяких мікробних клітин в стан спокою або персестенції, тобто спостерігається неспадкова стійкість або толерантність до різних протимікробних препаратів [212, 221]. Загалом, відповідно до досліджень [168, 154, 186, 180], фундаментальні принципи організації мікроорганізмів у біоплівці основані на таких твердженнях:

− убіквітарність мікробних біоплівок, як домінанти існування мікроорганізмів у навколишньому середовищі (практично всі бактерії формують біоплівки на різних об'єктах і поверхнях;

− опуртунізм мікробів у біоплівці, який характеризується здатністю перебувати в організмі у вигідній для себе формі, безсиптомне носійство (наявність золотистого стафілококу на шкірі дійок корів, на шкірі собак у здорових тварин), так і здатність спричиняти хронічні інфекції (субклінічний мастит, піодермії, тощо), а деколи і сепсис при зниженні імунітету за різного генезу;

− наявність антибіотикостійких мікробних клітин у біоплівці – персистерів. Після дії біоцидів персистери відновлюють першопочаткову популяцію у новосформованій біоплівці. Персистери – це бактерії альтруїсти, які жертвують швидким розвитком заради виживання всієї популяції

мікроорганізмів за наявності шкідливих антимікробних агентів;

− наявність екзополісахаридного матриксу біоплівки, який на 90 – 95 % складається із води і являє собою одночасно «тіло» біоплівки та субстрат задля обміну сигнальними молекулами генетичної інформації;

− наявність відчуття кворуму (quorum-sensing) – властивість мікроорганізмів у біоплівці «спілкуватися» сигнальними молекулами між собою. Це дозволяє колоніям бактерій у біоплівці регулювати колективну поведінку та функціонувати як цілий організм із самостійною регуляцією розмноження, росту, захисту, патогенності і вірулентності.

Саме стійкість мікроорганізмів до дезінфікуючих засобів часто асоціюється з наявністю біоплівки на поверхнях, що обробляються [168, 159, 176, 50, 38], оскільки матриця біоплівки є дифузійним бар'єром і нейтралізуючим середовищем для багатьох біоцидів [176, 148, 180]. Даний захисний ефект залежить від: поверхні субстрату, віку біоплівки, гідратації, умов зсуву рідини під час утворення біоплівки та різноманіття видів мікробів у біоплівці [204, 198, 190, 135, 163, 139]. Мікрорганізми, які «вбудовані» в біоплівку, часто демонструють меншу чутливість до біоцидів, ніж аналоги, висохлі на поверхнях [114, 203, 209], і вони помітно менш чутливі, ніж планктонні клітини [149, 177, 191, 205].

У дослідженнях, проведених авторами [56], повідомляється, що різні види сальмонел, які були виділені з клінічного матеріалу та музейні штами формували біоплівки з високою оптичною густиною. При дії на вирощені біоплівки сальмонел трьома дезінфікуючими засобами із різними діючими речовинами: із класу четвертинно-амонієвих сполук; хлорутримуючих засобів; на основі похідних полігексаметиленгуанідин гідрохлориду встановлено, що мінімальна бактерицидна концентрація дезінфікуючих засобів була в 4 – 16 разів вища, порівнюючи з тою, яка діяла на ці бактерії у планктонному стані. Автори стверджують, що такі особливості стійкості бактерій у біоплівках необхідно обов'язково враховувати у лікувальних закладах при проведенні дезінфекційно-стерилізаційних заходів.

У дослідженнях [106, 141, 211] виявлено, що дезінфекція за допомогою діоксиду хлору та хлорвмісними засобами добре зменшувала кількість планктонних бактерій, але слабо впливала на вміст бактерій у біоплівках. Також було виявлено [146], що дезінфікуючі засоби на основі перекису водню у робочих концентраціях не впливали клінічні ізоляти *Acinetobacter spp., Klebsiella pneumoniae та Pseudomonas aeruginosa,* що перебували у біоплівках та були виділені в медичних установах. Однак, планктонні форми даних бактерій були чутливими до цих біоцидів. Автори вказують на необхідність перевірки ефективності деззасобів на біоплівкових бактеріях, а не на планктонних, так як це ставить під загрозу застосування таких засобів для контролювання поширення даних патогенів. Повідомляється [3], що лужний мийно-дезінфікуючий засіб «Санактив» (діючі речовини: четвертинна амонієва сполука – катамін та гідроксид натрію) у 0,5 % концентрації та за температури розчинів 65±2 °С інгібував бактерії *S. aureus, E. faecalis* у біоплівці протягом 10 хв дії, а *E. coli і P. aeruginosa* протягом 30 хв впливу. Активність засобу щодо руйнування біоплівки автори пояснюють високим значенням pH засобу (12 од) завдяки наявності лугу. Засіб «Мілкодез» (діючі речовини полігексаметиленбігуанідину гідрохлорид та ортофосфорна кислота) знижував щільність біоплівок до низької у *S. aureus, E. coli і P. aeruginosa* після 15 хв експозиції за температури 70 °С [191]. У даному випадку автори пояснюють деградацію біоплівки коагулюючою дією ортофосфорної кислоти.

У іншому дослідженні [22] під час перевірки антимікробної активності дезінфікуючих засобів, що застосовуються у харчовій промисловості для миття і дезінфекції, отримані наступні результати. Дезінфікуючий засіб Медікарін у 0,03 % концентрації та П3-Оксоній актив 150 (0,3 % концентрація) діяли біоцидно як на плівкоутворюючі, так на планктонні тест-штами золотистого стафілококу, фекального ентерококу, кишкової та синьогнійної палички упродовж 30-ти хвилинної експозиції, тобто концентрації, зазначені в інструкції щодо застосування, були високоактивні

на зазначені форми бактерій. Водночас, такі засоби як Біомол, Чисто-пром ЛЗ, Біолайт за такого такого часу впливу на планктонні і плівкоутворюючі бактерії були зовсім не активні на біоплівки. Автори рекомендують при підборі засобів для санітарної обробки у харчовій галузі визначати їх ефективність не тільки на планктонних бактеріях у суспензійному тесті, але для цієї мети використовувати тести на плівкоутворюючих мікроорганізмах.

Дослідження повідомляють [45], що антисептики також слабше впливали на пілвкоутворюючі бактерії, ніж їх планктонні форми. Зокрема було встановлено, що серед ряду використаних антисептиків та дезінфектантів (хлоргексидин, дезактин) найбільш активний відносно золотистого стафілококу в біоплівці виявився хлоргексидин за концентрації розчинів 2 %, а дезактин діяв у 5 % концентрації. Відносно дії даних антимікробних агентів на штам *B. megaterium* виявлено, що він був стійкіший, порівнюючи з золотистим стафілококом. Так, у свіжовирощеній біоплівці кількість життєздатних бактерій становила від 10^8 до 10^{11} КУО/см^3 змиву з біоплівки, водночас при дії дезінфектантом кількість бактерій даного штаму зменшилася до 10^3 КУО/см^3 змиву. Тобто, дезінфектант практично на п’ять порядків зменшував кількість клітин у біоплівці, проте ще залишалися в середньому тисяча живих бактерій.

Доволі часто біоплівкові штами бактерій контамінують медичне і ветеринарне обладнання та інструменти. Встановлено [34], що у хворих у палатах інтенсивної терапії на ендотрахіальних трубках, катетрах, інплантах біоплівка формується із мультирезистентних до антибіотиків нозокомінальних штамів бактерій. При цьому, для видалення вбудованих у плівку бактерій необхідно було підвищувати в декілька разів концентрацію таких антисептиків, як декаметоксин, бензалконій хлорид, хлоргекисдину біглюконат, перекис водню, повідонйод. Водночас, планктонні форми цих бактерій добре знищувалися вказаними антисептиками у концентрації відповідно до інструкції. Автори пропонують визначати ефективність

протимікробних засобів на плівкоутворюючих штамах, виділених в стаціонарах, і пропонувати для знищення біоплівок ефективні концентрації.

При дослідженні впливу антимікробних препаратів з наночастками металів срібла, міді та за їх сумісного впливу на біоплівки грамнегативних бактерій у різних концентраціях було встановлено наступне. Наночастки металів срібла і міді пригнічують безпосередньо процес утворення біоплівки синьогнійної палички у концентраціях від 0,37 до 1,55 мг/дм^3. При дії даними наночастками металів на уже сформовані бактеріальні плівки у заданих концентраціях відмічали суттєве деградування біоплівки, сформованої синьогнійною паличкою – в середньому зменшення біоплівки відбувалося в 2,2 – 2,7 раза, проти контролю [65].

Повідомляється [75, 208], що значна частина антибіотиків різних фармакологічних груп та антисептиків не досягали бажаної плівкоруйнуючої дії на клінічні штами мікроорганізмів, виділених у хірургічному відділенні лікарень. Для досягнення бажаного лікувального ефекту під час впливу протимікробних засобів на бактерії у біоплівках дослідники пропонують застосовувати поряд із антибактеріальними препаратами фізичні методи, такі як електрофорез. За одночасного застосування електрофорезу із антисептиками та антибіотиками відмічали майже повністю деградацію мікробних біоплівок. При цьому пропонується застосовувати електрофорез силою струму від 0,05 до 0,1 мА/см^2 площі біоплівки, а з антисептиків – діоксидин.

Отже, з оглянутих літературних джерел видно, що фізіологічні механізми захисту бактерій від чинників навколишнього середовища у вигляді формування біоплівки створюють серйозну проблему в різних галузях народного господарства, проте найбільше у медичній, ветеринарній та харчовій. У ветеринарії і медицині при лікуванні різних хронічних інфекцій та при застосуванні антибіотиків, антисептиків чи дезінфікуючих засобів постає питання максимального знищення всіх бактерій, як у планктонному стані, так і біоплівковому, оскільки мінімально збережена

(вижившa) кількість бактерій забезпечить відновлення популяції на об’єктах. Тому необхідним є пошук нових безпечних методів у боротьбі з мікробними біоплівками, які є збудниками хвороб тварин і людей.

1.4. Ензими, як складові компоненти біоцидних зсобів для деградації мікробних біоплівок

Враховуючи те, що зазвичай позаклітинні полісахариди є переважаючим комплексом матриці мікробної біоплівки [164, 167, 58], а також білки і ДНК, де вони залучені для взаємодії з поверхнями мікробних клітин [181, 178, 128], використання засобів з ферментами, що руйнують позаклітинний матрикс є можливою альтернативою стандартним деззасобам, які не завжди дають задовільні результати у видаленні біоплівки.

На сьогоднішній день вже є звичайним прикладом наявність протеаз у мийних засобах, які застосовуються у медичній практиці для очистки медичного устаткування [24, 156, 187], в харчовій промисловості для застосування в CIP-системах миття і дезінфекції [153, 213, 210]. Другим типом ензимів, які застосовуються у розробці ферментних засобів для санітарної обробки є амілази. Їх використовують для видалення органічних залишків, які містять крохмаль [102, 118]. Проте, через широку неоднорідність позаклітинного матриксу біоплівки у різних видів бактерій [102, 213], одночасний пошук для використання нових ензимів є постійно актуальним. Найбільш часто світові виробники, зокрема Датська компанія Novozymes® [20, 182], використовують наступні ензими для створення мийних і дезінфікуючих засобів у різних галузях народного господарства.

Savinase 16 L – це протеаза мікробного походження у рідкому стані, під дією якої проходить гідроліз пептидних зав’язків в білках. Це ензим найбільш затребуваний до використання при створенні мийних засобів для побутового використання. Ефективно розкладає навіть старі білкові забруднення, розчиняючи їх на дрібні дисперсні системи, які легко видаляються поверхнево активними речовинами, наявними у засобі.

Застосування даної протеази дозволяє знизити температуру обробки, оскільки вона активна за температури від + 10 до + 60 °С та в широкому діапазоні pH середовища від 7 до 11 од. Також даний ензим не має алергенної дії і відноситься до гіпоалергенних продуктів [20, 182].

Everlase 16 L – це також протеаза мікробного походження для рідких засобів, досить активна відносно білків молекул (молочних, м'ясних, яєчних продуктів, крові, трави, какао, тощо). За допомогою даного ензиму можна створювати значну кількість мийних та інших засобів для різних галузей та для побутових потреб. На відміну від *Savinase 16 L* ензим *Everlase 16 L* більш стабільна особливо при використанні її із перекісними сполуками, перекарбонатами та має ширший спектр дії. Активна також за низьких і високих температур обробки (+10 +65 °С) та в широких межах pH 7 – 11 од. Дозволяє виробництво екологічних засобів, так як продукт має гіпоалергенні властивості [20, 182].

Liquanase 2.5 L − спеціально отримана протеаза для ефективної дії на пептидні зв'язки білкових молекул крові. Призначена для виробництва рідких мийних засобів для використання у медичній галузі з метою видалення залишків крові, тканин із медичного обладнання та інструментів. Відрізняється м'якою, швидкою та ефективною дією щодо гідролізу органічних речовин. Активна за температурних діапазонів та значень pH середовища, як і ензим *Savinase 16 L* [20, 182].

Termamyl 300 L – це ензим амілаза для рідких мийних засобів з механізмом дії на амілозу і амілопектин через гідроліз ендо-1,4 зав'язків у крохмалі. Дана амілаза широко використовується в мийних системах у комбінації із протеолітичними ензимами виробництва *Novozymes* і з високою ефективністю видаляє забруднення крохмальної природи [20, 182].

Stainzyme 12 L – також рідка амілаза з аналогічним механізмом дії на амілозу і амілопектин, як ензим *Termamyl 300 L*, проте має відмінність у тому, що її використовують у засобах, в яких необхідно знизити температуру

та час обробки. Дана амілаза проявляє високоактивну дію навіть на старі забруднення [20, 182].

Lipex 100 L – це рідка ліпаза, яка діє на тригліцероли жирів тваринного походження та рослинних олій, спричиняє гідроліз ефірних зав'язків у тригліцеролах. Дана ліпаза є високоефективна при введенні у мийні засоби, оскільки видаляє засохлі жирові забруднення навіть за низьких режимів обробки. Особливістю ліпази *Lipex 100 L* є те, що вона стабільна, не потребує введення додаткових систем для запобігання канібалізму, легко видаляється із об'єкту та гіпоалергенна, екологічна, оскільки швидко розкладається у навколишньому середовищі. Проявляє високу ефективність за температури від + 20 до + 60 °С та pH середовища від 7 до 11 од. Відноситься до ензимів преміум сегменту [20, 182].

Таким чином, ензими, як складові для мийних і мийно-дезінфікуючих засобів, цікаві у застосуванні завдяки їх ефективній дії за широкого температурного діапазону від 10 до 60 °С та низькій концентрації застосування. Крім того, після їх використання вони здатні до швидкого біорозпаду і не впливають негативно на навколишнє середовище. Проте до недоліків практично усіх ензимів відносять те, що їх потрібно стабілізувати у мийному чи дезінфікуючому засобі, так як вони здатні проявляти явище канібалізму між собою [157, 182].

Літературні дані повідомляють, що актуальним і перспективним у системі санітарно-дезінфекційних заходів боротьби з мікробними біоплівками на об'єктах ветеринарного нагляду є поєднання дезінфікуючих субстанцій із різними ензимними системами [85, 56]. У дослідженнях зазначається [64], що ензимний препарат «Циторецифен-М» при дії на сформовані біоплівки синьогнійної палички у концентрації 25 мг/см^3 значно приводив до деградації матриксу, а відповідно і зменшення клітин у біоплівці. Зокрема, при дії «Циторецифен-М» на сформовані 48-годинні біоплівки, оптична густина розчинів з біоплівок зменшувалася в середньому у 4,5 раза, а при дії на 72-годинні біоплівки синьогнійної палички деградація

біоплівки відбулася в 5,7 раз. У склад препарту «Циторецифен-М» входять наступні ензими мікробного походження: протеїнази, протеази, мурамідази, глікозидази, тому автори вважають, що використання даного препрату в комплексі з іншими біоцидними препратами є актуальним для боротьби із плівкоутворюючими бактеріями. Водночас, інші дослідники [200] повідомляють, що такі ензими, як папаїн, вобензин та трипсин можуть бути як активними у процесі деградації, так і стимулюванні росту мікробної біоплівки. Вони виявили, що дані ензими в концентрації 100 мг/дм^3 за сумісного інкубування у поживному середовищі протягом 24 год спричиняли збільшення маси біоплівки. Однак, зменшення концентрації вобензиму у середовищі з мікроорганізмами до 5 – 50 мг/дм^3 спричиняло до пригнічення плівкоутворення у кишкової палички. Тобто, дослідники виявили дозозалежний ефект від застосування даних ензимів.

У дослідженнях [44, 51] при вивченні впливу гліколітичних і протеолітичних ензимів (Баразим LTAA3L, Баразим HTAA30L, Баразим GA150L, нейтральна протеаза, трипсин) на мікробні біоплівки, сформовані на різних видах доїльного і молочного обладнання виявили наступне. Біоплівки таких грампозитивних бактерій, як стрептококів, стафілококів, ентерококів та мікрококів були стійкішими до дії протеолітичних ензимів, ніж грамнегативної мікрофлори, оскільки деградація матриксу відбувалася тільки на 50 %. При цьому встановлено, що оптимальною концентрацією трипсину, щодо руйнування біоплівок усіх взятих у дослід бактерій виявилася 75 мг/дм^3, а нейтральної протеази 0,5 мг/дм^3 та часу експозиції від 15 до 30 хв. Сформовані біоплівки під впливом гліколітичних ензимів (Баразим LTAA3L, Баразим HTAA30L, Баразим GA150L) зазнавали різної деградації, зокрема найактивнішим був ензим Баразим LTAA3L, який спричиняв зменшення оптичної щільності біоплівки усіх бактерій в 1,4 – 3,0 раза за концентрації 1,25% протягом експозиції 15 хв. Інші, взяті у дослід гліколітичні ензими, спричиняли зменшення оптичної щільності біоплівки в 1,3 – 2,4 раза. Проте, дані дослідники вказують, що застосування в комплексі гліколітичних та

протеолітичних у різних комбінаціях вище наведених ензимів протягом 15 хв експозиції видаляло практично усі сформовані біоплівки грамнегативних та грампозитивних бактерій. Дослідники вказують, що екзополісахаридний матрикс даних мікроорганізмів на молочному обладнанні складається з білкових і полісахаридних компонентів практично в однаковому співвідношенні. Тому вони пропонують для ефективного проведення санітарних заходів щодо очистки, миття і дезінфекції доїльного устаткування необхідно розробляти та впроваджувати у промисловість мийні чи дезінфікуючі засоби із ензимними компонентами.

В Україні наявний на ринку ензимний засіб «Біомой» [24], який призначений для застосування з метою достерилізаційного очищення виробів медичного призначення (гума, скло, вироби з металу, ендоскопи, тощо. У склад засобу входять поверхнево-аквтивна речовина сульфанол, протеолітичний ензим – нейтральна протеаза та комплексони натрію карбонат та натрію триполіфосфат. Засіб застосовують у 0,15 – 0,5 % концентрації, проявляє добрі змочувальні та мийні властивості для видалення білково-жирових забруднень, залишків крові, лікарських та дезінфекційних засобів, добре змивається, не залишаючи нальоту.

Інший дезінфікуючий засіб «Бланідас Актив Ензим» [81] містить у своєму складі четвертинні амонієві сполуки, полігексаметиленгуаніди та ензими. Даний дезінфікуючий засіб має дуже широку сферу застосування у медичній (лікарні), фармацевтичній (аптеки), стоматологічній (поліклініки і кабінети), косметичній (салони) галузях, громадському харчуванні і торгівлі (їдальні, кафе, ресторани, заклади торгівлі), харчовій промисловості (хлібопекарські підприємства), закладах сфери відпочинку і розваг, освітніх закладах, тощо. Засіб застосовують у концентрації від 0,025 % до 0,5 %, що залежить від виду дезінфекції та засобів, які підлягають обробці. Як бачимо, засіб має широку антимікробну, протигрибкову та противірусну дію, що дозволяє його активно використовувати у багатьох сферах.

У дослідженнях виявлено, що ферментні засоби мали значну ефективність у зниженні щільності біоплівки *P. aeruginosa* та її деградації з різних поверхонь [213, 102]. Зокрема, дослідники [169, 215] використали синтетичні полісахариди для руйнування матриксу біоплівок сформованих псевдомонадами, інші [179, 85] використали мікробні амілази і протеази для руйнування біоплівок грампозитивних і грамнегативних бактерій. Однак, дослідники схиляються до однієї думки, що завдяки неоднорідності складу матриці біоплівки використання моноферментів має обмежуючий потенціал. Тому для ефективного застосування на практиці ферментних препаратів необхідно всебічно розуміти процес росту і розвитку біоплівки на конкретному об'єкті із знанням орієнтовного складу можливої мікрофлори. Крім того, доцільним є поєднання різних класів ферментів із біоцидними субстанціями для кращого контакту останніх із бактеріальними клітинами.

Отже, застосування ферментів у комбінації з антибактеріальними речовинами для деградації біоплівки і зниження вмісту мікроорганізмів є перспективним і має важливе значення у багатьох галузях народного господарства.

1.5. Підсумки з огляду літератури

Отже, з літературних джерел попередніх та даного розділів виявлено, що бактеріальні клітини у матриксі біоплівки набагато стійкіші від їх планктонних форм до біоцидних препаратів різних фармакологічних груп, а звичайне збільшення концентрації у декілька разів антисептиків і антибіотиків не є виправданим та перспективним в системі лікувальних та санітарних заходів. Тому перед науковцями стоять завдання пошуку нових рішень та стратегій у боротьбі із мікробними біоплівками на об'єктах ветеринарного нагляду. В системі проведення дезінфекції чи санітарної обробки одним із напрямків боротьби із плівкоутворюючими мікроорганізмами на різних поверхнях є розробка нових дезінфікуючих засобів, які б включали субстанції, що впливають як на екзополімерний матрикс біоплівки, так на самі клітини мішені.

РОЗДІЛ 2
ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційна робота виконувалася на кафедрі інфекційних та інвазійних хвороб та кафедрі ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет» (м. Кам'янець-Подільський) протягом 2019 – 2022 років. Виробничі дослідження проводили у приватних клініках ветеринарної медицини м. Кам'янець-Подільський (ветеринарна клініка «VitaeVet»), м. Чернівці (ветеринарна клініка «Пан Коцький» та «VetLife») та м. Чортків (ветеринарна клініка «ZooVetSkill»).

Основним напрямком роботи було експериментально обґрунтувати та розробити дезінфікуючий засіб на основі ЧАС, похідних біогуанідину та протеолітичних і гліколітичних ензимів, активного щодо бактерій у біоплівках за органічного забруднення, для застосування у клініках ветеринарної медицини. Дисертаційна робота виконувалась за загальною схемою, яка наведена на рис. 2.1. Як бачимо, схема експериментальних досліджень складалася з п'яти етапів.

На першому етапі досліджень було проаналізовано перспективні дезінфікуючі субстанції, які можна поєднати із ензимами для створення нового дезінфікуючого засобу. Досліджено активність дезінфікуючих субстанцій із класу ЧАС − катамін АБ (алкілдиметилбензиламоній хлорид) (Інтерсинтез, Україна), похідних біогуанідину − Вантоцил TG (полігексаметиленбігуанідин гідрохлорид) **(**Arch Biocides LTD, Велика Британія**)**. Визначено їх мінімальну бактерицидну концентрацію на планктонних і біоплівкових формах бактерій, залежно від pH розчинів та поєднання з протеолітичним ензимом – *Everlase 16 L* та амілолітичним ензимом – *Termamyl 300 L* (Novozymes, Данія).

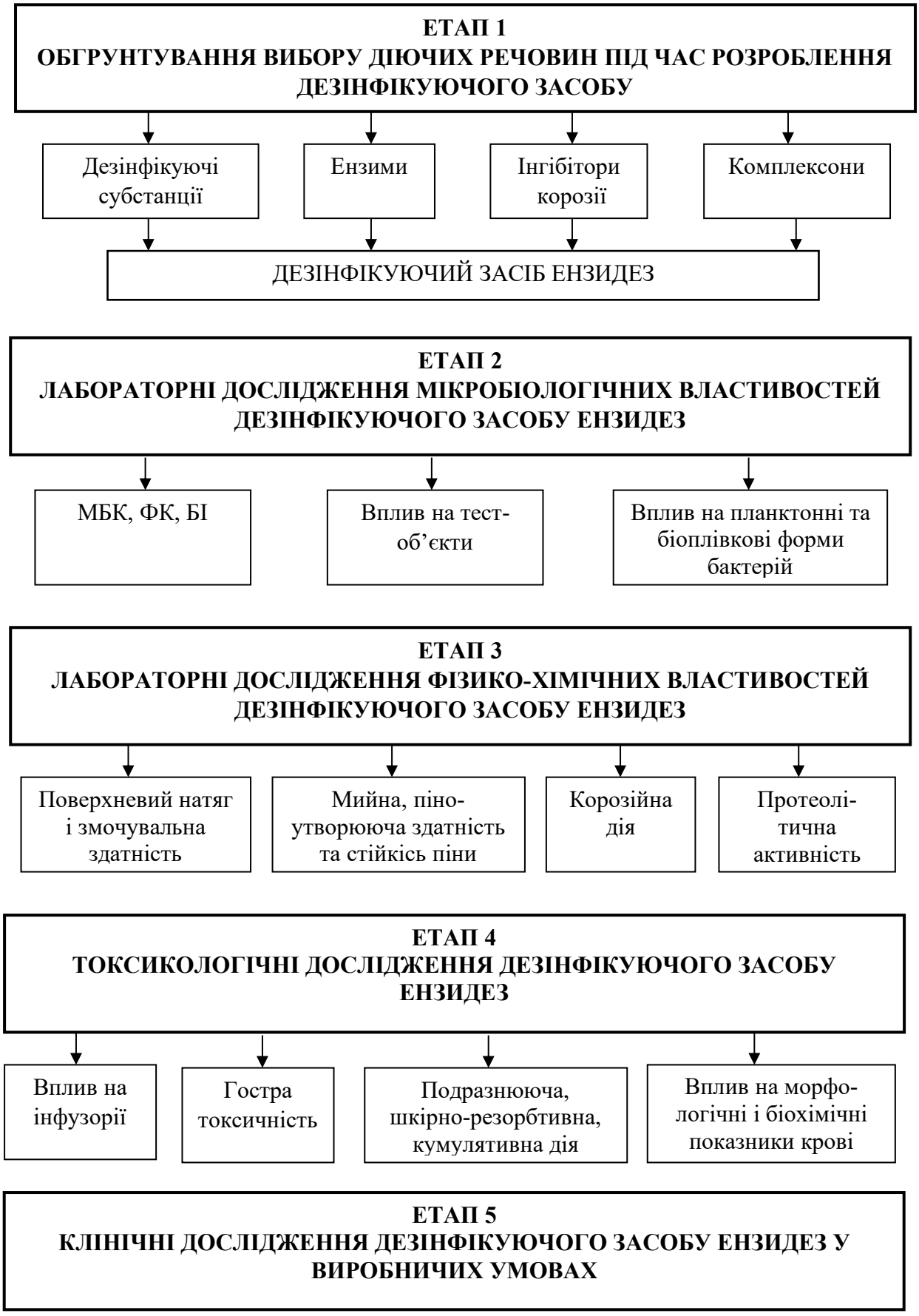

Рис. 2.1. Схема досліджень за темою дисертації

У результаті отриманих даних було створено дослідні варіанти дезінфікуючого засобу (9 композицій), які перевіряли на сумісність хімічних складових за фізико-хімічними показниками під час їх зберігання і на основі даних досліджень було вибрано оптимальний варіант, який дістав назву дезінфікуючий засіб «Ензидез». Також на даному етапі було розроблено технологію виготовлення дезінфікуючого засобу «Ензидез». Даний засіб був обраний для подальших ґрунтовних мікробіологічних, фізико-хімічних, токсикологічних та клінічних досліджень.

Мінімальну бактерицидну концентрацію дезінфікуючих субстанцій визначали стандартним загальновизнаним суспензійним методом (Kovalenko et al., 2019) [38], при цьому використовували музейні штами тест-культур *E. coli* (055К59 №3912/41), *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa (*27/99), *B. subtilis* (6633 ATCC) і дріжджів *Candida spp.* (ATCC 885-653). Пластинки з нержавіючої сталі марки AISI 321 розміром 30×30 мм для вирощування біоплівок.

Щільність мікробних біоплівок та вплив на них дезінфікуючих субстанцій та ензимів визначали згідно методичних рекомендацій (Кухтин М.Д. та ін., 2020) [46]. Коротко: вирощували біоплівки тест-культур бактерій на стерильних пластинах з нержавіючої сталі в чашках Петрі протягом 24 год в м’ясопептонному бульйоні з 1% концентрацією глюкози. Потім промивали тричі (трьохразово) пластинки з біоплівками стерильним фосфатним буфером для видалення планктонних клітин і висушували пластини. Вносили у чашки Петрі з пластинами дезінфікуючі субстанції або ензими та витримували протягом 15 хв. Витягували пластини, промивали фосфатним буфером і фіксували біоплівки 96º етиловим спиртом упродовж 10 хвилин. Потім фарбували біоплівки розчином кристалічного фіолетового 10 хвилин. Після цього знову тричі (трьохразово) промивали пластинки з біоплівками фосфатним буфером для видалення залишків фарби. Потім у чашку Петрі з пластинкою вносили 5,0 $см^3$ 96º етилового спирту і залишали на 20 – 30 хв, періодично струшуючи. Вимірювали оптичну густину спиртового розчину

спектрофотометрично за умови довжини хвилі 570 нМ. За оптичної густини промивного розчину до 0,5 од. щільність сформованих біоплівок вважали низькою, від 0,5 до 1,0 од. − середньою та при густині розчину більше 1,0 од. щільність сформованої біоплівки вважали високою (Kukhtyn et al., 2017) [149].

Для визначення кількості бактерій у біоплівці після дії біоцидів і ензимів відбирали змиви з пластинок за допомогою стерильного тампону. Потім готували десятикратні розведення змиву і висівали 1,0 $см^3$ кожного розведення у чашки Петрі, заливали м'ясопептонним агаром та інкубували за температури 37^0С упродовж 24 – 48 год. Перед використанням ензими розчиняли в 0,1 М фосфатному буфері, pH 8,2 – 8,4. За необхідності корегування величини pH розчинів Катаміну до 9,0 та 11,0 од, використовували луг (*NaOH*).

На другому етапі проведення експериментів проводили лабораторні мікробіологічні дослідження з визначення ефективності розчинів різної концентрації створеного дезінфікуючого засобу «Ензидез». Зокрема, визначали мінімальну бактерицидну концентрацію, фенольний коефіцієнт, білковий індекс, активність щодо бактерій нанесених на тест-об'єкти та впливу на мікробні біоплівки залежно від часу експозиції і температури розчинів.

Мінімальну бактерицидну концентрацію розчинів дезінфікуючого засобу «Ензидез» визначали загальновизнаним суспензійним методом згідно методичних рекомендацій (Коваленко та ін., 2019) [30]. Коротко: використовували по 3 стерильні пробірки (три повторюваності випробувань) кожного розведення дезінфікуючого засобу, розлитого в об'ємі по 4,5 $см^3$. У всі пробірки з розведеннями дезінфікуючого засобу вносили по 0,5 $см^3$ виготовленої відповідної суспензії тест-культур мікроорганізмів (0,5 $см^3$ суспензії містить $1,0x10^9$ мікробних клітин/$см^3$), ретельно перемішували та витримували їх у розчині дезінфектанту протягом 15 та 30 хв. Після закінчення встановленої експозиції припиняли дію дезінфектанту на тест-

культури шляхом застосуванням хімічного нейтралізатору наступного складу: твін-80 (3 %), сапонін (0,5 %), гістидин (0,1 %), цистеїн (0,1 %). Після чого відсівали 1 $см^3$ розчину у 10 $см^3$ м'ясопептоного бульйону та інкубували за температури 37 °С протягом 24 год. Оцінювали ріст мікроорганізмів у м'ясопептонному бульйоні (бульйон прозорий – ріст відсутній (бактерицидна дія); бульйон каламутний та з осадом – наявність росту тест-культури (відсутність бактерицидної дії).

Фенольний коефіцієнт та білковий індекс деззасобу «Ензидез» визначали загальновизнаним методом згідно методик описаних у методичних рекомендаціях (Якубчак та ін., 2005) [87].

Для визначення бактерицидної активності деззасобу щодо бактерій, нанесених на тест-об’єкти, використовували 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 ± 1°С протягом 60 хв. Під час проведення досліджень готували суспензію тест-культур за оптичним стандартом каламутності МакФарланда – stardand 2 з кількістю мікробних клітин $2{,}0\times10^9$ КУО/$см^3$ [30]. Потім на кожну тест пластинку наносили суспензію культури (*E. coli, S. aureus, B. subtilis* або *Candida spp.*) у кількості 5 $см^3$ та рівномірно розтирали за допомогою шпателя по всій поверхні. Висушували за кімнатної температури 21 ± 0,5 °С протягом 3 годин. Далі тест-пластинки ставили в кювети та дезінфікували їх дезінфікуючим засобом «Ензидез» за різних концентрацій та температури розчинів 20 ± 0,5 °С методом нанесення 5,0 $см^3$ 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 ± 0,5 °С. 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.*

Активність дезіфікуючого засобу «Ензидез» щодо впливу на мікробні біоплівки в умовах *in vitro* за різних параметрів застосування проводили згідно методик (Кухтин та ін., 2020) [46, 149].

На третьому етапі дослідження були спрямовано на визначення фізико-хімічних властивостей створеного дезінфікуючого засобу та його розчинів за різної концентрації. Зокрема, величину поверхневого натягу деззасобу «Ензидез» за різних концентрацій розчинів визначали за допомогою пристрою із сталагмометром Траубе. Суть методу полягає у підрахунку кількості крапель, утворених при витіканні зі сталагмометра однакового об'єму розчинів (Перкій та ін., 2012) [63]. Змочувальну здатність розчинів визначали за методом вимірювання краєвого кута змочування за допомогою сконструйованого пристрою, у якого основним вимірювальним приладом є катетометр (тип КМ-6) (Перкій та ін., 2012) [63]. Розчинність деззасобу «Ензидез», pH його розчинів, корозійну активність визначали за методичними рекомендаціями (Перкій та ін., 2012) [63], а мийні властивості та стійкість піни за методикою описаною (Salata et al., 2015; 2016) [70, 77].

Протеолітичну активність розчинів Ензидезу визначали за методикою (Valls et al., 2011) [214]. Для цього використовували три пробірки: у першу − вносили 5 $см^3$ 5%-го водного розчину молока і 20 $см^3$ води дистильованої; у другу – 5 $см^3$ води дистильованої і 20 $см^3$ водного розчину деззасобу «Ензидез» у концентрації 0,5 %, 0,75 % або 1,0 %; у третю – 5 $см^3$ 5%-го водного розчину молока і 20 $см^3$ водного розчину деззасобу «Ензидез» у концентрації 0,5 %, 0,75 % або 1,0 %. Перемішували, підігрівали до необхідних нам температур (20, 40, 60 та 70 °С) і витримували при цій температурі 15 та 30 хв. Потім вимірювали оптичну густину розчинів з трьох пробірок спектрофотометрично за довжини хвилі 600 нМ. Протеолітичну активність А, %, визначали за формулою (2.1):

$$A = \frac{Д_0 - (Д_2 - Д_1)}{Д_0} \times 100 \qquad (2.1),$$

де A – протеолітична активність деззасобу «Ензидез»;

$Д_0$ – оптична густина водного розчину молока; $Д_2$ – оптична густина суміші водних розчинів молока та деззасобу «Ензидез»; $Д_1$ – оптична густина водного розчину деззасобу «Ензидез».

На четвертому етапі було проведено токсикологічні дослідження нативного засобу «Ензидез» та його 1 % розчину. Зокрема, у досліді використовували білі лабораторні миші вагою 18-20 г, кролики та культуру інфузорії *Tetrachymena pyriformis* штам WH-14. Токсикологічні дослідження проведено за методами, які описані в монографії за редакцією Коцюмбаса І.Я. [13], а класифікували деззасіб за ступенем токсичності згідно стандарту [11].

Для визначення гострої токсичності (LD_{50}) деззасобу «Ензидез» було сформовано сім груп дослідних мишей по 10 тварин у кожній групі, яким внутрішньошлунково вводили деззасіб та спостерігали за тваринами протягом 14 діб і на основі загиблих і вижившх проводили обрахунок середньосмертельної дози для мишей [11, 13].

Визначення величин летальних доз Ензидезу проводили за методом Г. Кербера і формулою [11, 13]:

$$aM(LD_{50}) = Dm - \frac{\sum(z \times d)}{m} \qquad (2.2),$$

де *(aM)* – середнє арифметичне; *Dm* – доза, при якій реагували всі тварини; *z* – половина суми кількості тварин в дослідах з дослідженням двох наступних доз; *d* – різниця між кожними двома суміжними дозами, що стоять поряд; *m* – кількість тварин в кожній групі.

Для визначення подразнюючої дії деззасобу «Ензидез» та його 1 % розчину відбирали білих кроликів і на підготовлену (стрижену) шкіру кроликів наносили нативний засіб (три кролики), а іншим трьом наносили 1 % розчин дезінфектанту. Час спостереження за тваринами здійснювали

протягом 14 діб. У контролі наносили дистильовану воду [13]. Дослідження з визначення впливу деззасобу та його розчинів на слизові оболонки очей проводили на трьох кроликах, яким закапували розчини на слизову оболонку.

Дослідження шкірно-резорбтивної дії деззасобу проведено на білих мишах, хвости яких поміщали у пробірку з нативним та робочим розчином дезінфектанту, витримували протягом двох годин та оцінювали результат і спостерігали за тваринами до 14 діб [13]. Дослідження кумулятивних властивостей деззасобу «Ензидез» проводили на білих мишах відповідно до методики [36], а коефіцієнт кумуляції ($К_{кум}$) визначали за формулою (2.3).

$$К_{кум} = \frac{DL_{50\,(n)}}{DL_{50\,(1)}} \qquad (2.3),$$

де $DL_{50\,(n)}$ – середня летальна доза при багаторазовому введенні;

$DL_{50\,(1)}$ – середня летальна доза при одноразовому введенні.

Визначення морфологічних та біохімічних показників крові мишей за застосування 1 % розчину деззасобу «Ензидез» проводили на дослідній групі мишей (n=7), дослід тривав 12 діб. Після цього тварин декапітували, використовуючи легкий ефірний наркоз та відбирали кров для гематологічних і біохімічних досліджень. Одержані показники порівнювали з контрольними [13].

Токсичний вплив деззасобу на клітини паспортизованого штаму WH-14 інфузорії *Tetrachymena pyriformis* проводили згідно методики, описаної (Коваленко В. Л. та ін., 2014) [31, 82]. Тобто, готували розчини засобу «Ензидез» за температури 20 і 30 °С та вносили у них штам інфузорії, витримували протягом 15 та 30 хв, відбирали матеріал для мікроскопії і підрахування кількості вижившихклітин тетрахімен в камері Горяєва. Час 15 та 30 хв експозиції було обрано з огляду на те, що засіб «Ензидез» використовують для дезінфекції поверхонь об’єктів ветеринарного нагляду протягом 15 та 30 хв.

На п’ятому етапі було проведено клінічну апробацію застосування засобу «Ензидез» під час дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації у клініках ветеринарної медицини. Дослідження проведено у клініках ветеринарної медицини «VitaeVet», «ZooVetSkill», «VetLife» та «Пан Коцький».

Дезінфекцію поверхонь стін, підлоги та столів проводили методом протирання. Хірургічних, стоматологічних інструментів та виробів ветеринарного призначення шляхом занурення у розчин або протирання. До обробки та після її проведення відбирали змиви для мікробіологічного дослідження загальновизнаними методами [30, 63, 87]. У змивах визначали вміст МАФАнМ, титр БГКП [19, 30] та проводили родову ідентифікацію виділених мікроорганізмів за допомогою API-тестів та визначника Берджі [60]. Було досліджено 98 змивів за проведення дослідження активності деззасобу «Ензидез» у виробничих умовах.

Статистичні методи. Усі дослідження проводили в трьохразовій повторності, а отримані дані статистично обробляли з використанням комп’ютерної програми Statistica 10. Результати вважали вірогідними за $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3
РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Підбір дезінфікуючих субстанцій для створення дезінфікуючого засобу з мийним ефектом для застосування у клініках ветеринарної медицини та інших об'єктів ветеринарного нагляду

Першочергово при конструюванні будь-якого біоцидного засобу перевіряють бактерицидну активність дезінфікуючої субстанції шляхом визначення мінімальної бактерицидної концентрації та бактерицидного розведення на паспортизованих тест культурах мікроорганізмів. Отримані результати дослідження у цих дослідах служать відправною точкою у підборі робочої концентрації діючої речовини у засобі. Зазвичай, у наявних на ринку та описаних у літературі дезінфікуючих засобах, які використовують як діючу дезінфікуючу субстанцію Катамін АБ (алкілдиметилбензиламонію хлорид), його концентрація становить від 10 до 20 % [28, 89, 115]. Тому на першому етапі при конструюванні дезінфікуючого засобу з мийною дією для обробки хірургічних інструментів, обладнання та інших поверхонь у клініках ветеринарної медицини, ми орієнтувалися на можливість використання Катаміну АБ у складі засобу з бактерицидною дією у концентрації 15 %. Враховуючи те, що згідно технічних умов України на Катамін АБ його pH становить в середньому 7,0 од, водночас, у мийних засобах кращий мийний ефект проявляється за лужного середовища (pH 10 – 12 од.). Тому ми досліджували бактерицидну активність розчинів катаміну АБ залежно від його величини pH.

3.1.1 Дослідження бактерицидної дії Катаміну АБ залежно від значення pH розчинів

Метою даного підрозділу було – визначити мінімальну бактерицидну концентрацію четвертино амонієвої сполуки – катаміну за різного значення pH розчинів. У досліді використано три величини pH розчинів Катаміну 7,0,

9,0 та 11,0, які корегували лугом (*NaOH*). Усі дослідження проведено у триразовій повторності.

У табл. 3.1 наведено дослідження з визначення мінімальної бактерицидної концентрації 15 % розчину катаміну за різного значення *pH* щодо паспортизованого штаму *S. aureus* ATCC 25923.

Таблиця 3.1

Мінімальна бактерицидна концентрація 15 % розчину Катаміну АБ за різного значення pH щодо *S. aureus*, n=3

№ п/п	Розведення	Концентрація речовини, %	Ріст *S. aureus* за *pH* протягом експозиції, хв.					
			pH 7,0		*pH 9,0*		*pH 11,0*	
			10	20	10	30	10	30
1	1:50	2	–	–	–	–	–	–
2	1:70	1,428	–	–	–	–	–	–
3	1:98	1,020	–	–	–	–	–	–
4	1:137,2	0,728	–	–	–	–	–	–
5	1:192,8	0,520	–	–	–	–	–	–
6	1:268,8	0,371	–	–	–	–	–	–
7	1:376,5	0,265	–	–	–	–	–	–
8	1:527,1	0,187	–	–	–	–	–	–
9	1:737,9	0,134	–	–	–	–	–	–
10	1:1033,1	0,0968	–	–	–	–	–	–
11	1:1466,3	0,0691	–	–	–	–	–	–
12	1:2024,8	0,050	–	–	–	–	–	–
13	1:2834,7	0,035	+	–	+	–	–	–
14	1:3698,0	0,025	+	+	+	–	+	–
15	1:5566,0	0,017	+	+	+	+	+	+

Примітки:
1. «–» – відсутній ріст тест-культури (прояв бактерицидної дія);
2. «+» – наявний ріст тест-культури (відсутність бактерицидної дії).

З даних табл. 3.1 видно, що відмічається тенденція до посилення бактерицидного ефекту розчинів катаміну з підвищенням значення pH у лужну сторону. Зокрема, за величини pH 7,0 од. (нормативна величина згідно технологічного регламенту) мінімальна бактерицидна концентрація на *S. aureus* становила 0,050 % протягом 10 хвилинної експозиції та на одне розведення менше (0,035 %) із збільшенням часу експозиції до 20 хв.

При підвищенні pH розчинів до 9,0 од мінімальна бактерицидна концентрація протягом 10 хв експозиції не змінилася, порівнюючи з pH розчинів 7,0 од. Водночас, при експозиції 20 хв мінімальна бактерицидна концентрація зменшилася на одне розведення до 0,025 %, проти 0,035 % за pH 7,0 од.

Збільшення величини pH до 11,0 од посилювало бактерицидний ефект розчинів, порівнюючи з pH 9,0 та 7,0 од. Зокрема, мінімальна бактерицидна концентрація протягом 10 хв експозиції становила 0,035 %, що на одне розведення менше, ніж за pH 9,0 од і за 20 хв експозиції становила 0,025 %, що також на одне розведення менше порівнюючи з pH 7,0 од.

Отже, отримані результати досліджень щодо впливу pH середовища на бактерицидну активність розчинів катаміну відносно *S. aureus* виявили, що з підвищенням *pH* відбувається підсилення його бактерицидного ефекту, особливо це добре відмічається при порівнянні мінімальної бактерицидної дії катаміну за pH 7,0 та 11,0 од.

При оцінці впливу дезінфікуючих засобів на грамнегативну мікрофлору використовують як тест-культуру кишкову паличку. У табл. 3.2 наведено отримані результати досліджень щодо визначення мінімальної бактерицидної концентрації 15 % розчину катаміну за різного значення pH на паспортизований штам *Escherichia coli* 055K59.

Таблиця 3.2

Мінімальна бактерицидна концентрація 15 % розчину Катаміну АБ за різного значення pH щодо *E. coli,* n=3

№ п/п	Розведення	Концентрація речовини, %	Ріст *E. coli* за *pH* протягом експозиції, хв					
			pH 7,0		*pH 9,0*		*pH 11,0*	
			10	20	10	30	10	30
1	1:50	2	–	–	–	–	–	–
2	1:70	1,428	–	–	–	–	–	–
3	1:98	1,020	–	–	–	–	–	–
4	1:137,2	0,728	–	–	–	–	–	–
5	1:192,8	0,520	–	–	–	–	–	–
6	1:268,8	0,371	–	–	–	–	–	–
7	1:376,5	0,265	–	–	–	–	–	–
8	1:527,1	0,187	–	–	–	–	–	–
9	1:737,9	0,134	–	–	–	–	–	–
10	1:1033,1	0,0968	–	–	–	–	–	–
11	1:1466,3	0,0691	–	–	–	–	–	–
12	1:2024,8	0,050	+	–	–	–	–	–
13	1:2834,7	0,035	+	+	+	–	+	–
14	1:3698,0	0,025	+	+	+	+	+	–
15	1:5566,0	0,017	+	+	+	+	+	+

Примітки:
1. «–» – відсутній ріст тест-культури (прояв бактерицидної дія);
2. «+» – наявний ріст тест-культури (відсутність бактерицидної дії).

З даних табл. 3.2 видно, що відмічається аналогічна тенденція бактерицидної дії катаміну у різних pH середовищах відносно *E. coli,* як і за дії на *S. aureus*. Тобто, у лужному середовищі мінімальна бактерицидна концентрація катаміну нижча, порівняно з нейтральним. Проте, також виявлено, що *E. coli* є більш стійкіша, порівняно з *S. aureus* до розчинів

катаміну. Зокрема, у нейтральному середовищі мінімальна бактерицидна концентрація катаміну становила 0,0691 % протягом 10 хв експозиції і на одне розведення менша (0,050 %) за 20 хв експозиції. Водночас, за цих умов мінімальна бактерицидна концентрація щодо *S. aureus* становила 0,050 % і 0,035 %, відповідно.

Під час використання розчинів катаміну за pH 9,0 од відбулося зменшення мінімальної бактерицидної концентрації на одне розведення до 0,050 % протягом 10 хв експозиції та до 0,035 % протягом 20 хв дії, що на одне розведення менше, ніж за дії катаміну в нейтральному середовищі.

За величини pH розчинів катаміну 11,0 од мінімальна бактерицидна концентрація протягом 10 хв експозиції не змінилася порівняно з pH розчинів за 9,0 од (0,050 %). Проте виявили зменшення мінімальної бактерицидної концентрації протягом 20 хв експозиції до 0,025 %, що на одне розведення менше порівняно з розчинами за pH 9,0 та на два розведення менше, ніж за pH 7,0.

Отже, підсумовуючи результати досліду необхідно відзначити, що нині дезінфікуючі засоби на основі субстанції з класу четвертинних амонійних сполук, зокрема «Катамін АБ», досить розповсюджені у харчовій промисловості, ветеринарії та медицині. Їх використовують у поєднанні з іншими бактерицидними субстанціями, такими як полігексаметиленбігуанідином гідрохлорид (засоби «Геоцид», «Бланідас Оксідез»), глутаровим альдегідом («Кристал 900», «Кристал 1000»), пероксидом водню «Перісепт»), пропіловим та ізопропіловим спиртом (АНД 2000 експерс») [28, 115, 142]. Завдяки високій бактерицидній дії, добрій розчинності у воді та інших розчинниках «Катамін АБ» добре поєднується з іншими хімічними складовими, які використовуються у дезінфікуючих та мийних засобах (комплексони, інгібітори корозії, луги, піногасники, тощо) [43]. Отримані нами дослідження вказують на те, що введення «Катаміну АБ» у склад лужної мийної основи для надання засобу бактерицидного ефекту не буде знижувати протимікробну активність з підвищенням pH

розчинів до 11,0 од. Водночас, навпаки виявлено посилення бактерицидної дії катаміну в лужному середовищі за pH 11,0, порівняно з дією в нейтральному середовищі за pH 7,0 од.

Таким чином, отримані нами результати дають підставу вважати на перспективність використання «Катаміну АБ» у дезінфікуючих засобах з високим pH без можливого зниження бактерицидного ефекту.

Результати дослідження опубліковано в статті: Kozhyn, V. A., Horiuk, V. V., Kukhtyn, M. D., & Boltyk, N. P. (2021). Дослідження бактерицидної дії Катаміну АБ залежно від значення pH розчинів. *Podilian Bulletin: Agriculture, Engineering, Economics*, (34), 166-174 [17].

3.1.2 Дослідження активності дезінфікуючих біоцидів та ензимів протеаз і амілаз на бактерії у біоплівках

Фармацевтична галузь постійно працює над створенням ідеальних дезінфікуючих засобів, які б володіли широким спектром антимікробної дії у мінімальних концентраціях, не спричиняли формування стійкості у бактерій, були не токсичними, не корозійними, не алергенними, дешевими, тощо [94, 117]. Для цього використовуються та поєднаються між собою дезінфікуючі субстанції із різних груп, дія яких направлена на пригнічення активності різних ферментних систем бактеріальної клітини та руйнування її структурних елементів. Проте, незважаючи на достатньо велику кількість дезінфікуючих засобів на ринку, ідеального препарату не існує, так як мікроорганізми доволі швидко адаптуються до нових антибактеріальних субстанцій.

Стійкість у бактерій до біоцидів може бути пов’язана із перебуванням їх у біоплівці. Сьогодні більшістю вчених визнано, що значна кількість мікроорганізмів у природних і штучно створених середовищах існує у вигляді структурованих, прикріплених до поверхні угрупувань – біоплівок [149, 202, 211, 149]. Бактерії у біоплівці оточені власним продукуючим матриксом, який складається з полісахаридів, протеїнів, уранової кислоти та

гумінової речовини [103, 127, 136]. Саме завдяки матриксу багато протимікробних засобів не проникають у біоплівку, який діє як бар'єр, що захищає бактеріальні клітини всередині [109, 188, 211].

Перебування бактерій у біоплівці створює серйозні проблеми з інфікуванням різних поверхонь у медицині, ветеринарії та харчовій промисловості [104, 174]. Бактерії у біоплівках набагато складніше знищити антимікробними препаратами, що потенційно може призвести до накопичення і поширення небезпечних збудників. При цьому повідомляється, що концентрація біоциду, необхідна для знищення мікробних клітин у біоплівці, повинна в декілька разів перевищувати робочу для даного засобу [59, 110, 111]. Тому постійно проводяться дослідження щодо поліпшення роботи існуючих дезінфікуючих засобів або розробки нових для впливу на мікроорганізми у біоплівковому стані.

Отже, враховуючи роль матриксу у захисті мікробних клітин від дії біоцидів, дослідники шукають різні методи щодо його руйнування. Одним із таких методів є застосування ензимів для руйнування позаклітинного матриксу біоплівки. Однак, для ефективного застосування на практиці ферментних препаратів необхідно всебічно розуміти процес росту і розвитку біоплівки на конкретному об'єкті із знанням орієнтовного складу можливої мікрофлори. Крім того, доцільним є поєднання різних класів ферментів із біоцидними субстанціями для кращого контакту останніх із бактеріальними клітинами. Таким чином, застосування ферментів у комбінації з антибактеріальними речовинами для деградації біоплівки і зниження вмісту мікроорганізмів є перспективним і має важливе значення у багатьох галузях народного господарства. Метою досліджень даного підрозділу було дослідити вплив дезінфікуючих субстанцій Вантоцилу TG і Катаміну АБ та їх поєднання з ензимами на бактерії у біоплівках.

На першому етапі дослідження нами було визначено мінімальну бактерицидну концентрацію Вантоцил TG та Катаміну АБ у суспензійному

методі на планктонних формах бактерій упродовж 15 хв експозиції за температури розчинів 20 ± 1 °С. Отримані дані наведено в табл. 3.3.

Таблиця 3.3

Мінімальна бактерицидна концентрація вантоцилу TG та катаміну АБ на тест-культурах *S. aureus*, *E. coli, P. aeruginosa* за експозиції 15 хв та температури розчинів 20±1 °С, n = 15

Тест-культури	Концентрація розчинів, %	
	Вантоцилу TG	Катаміну АБ
S. aureus	0,009*◊	0,062*
E. coli	0,002◊	0,125
P. aeruginosa	0,002◊	0,250

Примітки:
* – $p < 0,05$ – порівняно з *E. coli* і *P. aeruginosa;*
◊ – $p < 0,05$ – порівняно з Катаміном АБ

Встановлено (табл. 3.3), що Вантоцил TG проявляв кращу антимікробну дію на грамнегативні бактерії (*E. coli* і *P. aeruginosa*), порівнюючи з грампозитивними бактеріями (*S. aureus).* Зокрема, мінімальна бактерицидна концентрація вантоцилу відносно *S. aureus* була в 4,5 раза ($p < 0,05$) більша, порівнюючи з тест-культурами *E. coli* і *P. aeruginosa.*

У той же час, Катамін АБ проявляв кращу дію на грампозитивну мікрофлору, ніж на грамнегативну. Мінімальна бактерицидна концентрація катаміну відносно тест-культур *S. aureus,* була в 2,0 раза ($p < 0,05$) менша, порівнюючи з культурами *E. coli* та в 4,0 раза ($p < 0,05$), порівняно з *P. aeruginosa.*

Також виявлено, що Вантоцил TG діє бактерицидно у значно менших концентраціях, порівнюючи з Катаміном. Зокрема, мінімальна бактерицидна концентрація вантоцилу щодо тест культур *S. aureus* виявилася в 6,9 раза ($p < 0,05$) менша, ніж катаміну. Для інгібування клітин *E. coli* і *P. aeruginosa* мінімальна бактерицидна концентрація вантоцилу була в 62 та 125 разів ($p < 0,05$) відповідно, менша, ніж концентрація катаміну.

Вважається, що планктонний стан бактерій призначений для колонізації інших поверхонь чи субстратів, а мікроорганізми, в основному, перебувають у біоплівковому стані у синтезованому матриксі, який виконує захисну функцію. Власне перебування бактерій у пептидногліколітичному матриксі біоплівки та у западинах шорсткості поверхні перешкоджає проникненню дезінфікуючих засобів до клітин. Тому для ефективної антимікробної дії біоцидів необхідно зруйнувати бактеріальну біоплівку і максимально забезпечити контакт мікробної клітини із дезсасобом. Враховуючи дане явище, наступним етапом нашої роботи було дослідити вплив дезінфікуючих субстанцій Вантоцилу TG і Катаміну АБ у поєднанні з ензимами на бактерії у біоплівках. Вантоцил TG і Катамін АБ використовували у концентраціях, які забезпечували бактерицидну дію на планктонні бактерії (табл. 3.3). Ензими використовували у концентрації, яка забезпечувала максимальну протеолітичну і амілолітичну активність за температури + 20 ± 1 °С протягом 15 хв експозиції.

Результати досліджень впливу вантоцилу TG та ензимів на біоплівки, сформовані *S. aureus* наведено на рис. 3.1.

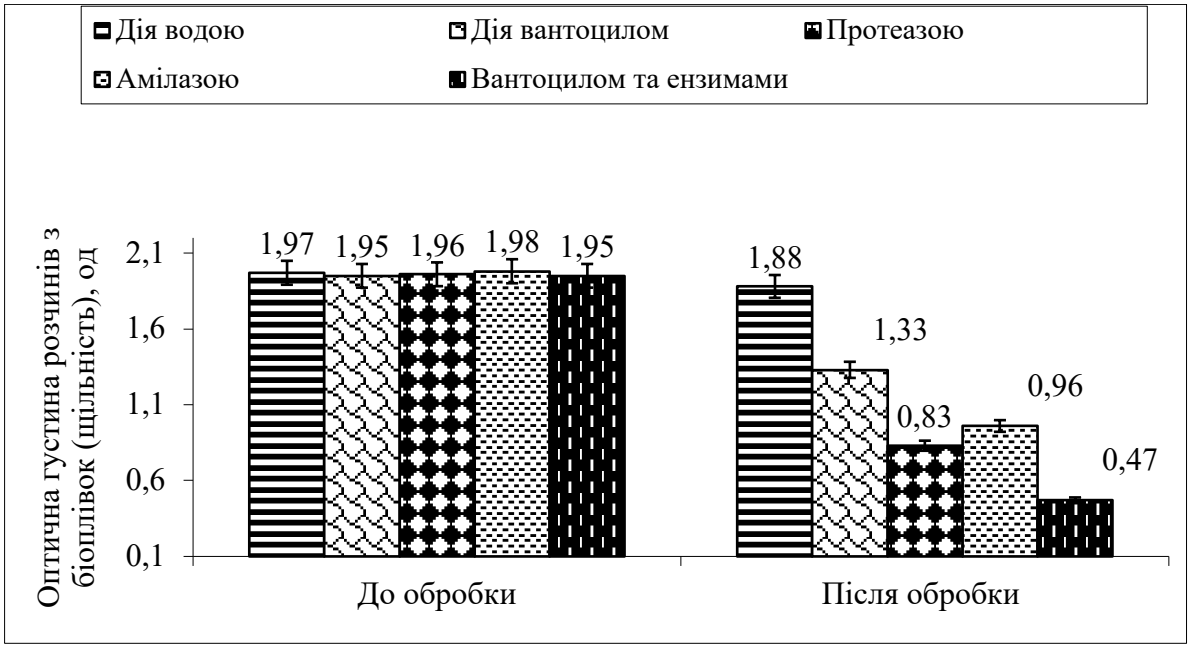

Рис. 3.1. Вплив вантоцилу TG та ензимів на біоплівки, сформовані *S. aureus* (дія протягом 15 хв за температури розчинів 20 ± 1 °С)

Встановлено (рис. 3.1), що за дії вантоцилу матрикс біоплівки *S. aureus* руйнується, про що вказує зменшення в 1,5 раза ($p < 0,05$) оптичної густини промивних розчинів з біоплівки, порівнюючи до обробки. Проте біоплівка ще була високої щільності – більше 1,0 од. Обробка біоплівки протеолітичним ензимом *Everlase 16 L* більш інтенсивно руйнувала матрикс порівняно з вантоцилом, так як щільність зменшилася в 2,4 раза ($p < 0,05$), тобто до середньої щільності. Це вказує на наявність у складі матриксу біоплівки значної кількості пептидних компонентів. Дія на біоплівки амілазою *Termamyl 300 L* також суттєво руйнувала матрикс, його щільність зменшувалася в 2,1 раза ($p < 0,05$) до середньої щільності. Проте найінтенсивніше проходила деградація біоплівки за впливу вантоцилу у поєднанні з ензимами *Everlase 16 L* та *Termamyl 300 L*, оптична густина промивних розчинів зменшувалася в 4,1 раза ($p < 0,05$) і біоплівка вважалася низької щільності (менше 0,5 од).

Дослідження впливу вантоцилу TG та ензимів на біоплівки, сформовані *E. coli* наведено на рис. 3.2.

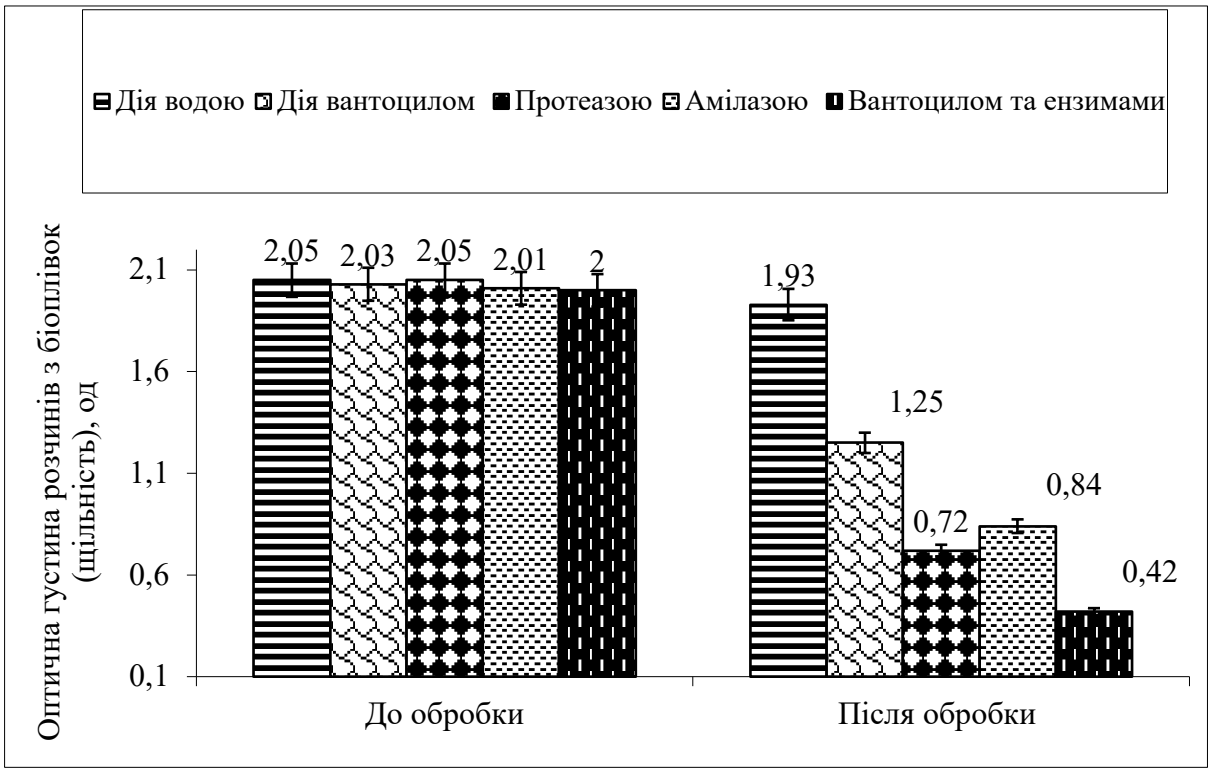

Рис. 3.2. Вплив вантоцилу TG **та ензимів на біоплівки, сформовані *E. coli* (дія протягом 15 хв за температури розчинів 20 ± 1 °С)**

Виявлено (рис. 3.2) інтенсивніший процес деградації біоплівки *E. coli* за впливу вантоцилу та ензимів, ніж біоплівки *S. aureus.* Зокрема, за дії вантоцилу оптична густина біоплівки зменшилася в 1,6 раза ($p < 0,05$), а за впливу ензимів *Everlase 16 L* і *Termamyl 300 L* в 2,8 та 2,4 раза ($p < 0,05$), відповідно. При цьому після дії ензимів біоплівки ставали середньої щільності. Проте, найбільша деградація матриксу біоплівки *E. coli* спостерігалася за одночасного впливу вантоцилу і ензимів, оптична густина розчинів з біоплівки зменшувалася в 4,8 раза ($p < 0,05$) і біоплівки ставали низької щільності.

Вплив вантоцилу TG та ензимів на біоплівки, сформовані *P. Aeruginosa,* (рис. 3.3) виявили аналогічну закономірність як за впливу на біоплівки *S. aureus* і *E. coli.* Проте, матрикс біоплівки *P. aeruginosa* у більшій мірі піддавався руйнуванню, ніж *S. aureus* і *E. coli.* Зокрема, під впливом вантоцилу оптична густина розчинів з біоплівки зменшувалася в 1,7 раза ($p < 0,05$), а за дії протеолітичних і амілолітичних ензимів в 3,0 та 2,8 раза ($p < 0,05$), відповідно. Однак, біоплівки *P. aeruginosa* ставали низької щільності лише за одночасної обробки їх вантоцилом і ензимами – 0,34 ± 0,2 од.

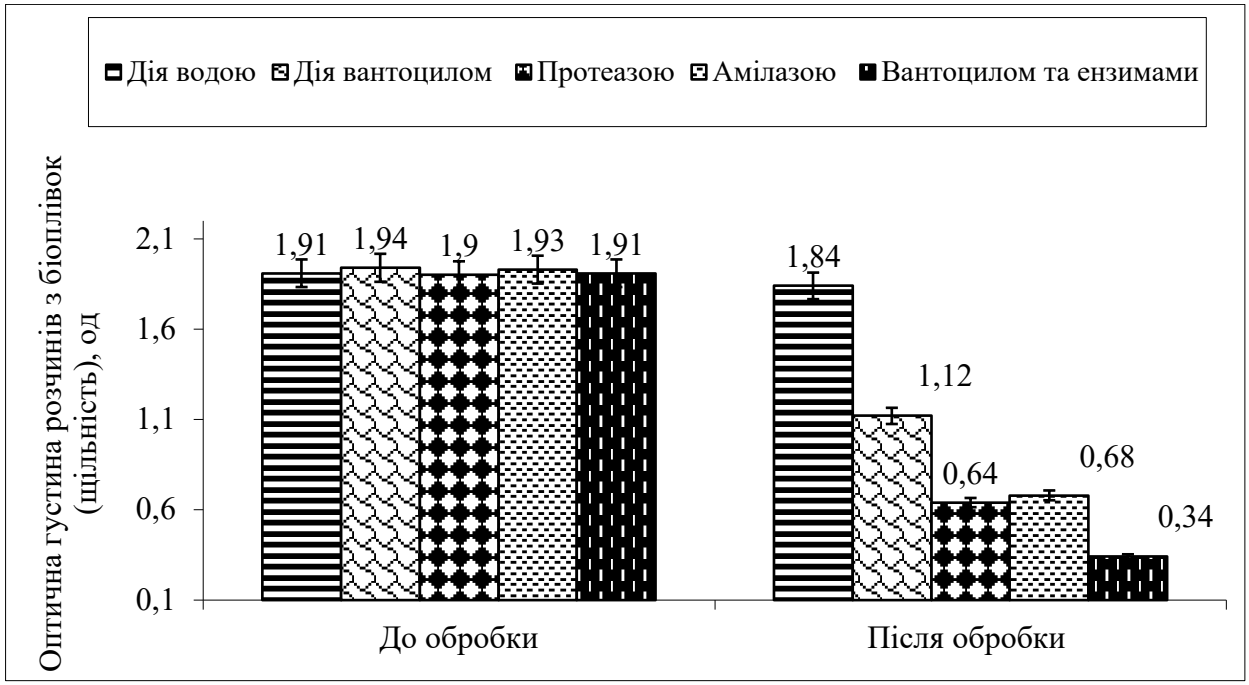

Рис. 3.3. Вплив вантоцилу TG та ензимів на біоплівки, сформовані *P. aeruginosa* (дія протягом 15 хв за температури розчинів 20 ± 1 °C)

Отже, отримані експериментальні дані вказують, що дезінфікуюча субстанція Вантоцил TG слабо руйнує матрикс біоплівок, сформованих бактеріями *S. aureus, E. coli і P. aeruginosa.* Водночас, одночасне застосування вантоцилу із протеолітичним і гліколітичним ензимами призводить до значної деградації біоплівки у досліджених бактерій.

Крім деззасобів на основі полігексаметиленбігуаніду гідрохлориду, досить поширені в Україні і за кордоном засоби з вмістом четвертинних амонієвих сполук, зокрема Катаміном АБ. Тому наступною частиною роботи було визначити вплив катаміну та його дію з ензимами на мікробні біоплівки. Результати дослідження наведено на рис. 3.4 – 3.6.

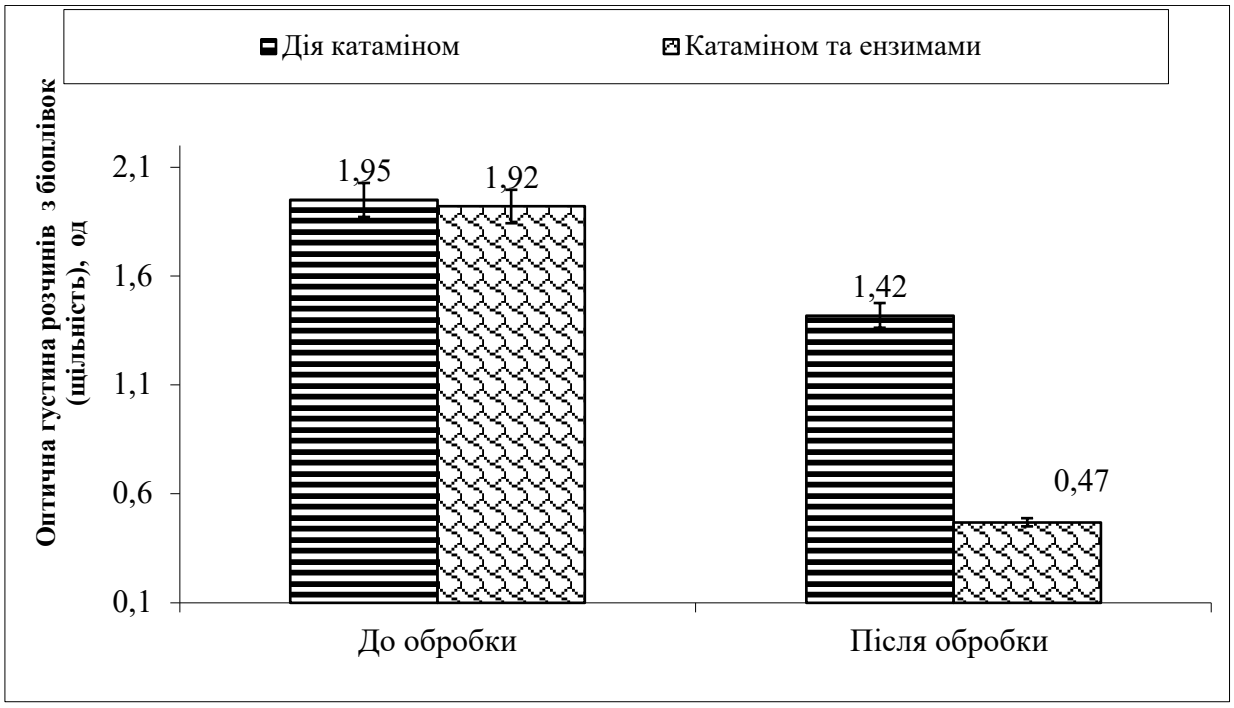

Рис. 3.4. Вплив Катаміну та його поєднання ензимами на біоплівки, сформовані *S. aureus* (дія протягом 15 хв за температури розчинів 20±1 °С)

Встановлено, що катамін у мінімальній бактерицидній концентрації для планктонних культур у меншій мірі руйнував біоплівки *S. aureus, E. coli і P. aeruginosa,* порівнюючи з вантоцилом. При цьому виявлено, що біоплівки *S. aureus* інтенсивніше піддавалися деградації за впливу катаміну, ніж біоплівки *E. coli і P. aeruginosa.* Зокрема, оптична густина розчинів з

біоплівок *S. aureus* після обробки катаміном зменшувалася в 1,4 раза ($p < 0,05$), а у біоплівок *E. coli і P. aeruginosa* в 1,3 та 1,2 раза, відповідно (рис. 3.5 та 3.6). Крім того, біоплівки усіх взятих у дослід бактерій після обробки катаміном залишалися високої щільності.

Поєднання дії катаміну з ензимами *Everlase 16 L* і *Termamyl 300 L* значно підвищило деградацію біоплівки, як у грампозитивних, так у грамнегативних бактерій. Зокрема, за такого впливу на біоплівки *S. aureus,* оптична густина промивних розчинів зменшилася в 4,1 раза ($p < 0,05$) і біоплівки ставали низької щільності (0,47 ± 0,2 од). Біоплівки грамнегативних бактеріїй *E. coli і P. aeruginosa* навіть за впливу катаміну з ензимами менше деградували, ніж біоплівки *S. aureus*. Зменшення оптичної густини розчинів з біоплівок у даних бактерій становило 3,7 та 3,4 рази ($p < 0.05$). При цьому біоплівки за щільністю були на межі між низькою і середньою щільністю – 0,54 – 0,57 од, відповідно.

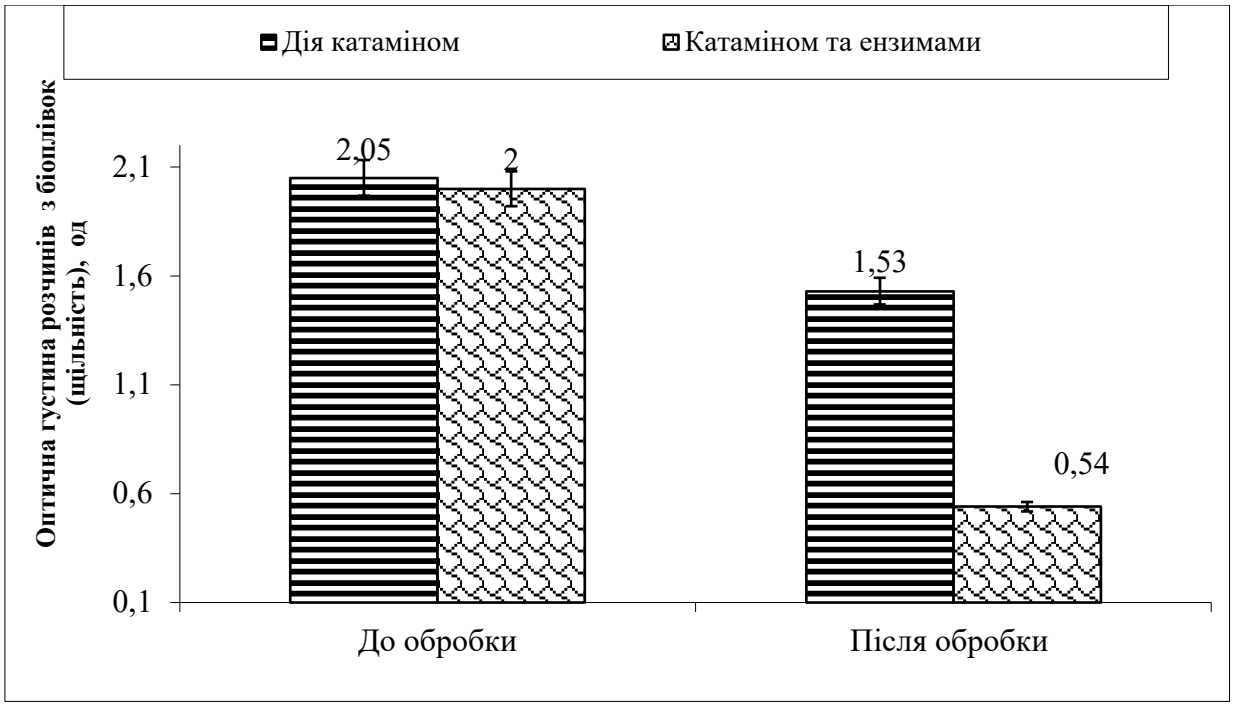

Рис. 3.5. Вплив Катаміну та його поєднання ензимами на біоплівки, сформовані *E. coli* (дія протягом 15 хв за температури розчинів 20 ± 1 °С)

Загалом з отриманих даних видно, що катамін слабше впливає на матрикс біоплівки *S. aureus, E. coli і P. aeruginosa,* порівнюючи з вантоцилом.

Проте, під час поєднання дезінфікуючих субстанцій Вантоцилу TG, Катаміну АБ з протеолітичними і гліколітичними ензимами проявляється синергізм у інтенсивнішій деградації біоплівок грампозитивних і грамнегативних бактерій, їхня щільність знижується з високої до низької.

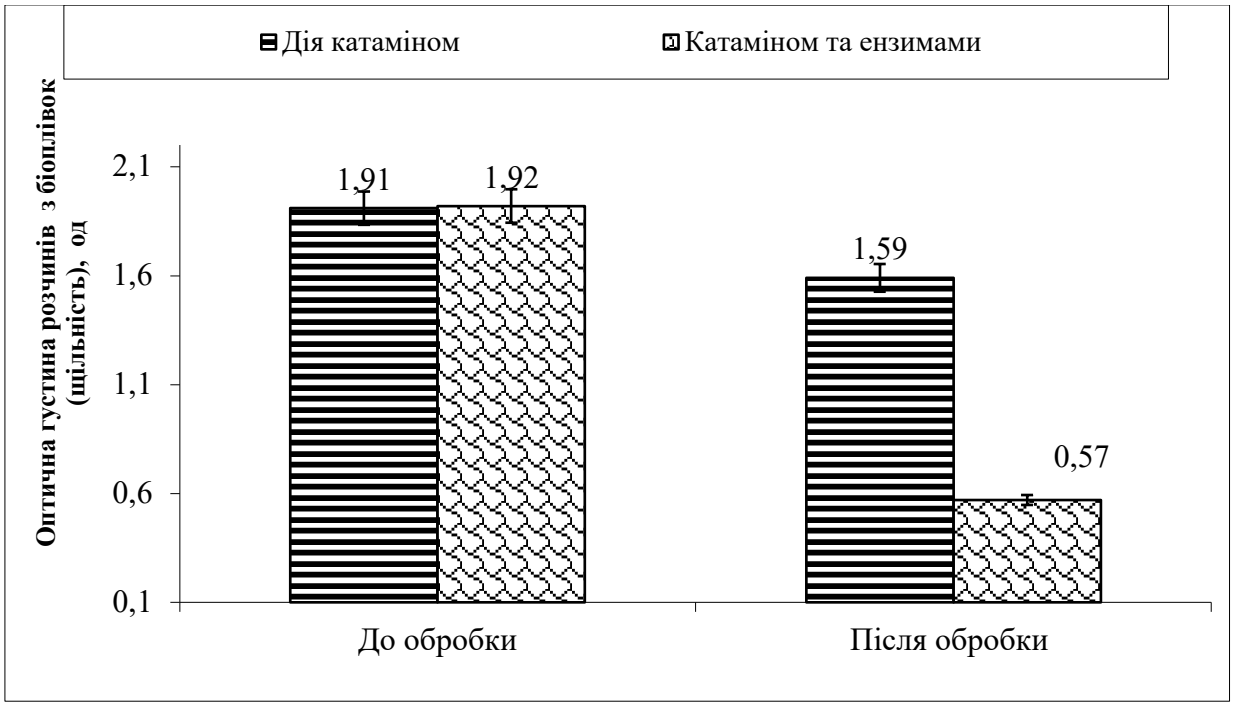

Рис. 3.6. Вплив Катаміну та його поєднання ензимами на біоплівки, сформовані *P. aeruginosa* (дія протягом 15 хв за температури розчинів 20 ± 1 °С)

Вважається, що концентрація антибактеріальної речовини, яка необхідна для знищення бактерій у біоплівці повинна в декілька разів перевищувати мінімальну бактерицидну, визначену на планктонних бактеріях. Важливо було дослідити вплив дезінфікуючих субстанцій у мінімальній бактерицидній концентрації, встановленої на планктонних бактеріях, та у поєднанні з ензимами на кількісний вміст мікроорганізмів у біоплівці. Результати досліджень наведено в табл. 3.4.

Виявлено (табл. 3.4), що бактерії у біоплівках витримували мінімальну бактерицидну концентрацію вантоцилу і катаміну, яка була встановлена на планктонних їх формах. З одного $см^3$ змиву з біоплівки після впливу вантоцилу виділяли від $1,9\times10^3$ до $4,3\times10^3$ мікробних клітин, що практично

на п’ять порядків менше, порівнюючи з контролем. Водночас, після дії вантоцилу разом з ензимами спостерігали зменшення кількості клітин *S. aureus, E. coli* і *P. aeruginosa,* в середньому на два порядки до $5{,}1\times10^1$ КУО/мл, порівнюючи з обробкою тільки вантоцилом.

Таблиця 3.4

Вплив дезінфікуючих субстанцій та ензимів на кількісний вміст мікробних клітин у біоплівці (дія протягом 15 хв за температури розчинів 20 ± 1 °С)

Дослід-жувані бактерії	Стан бактерій	Кількість бактерій у 1 см^3 зависі з біоплівки, КУО				
		контроль	вантоцил	ванто-цил з ензимами	ката-мін	катамін з ензи-мами
S. aureus	планктон	$1{,}1\pm0{,}1\times10^7$	0	0	0	0
	біоплівка	$5{,}2\pm0{,}2\times10^8$	$4{,}3\times10^{3*}$	$5{,}1\times10^{1*}$	$5{,}6\times10^{3*}$	$4{,}4\times10^{1*}$
E. coli	планктон	$3{,}4\pm0{,}2\times10^7$	0	0	0	0
	біоплівка	$4{,}9\pm0{,}1\times10^8$	$2{,}5\times10^{3*}$	$1{,}7\times10^{1*}$	$8{,}2\times10^3$	$7{,}8\times10^{1*}$
P. aeruginosa	планктон	$2{,}8\pm0{,}1\times10^7$	0	0	0	0
	біоплівка	$6{,}1\pm0{,}2\times10^8$	$1{,}9\times10^{3*}$	$1{,}6\times10^{1*}$	$1{,}7\times10^4$	$1{,}1\times10^{2*}$

Примітка: * − $p < 0{,}05$ – щодо контролю

Після обробки біоплівок катаміном виділяли дещо більшу кількість бактерій, ніж після обробки вантоцилом, зокрема, вміст клітин *S. aureus* був в 1,3 раза більший ($p < 0{,}05$), *E. coli* – в 3,3 раза ($p < 0{,}05$), а *P. aeruginosa* – практично на один порядок ($1{,}7\times10^4$ КУО/см^3 змиву). Одночасна дія катаміну з ензимами спричиняла зменшення кількості бактерій у біоплівці також на два порядки, порівнюючи з дією тільки катаміном. Проте з біоплівок *S. aureus* і *E. coli* виділяли 10^1 мікробних клітин, а з біоплівок *P. aeruginosa* – 10^2, що вказує на менше руйнування матриксу біоплівки дезінфікуючою субстанцією і ензимами та захист клітин від контакту з біоцидом.

Таким чином виявлено, що бактерії у біоплівках витримували мінімальну бактерицидну концентрацію вантоцилу і катаміну, яка була встановлена на планктонних їх формах. З одного см^3 змиву з біоплівки після впливу вантоцилу виділяли від 1,9×10^3 до 4,3×10^3 мікробних клітин, а після обробки катаміном – від 5,6×10^3 до 1,7×10^4. Водночас, після обробки біоплівок вантоцилом і катаміном разом з ензимами спостерігали зменшення кількості клітин *S. aureus, E. coli* і *P. aeruginosa* в середньому на два порядки – до 10^{1}КУО/мл, порівнюючи з обробкою тільки біоцидами. Тобто, спостерігається чітко виражений синергізм ензимів і біоцидів, що в кінцевому етапі більш згубно діє на бактерії у біоплівках.

Отже, вважаємо, що поєднання антибактеріальної речовини з ензимами є доброю перспективою у боротьбі з бактеріями у біоплівках на поверхнях різних матеріалів. При виборі дезінфікуючого засобу необхідно оцінити ефективність його до бактерій у біоплівках за умов, близьких до виробничих.

Результати дослідження опубліковано в статті: Kukhtyn, M., Kozhyn, V., Horiuk, V., Malimon, Z., Horiuk, Y., Yashchuk, T., & Kernychnyi, S. (2021). Activity of Disinfecting Biocides and Enzymes of Proteases and Amylases on Bacteria in Biofilms. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, *27*(4), 495-502 [91].

3.2. Розробка регламенту виробництва комплексного дезінфектанту "Ензидез"

Використовуючи теоретичні знання про хімічні складові дезінфікуючих субстанцій, їх сумісності між собою та проведення різноманітних експериментальних лабораторних досліджень щодо бактерицидної дії біоцидів, стабільності під час зберігання дослідних зразків препарату було створено новий дезінфікуючий засіб, який названо «Ензидез». У дезінфектанті поєднано дезінфікуючі субстанції різних класів (ЧАС, похідні бігуанідину), ензими (протеолітичні, гліколітичні), допоміжні речовини та вода. Дезінфікуючий засіб «Ензидез» у своєму складі містить наступні діючі

речовини: Катамін АБ – розчин з вмістом 49 − 51 % алкілдиметилбензиламмоній хлориду – 8,0 − 12,0 %; Вантоцил TG – 20 % водний розчин полігексаметиленбігуанідину гідрохлориду – 1,0 − 2,0 %; інгібітор корозії та комплексони – 4,5 %; протеолітичний ензим – *Everlase 16 L* та амілолітичний ензим – *Termamyl 300 L* у кількості 0,5 − 0,75 % та дистильована вода – 81,25−86,50 %.

Технологія процесу виготовлення деззасобу «Ензидез» передбачає застосування таких етапів (рис. 3.7).

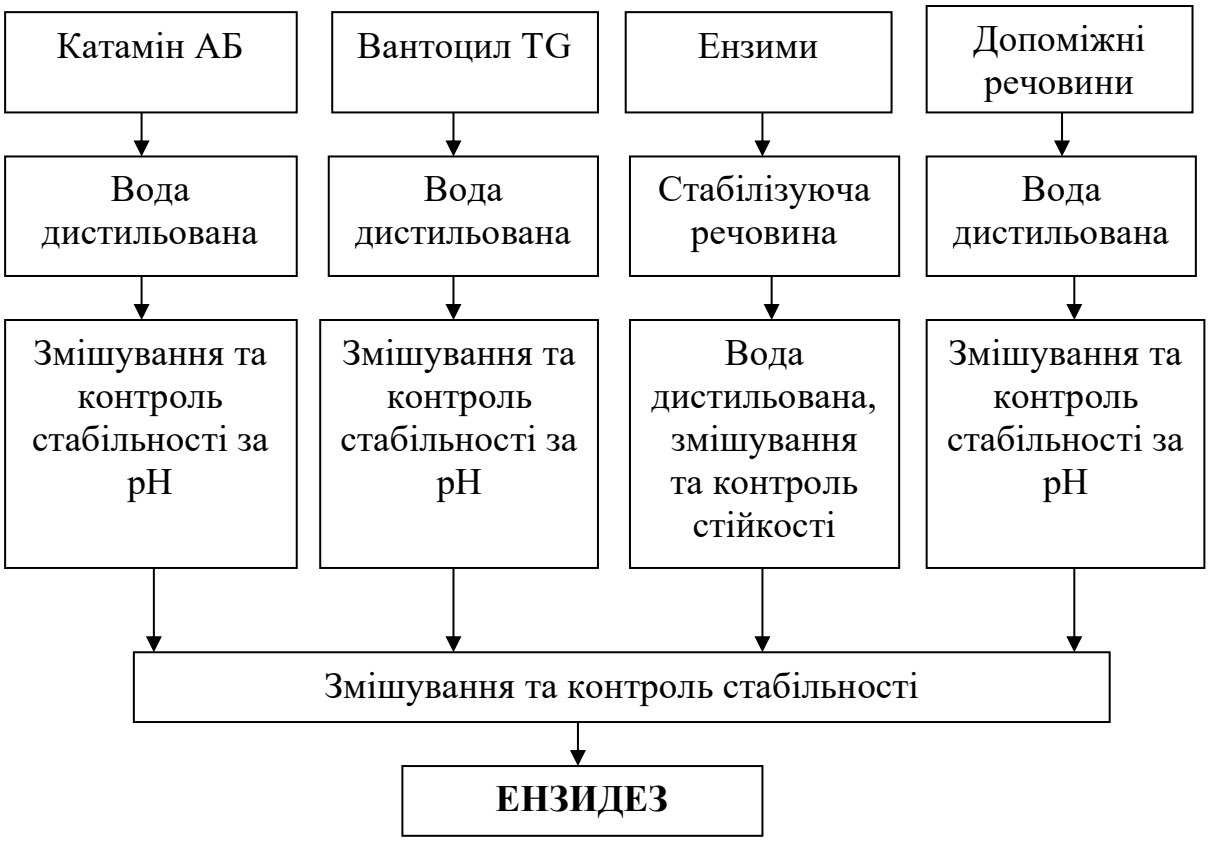

Рис. 3.7. Схема технології виготовлення дезінфікуючого засобу «Ензидез»

Відповідно до схеми технології виробництва дезінфектанту «Ензидез» вона передбачає наступне:

1. Приймання і підготовка сировини – контроль сертифікатів якості та вмісту діючої речовини.

2. Формування композиції засобу:

− змішування дезінфікуючих субстанцій із дистильованою водою та контроль їх за величиною pH;

− змішування ензимів з стабілізуючими субстанціями та дистильованою водою, контроль стійкості;

− підготовка допоміжних речовин;

− поєднання усіх підготовлених компонентів між собою.

3. Контролювання величини pH та стійкості розчинів.

4. Контроль якості деззасобу – оцінка дезінфектанта «Ензидез» за фізико-хімічними та мікробіологічними показниками.

5. Фасування – розлив у тару певного об'єму. Тара може бути пластикова чи скляна.

6. Наклеювання етикеток та вкладання листа-інструкції.

Для визначення органолептичних показників робочі концентрації розчинів деззасобу «Ензидез» готували на водопровідній воді за кімнатної температури у скляних стаканах об'ємом 1 $дм^3$. Встановлено, що концентрований засіб – це рідина прозорого кольору з слабким характерним запахом ЧАС та біганідину добре розчиняється у воді за різних температур. Робочі розчини від 0,1 до 2,0 % концентрації – прозорі з ледь специфічним запахом, злегка піняться при збовтуванні, при дотику відчувається наявність мийних властивостей.

Дезінфікуючий засіб «Ензидез» за показниками органолептики та фізико-хімічними властивостями має відповідати параметрам наведеним в табл. 3.5.

Важливим завданням під час розробки нового дезінфікуючого засобу є визначення його мінімальної бактерицидної концентрації відносно музейних тест-культур мікроорганізмів. Адже саме визначена мінімальна бактерицидна концентрація деззасобу вважається першочерговим орієнтиром для проведення подальших досліджень із встановленням робочої концентрації ефективної у виробничих умовах.

Таблиця 3.5

Органолептичні та фізико-хімічні показники деззасобу «Ензидез» згідно листка-вкладки

Назва показника	Нормативні значення
Зовнішній вигляд	Прозора рідина, піниться при збовтуванні
Масова частка Катаміну АБ, %	8,0 − 12,0
Масова частка Вантоцилу TG, %	1,0 − 2,0
Масова частка ензимів, %	0,5 − 0,75
Водневий показник (pH)	8,0 – 8,4

Тому метою роботи даного підрозділу було визначити мінімальну бактерицидну концентрацію, фенольний коефіцієнт та білковий індекс нового дезінфікуючого засобу «Ензидез».

3.3. Дослідження бактерицидних властивостей дезінфікуючого засобу «Ензидез»

Після конструювання складу дезінфікуючого засобу було визначено його мінімальну бактерицидну концентрацію, Результати досліджень наведено в табл. 3.6.

З отриманих даних, наведених у табл. 3.6 видно, що з досліджених тест-культур мікроорганізмів, взятих у дослід, найбільш стійкий до розчинів дезінфікуючого засобу «Ензидез» виявився *S. aureus.* За 15 хв експозиції мінімальне бактерицидне розведення деззасобу відносно *S. aureus* становило 1:1466,3 (0,0691 % за препаратом). Збільшення часу експозиції з 15 до 30 хв сприяло підвищенню бактерицидної активності Ензидезу, внаслідок чого його мінімальне бактерицидне розведення знизилося відносно *S. aureus* до 1:2834,7 (0,0352 % за препаратом).

Таблиця 3.6

Бактерицидні властивості дезінфікуючого засобу «Ензидез» на тест-культури бактерій, n=9

№ п/п	Розведення	Концентрація речовини, %	Ріст тест-культур мікроорганізмів за експозиції, хв					
			S. aureus		*E. coli*		*P.aeruginosa*	
			15	30	15	30	15	30
1	1:50	2	–	–	–	–	–	–
2	1:70	1,428	–	–	–	–	–	–
3	1:98	1,020	–	–	–	–	–	–
4	1:137,2	0,728	–	–	–	–	–	–
5	1:192,8	0,520	–	–	–	–	–	–
6	1:268,8	0,371	–	–	–	–	–	–
7	1:376,5	0,265	–	–	–	–	–	–
8	1:527,1	0,187	–	–	–	–	–	–
9	1:737,9	0,134	–	–	–	–	–	–
10	1:1033,1	0,0968	–	–	–	–	–	–
11	1:1466,3	0,0691	–	–	–	–	–	–
12	1:2024,8	0,0493	+	–	–	–	–	–
13	1:2834,7	0,0352	+	–	–	–	–	–
14	1:3698,0	0,0251	+	+	+	–	–	–
15	1:5566,0	0,01799	+	+	+	+	–	–
16	1:7778,4	0,012856	+	+	+	+	+	–
17	1:10389,8	0,009182	+	+	+	+	+	+
18	1:21343,9	0,006559	+	+	+	+	+	+
Контроль: вода дистильована			+	+	+	+	+	+

Примітки:
1. «+» – наявний ріст тест-культур мікроорганізмів;
2. «–» – відсутній ріст тест-культур мікроорганізмів.

Тест-культура *E. coli* виявилася більш чутлива до деззасобу «Ензидез», порівняно з *S. aureus.* Зокрема мінімальне бактерицидне розведення, яке зупиняло ріст і розвиток *E. coli* за експозиції 15 хв становило 1:2834,7 (0,0352% за препаратом), а за дії протягом 30 хв на одне розведення нижче 1:3698,0 (0,0251 % за препаратом).

Синьогнійна паличка також була досить чутлива до деззасобу «Ензидез», так як, мінімальне бактерицидне розведення за експозиції 15 хв становило 1:5566,0 (0,01799 % за препаратом), що в 1,9 раза ($p < 0,05$) менше, порівняно з мінімальним бактерицидним розведенням відносно *E. coli.* Аналогічна закономірність щодо зниження мінімальної бактерицидної концентрації відмічалася і за експозиції протягом 30 хв.

Отже, з проведених досліджень видно, що грамнегативні мікроорганізми *E. coli* і *P. aeruginosa* виявилися більш чутливі до дії дезінфікуючого засобу «Ензидез», порівняно з грампозитивними – *S. aureus.* За експозиції протягом 15 хв мінімальне бактерицидне розведення відносно *S. aureus* було в середньому в 1,9 раза ($p < 0,05$) більше, порівняно з бактерицидним розведенням відносно *E. coli* та в 3,8 раза ($p < 0,05$) відносно *P. aeruginosa,* відповідно. За експозиції протягом 30 хв різниця між мінімальним бактерицидним розведенням відносно *S. aureus* та щодо *E. coli* і *P. aeruginosa* була менша в 1,3 та 2,7 раза ($p < 0,05$), відповідно. Тобто із збільшенням часу експозиції з 15 до 30 хв концентрація засобу для знищення грампозитивних і грамнегативних мікроорганізмів суттєво знижується.

Таким чином, дезінфікуючий засіб «Ензидез» є високоактивним відносно широкого спектру мікрофлори в досить низьких концентраціях.

У виробничих умовах дезінфікуючі засоби при нанесенні на різні поверхні контактують і вступають в реакцію із різними біологічними субстратами, внаслідок чого їхня бактерицидна активність може дещо знижуватися. Тому доцільно провести дослідження, які показують зниження бактерицидної активності деззасобу за наявності на дезінфікуючій поверхні білкових речовин. Це дасть змогу опосередковано отримати дані у

лабораторних умовах можливого зниження дезінфікуючої дії при нанесенні на поверхні у виробничих реаліях. Результати дослідження з визначення фенольного та білкового індексу дезінфікуючого засобу «Ензидез» щодо тест-культур мікроорганізмів наведено в табл. 3.7.

З даних досліджень, наведених в табл. 3.7 видно, що бактерицидна активність деззасобу «Ензидез» відносно штаму *S. aureus* №АТСС 25923 була, в середньому в 12,7 раза сильніша, порівняно з бактерицидною дією розчину фенолу. Бактерицидна активність Ензидезу відносно штамів *E. coli* і *P. aeruginosa* виявилася в 24,0 та 28,8 раза сильніша відповідно, порівняно з дією фенолу.

Наявність у середовищі білку (сироватки крові) призводить до деякого зниження бактерицидної активності розчинів Ензидезу. Зокрема, бактерицидна активність Ензидезу відносно *S. aureus* знижується, в середньому, в 1,4 раза за умови присутності у середовищі 10 % сироватки крові. Бактерицидна активність Ензидезу відносно *E. coli* і *P. aeruginosa* за наявності білка знижувалася в 1,35 та 1,45 раза, відповідно.

Таким чином, встановлено, що розроблений дезінфікуючий засіб «Ензидез» є високоактивним відносно тест-культур мікроорганізмів. Мінімальне бактерицидне розведення деззасобу за експозиції 15 хв відносно *S. aureus* становило 1:1466,3 (0,0691 % за препаратом), а за 30 хв – 1:2834,7 (0,0352 %). *E. coli* і *P. aeruginosa* виявилися більш чутливі до дії дезінфікуючого засобу «Ензидез», порівняно з *S. aureus.* Зокрема, мінімальне бактерицидне розведення деззасобу відносно *E. coli* за експозиції 15 хв становило 1:2834,7 (0,0352 % за препаратом), а відносно *P. aeruginosa* в 1,9 раза ($p < 0,05$) нижче, порівняно з розведенням відносно *E. coli.* Наявність у середовищі білка призводить до деякого зниження бактерицидної активності розчинів Ензидезу. Зокрема, бактерицидна активність Ензидезу відносно *S. aureus* знижується в середньому в 1,4 раза за умови присутності у середовищі 10 % сироватки крові. Бактерицидна активність Ензидезу відносно *E. coli* і *P. aeruginosa* за наявності білка знижувалася в 1,35 та 1,45 раза, відповідно.

Таблиця 3.7

Фенольний та білковий індекс дезінфікуючого засобу «Ензидез» щодо тест-культур *E. coli,* шт. 055К59 №3912/41, *S. aureus* шт. АТСС 25923 та *P. aeruginosa* шт. 27/99, n=9

Розчин деззасобу у спів-відношенні	Бактерицидне розведення Бактерицидна концентрація		Середній фенольний коефіцієнт	Білковий індекс
	експозиція 15 хв	експозиція 30 хв		
щодо *S. aureus* шт. АТСС 25923				
Фенол 1:50	1 : 137,2 0,72 %	1 : 192,8 0,52 %	–	–
Ензидез 1:50	1 : 1466,3 0,069%	1 : 2834,7 0,035 %	12,7	–
Ензидез + білок	1 : 1033,1 0,1 %	1 : 2024,8 0,05 %	–	1,4
щодо *E. coli,* шт. 055К59 №3912/41				
Фенол 1:50	1 : 98 1,01 %	1 : 192,8 0,52 %	–	–
Ензидез 1:50	1 : 2834,7 0,035 %	1 : 3698.0 0,025 %	24,0	–
Ензидез + білок	1 : 2024,8 0,051 %	1 : 2834,7 0,035 %	–	1,35
щодо *P.aeruginosa* шт. 27/99				
Фенол 1:50	1 : 192,8 1,52 %	1 : 268,8 0,37 %	–	–
Ензидез 1:50	1 : 5566,0 0,017 %	1 : 7778,4 0,012 %	28,8	–
Ензидез + білок	1 : 3698,0 0,025 %	1 : 5566,8 0,017 %	–	1,45

Отже, з отриманих даних випливає, що дезінфікуючий засіб «Ензидез» досить високоактивний навіть за наявності у середовищі білка. Це пояснюється наявністю у складі засобу протеолітичних ензимів, які розкладають білки і тим самим сприяють кращому контакту дезінфікуючої субстанції з мікробними клітинами.

Результати дослідження опубліковано в науковій статті: Kozhyn, V. A. (2021). Бактерицидні властивості дезінфікуючого засобу «Ензидез». *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування*, (8), 27-33 [36].

3.4. Вплив дезінфікуючого засобу «Ензидез» на тест-об'єкти, контаміновані мікроорганізмами

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 [87, 134]. У дослідженнях [69, 111] 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. Попередні лабораторні дослідження 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. Метою досліджень даного підрозділу було визначити бактерицидну активність розробленого дезінфікуючого засобу «Ензидез» за різних концентрацій щодо бактерій, нанесених на тест-об'єкти.

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 (табл. 3.6 та табл. 3.7). У табл. 3.8 наведено дослідження активності деззасобу «Ензидез» відносно шт. *S. aureus* нанесеного на тест-об’єкти (кахельна плитка і нержавіюча сталь).

З даних табл. 3.8 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 ± 0,04 мН/м, що є недостатнім для доброго змочування капілярної системи тест-об'єктів.

Таблиця 3.8

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

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. 3.9.

З даних табл. 3.9 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.

Таблиця 3.9

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

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. 3.10.

Таблиця 3.10

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

З даних наведених у табл. 3.10 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 дезінфіктанту бактерицидний ефект проявляється на поверхні і в товщі кахелю. Активність Ензидезу щодо грибкової мікрофлори наведена в табл. 3.11.

Таблиця 3.11

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

Результати досліджень (табл. 3.11) виявили, що грибкова (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.

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 грибкової мікрофлори за 0,1 % концентрації та часу дії не менше 15 хв. 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.

Загалом, поєднання ЧАС, ПГМБГХ та ензимів у створеному деззасобі забезпечувало в умовах *in vitro* 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.

Результати дослідження опубліковано в науковій статті: Кухтин, М., Кожин, В., Горюк, Ю., Горюк, В., & Гриневич, Н. (2022). Вплив дезінфікуючого засобу «Ензидез» на тест-об’єкти контаміновані мікроорганізмами. *Аграрний вісник Причорномор'я*, (102-103) [9].

3.5. Активність дезінфікуючого засобу «Ензидез» щодо бактерій у біоплівках

Враховуючи роль матриксу у захисті мікробних клітин від дії біоцидів, визначення активності нових деззасобів відносно деградації біоплівки є важливою передумовою оцінки їх ефективності перед впровадженням у практику.

Метою роботи даного підрозділу було дослідити активність дезіфікуючого засобу «Ензидез» щодо впливу на мікробні біоплівки в умовах *in vitro* за різних параметрів застосування.

Для обґрунтування і встановлення оптимальної концентрації дезінфікуючого засобу необхідно провести всебічні дослідження з визначення його активності за різних режимів в умовах *in vitro*. Тому після відбору оптимального складу засобу «Ензидез» було проведено дослідження

впливу дезінфектанту за різних концентрацій розчинів при температурі 20 ± 1 ˚С та часу експозиції 15 хв на мікробні біоплівки тест-культу музейних мікроорганізмів. Результати дослідження наведено в табл. 3.12.

Таблиця 3.12

Зміна щільності біоплівок тест-культур мікроорганізмів після обробки засобом «Ензидез» за різної концентрації за температури розчинів 20 ± 1 ˚С та експозиції 15 хв, M±m, n=5

Концентрація розчинів, %	Тест-культури мікроорганізмів		
	S. aureus	*E. coli*	*P. aeruginosa*
	Оптична густина промивних розчинів з біоплівок, од		
1,5	0,12±0,01*	0,11±0,01*	0,10±0,01*
1,25	0,13±0,01*	0,12±0,01*	0,11±0,01*
1,0	0,15±0,01*	0,14±0,01*	0,14±0,01*
0,75	0,19±0,01*	0,17±0,01*	0,17±0,01*
0,5	0,24±0,01*	0,21±0,01*	0,20±0,01*
0,25	0,32±0,02*	0,28±0,02*	0,27±0,01*
0,1	0,38±0,02*	0,34±0,02*	0,32±0,02*
0,075	0,73±0,03*	0,65±0,03*	0,62±0,03*
Контроль біоплівки до обробки	1,98±0,03	2,04±0,04	1,97±0,03
Контроль біоплівки після обробки водою	1,88±0,02	1,93±0,02	1,84±0,02
Контроль МПБ	0,10±0,01	0,10±0,01	0,10±0,01

Примітка: * − $p < 0,05$ – щодо контролю після обробки водою

З даних табл. 3.12 випливає, що дезінфікуючий засіб «Ензидез» руйнує біоплівки всіх взятих у дослід музейних тест-культур мікроорганізмів. При цьому його плівкоруйнуюча активність посилювалася з підвищенням

концентрації засобу. Зокрема, за впливу найнижчої взятої у дослід концентрації 0,075 % оптична густина промивних розчинів з біоплівок *S. aureus* зменшилася в 2,6 раза ($p < 0,05$), біоплівок *E. coli* і *P. aeruginosa* – в 2,9 раза ($p < 0,05$), відповідно, порівнюючи з біоплівками після обробки водою. За дії такої концентрації засобу «Ензидез» біоплівки хоч значно деградували, проте вони ще були середньої щільності, більше 0,5 од. Підвищення концентрації засобу з 0,075 % до 0,5 % сприяло інтенсивності деградації біоплівки тест-культур в середньому в 3,0 раза ($p < 0,05$) і вони ставали слабкої щільності (0,24 – 0,20 од). Практично підвищення концентрації засобу «Ензидез» до 1,0 % і більше, не суттєво руйнувало матрикс біоплівки у тест-культур мікроорганізмів, так як оптична густина промивних розчинів була, як у контролі за використання чистого м'ясопептонного бульйону.

Отже, проведені дослідження вказують на те, що розроблений дезінфікуючий засіб з вмістом протеолітичних і амілолітичних ензимів – «Ензидез», ефективний щодо руйнування біоплівок *S. aureus, E. coli* і *P. aeruginosa* за 0,5 % концентрації навіть за кімнатної температури робочих розчинів і часу експозиції 15 хв. Однак, для подальших досліджень з метою обґрунтування оптимальної температури та часу експозиції засобу «Ензидез», використовували його у 0,5 % концентрації.

Важливим фізичним параметром, від якого залежить ефективність дії дезінфікуючих засобів, є температура робочих розчинів. Необхідно, щоб засоби добре діяли в широкому температурному режимі робочих розчинів, при цьому використання засобу за підвищених температур їх розчинів буде здорожувати вартість санітарної обробки. Нами проведено дослідження з визначення впливу температури робочих розчинів засобу «Ензидез» на його плівкоруйнуючу активність, результати дослідження наведено на рис. 3.8 – 3.10.

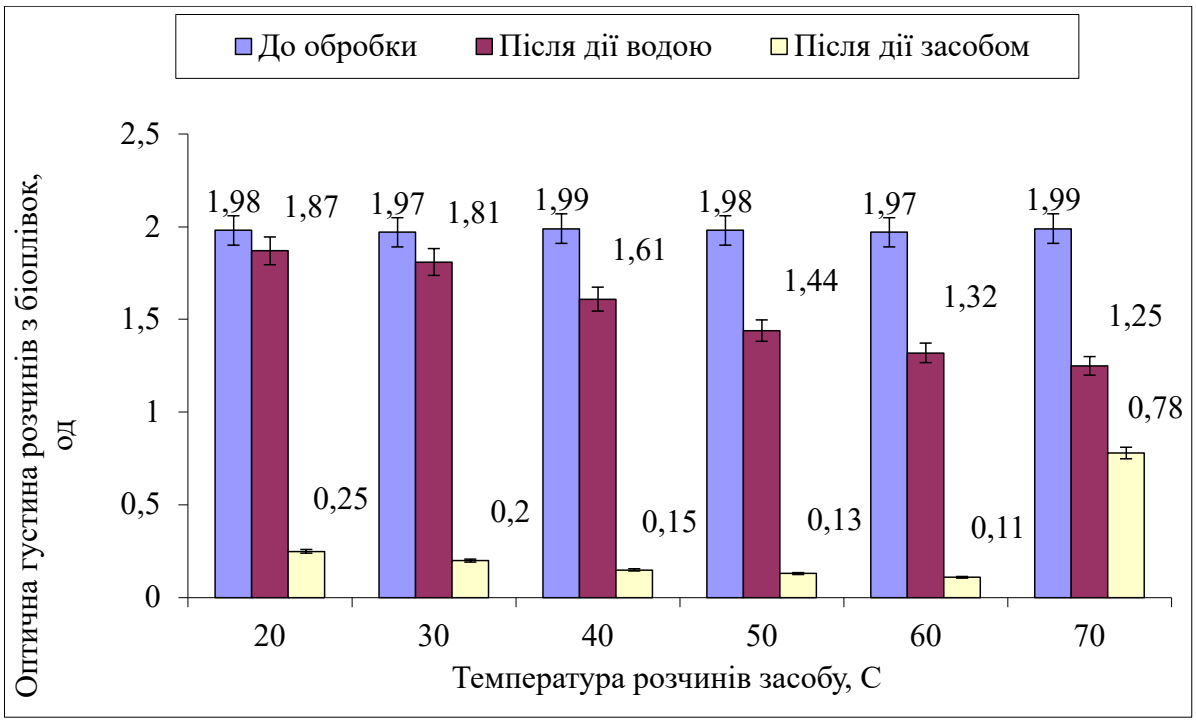

Рис. 3.8. Зміна щільності біоплівок золотистого стафілококу після обробки 0,5 % засобом «Ензидез» за різних температур розчинів та експозиції 15 хв, M±m, n=5

З даних рис. 3.8 видно, що використання робочих розчинів засобу за температури від 20 до 60 °С сприяло деградації біоплівок золотистого стафілококу.

При цьому достовірне зменшення щільності біоплівок після обробки водою спостерігали за температури води, починаючи з 50 ± 2 °С до 70 ± 2 °С. Так, після обробки біоплівок водою за температури 50 ± 2 °С їх щільність зменшилася в 1,4 раза ($p < 0,05$), а за впливу водою температури 70 ± 2 °С – в 1,6 раза ($p < 0,05$). Однак, у всіх випадках після обробки водою біоплівки залишалися високої щільності – більше 1,0 од.

Обробка біоплівок деззасобом «Ензидез» за температури 20 ± 1 °С сприяла їх інтенсивній деградації, внаслідок чого оптична густина промивних розчинів з біоплівок зменшилася в 7,9 раза ($p < 0,05$), порівнюючи з контролем до обробки та в 7,5 раза ($p < 0,05$), порівнюючи з густиною розчинів після обробки водою. Підвищення температури розчинів

деззасобу посилювало руйнуючий вплив на біоплівки, зокрема після впливу засобом за температури 40 ± 1 °С оптична густина промивних розчинів з біоплівок зменшилася в 13,2 раза ($p < 0,05$), за температури 50±2 °С – в 15,2 раза, а за 60±2 °С – в 17,9 раза ($p < 0,05$), порівнюючи з густиною розчинів з біоплівок до обробки. Посилення інтенсивності руйнуючого впливу деззасобу з підвищенням температури розчинів, на нашу думку, пов'язано із зростанням активності ензимів за температури розчинів від 40 °С до 60 °С, а також деяким впливом температури води. Щільність біоплівок золотистого стафілококу після використання Ензидезу за даних температур не перевищувала 0,5 од і вважалася низькою.

Після обробки біоплівок Ензидезом за температури 70 ± 2 °С спостерігали зниження його плівкоруйнуючої активності, порівнюючи з розчинами за температури 20 – 60 °С, незважаючи на найбільший вплив води на біоплівки за температури 70 °С. Це, очевидно, пов'язано з інгібуючим впливом температури розчину на активність ензимів, наявних у засобі [213]. При цьому після обробки таким розчином деззасобу біоплівки були середньої щільності (0,78 ± 0,03 од).

Зміна щільності біоплівок кишкової палички за дії 0,5 % концентрації засобу «Ензидез» за різних температур розчинів та експозиції 15 хв наведено на рис. 3.9.

З даних рис. 3.9 видно, що в загальному руйнування біоплівок кишкової палички після впливу деззасобу «Ензидез» за різних температур розчинів відбувалося аналогічно, як за дії на біоплівки золотистого стафілококу. Зокрема, інтенсивність деградації біоплівки найефективнішою була за температури розчинів деззасобу від 40 ± 1 °С до 60 ± 2 °С. За впливу Ензидезу за даних температур зменшення оптичної густини розчинів з біоплівок відбулося в 14,6 – 18,4 раза ($p < 0,05$), проти контролю до обробки. При цьому оптична густина розчинів з біоплівок становила від 0,14 до 0,1 од, що відносить їх до слабкої щільності. Найменша деградація біоплівок спостерігалася за дії деззасобу, температура розчину якого становила 70 ±

2°С. Руйнування біоплівок за цієї температури в більшій мірі відбувається під впливом температурної денатурації, ніж під впливом ензимів і дезінфікуючих компонентів. Після обробки біоплівки залишалися, зазвичай, середньої щільності – 0,63 ± 0,03 од.

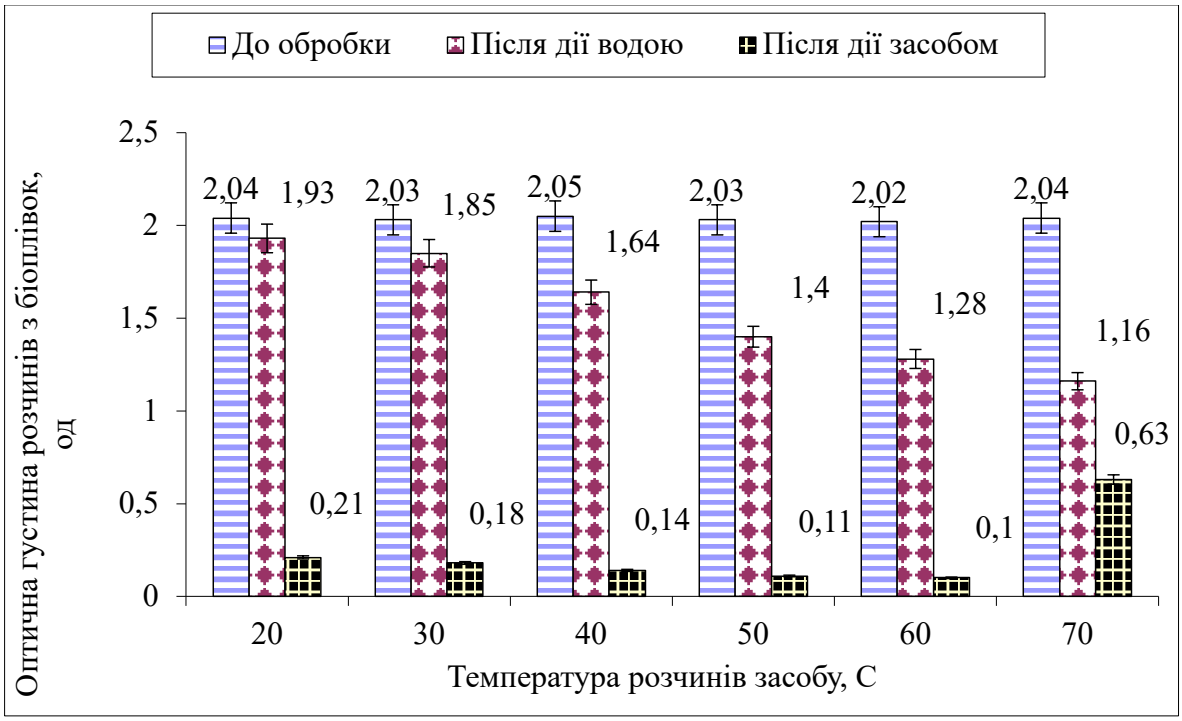

Рис. 3.9. Зміна щільності біоплівок кишкової палички після обробки 0,5 % засобом «Ензидез» за різних температур розчинів та експозиції 15 хв, M±m, n=5

Зміна щільності біоплівок синьогнійної палички за дії 0,5 % концентрації засобу «Ензидез» за різних температур розчинів та експозиції 15 хв наведено на рис. 3.10.

Результати досліджень рис. 3.10 виявили, що під впливом засобу «Ензидез» біоплівки синьогнійної палички добре деградували за всіх температур розчинів. При цьому за дії засобу в температурному режимі розчинів від 20 до 60 °С щільність усіх біоплівок не перевищувала 0,20 ± 0,02од. Винятком слугувала температура розчину засобу 70 ± 2 °С, за якої деградація біоплівки відбувалася слабо, так як оптична густина розчину з біоплівок становила 0,81 ± 0,03 од. За обробки засобом за даної температури

щільність біоплівок була всього в 1,4 раза менша, ніж за обробки водою даної температури. Це підтверджує наявність в більшій мірі дії температури, ніж самого засобу. Крім того, така слабка активність біоциду вказує на те, що використання засобу за високої температури робить його слабоактивним.

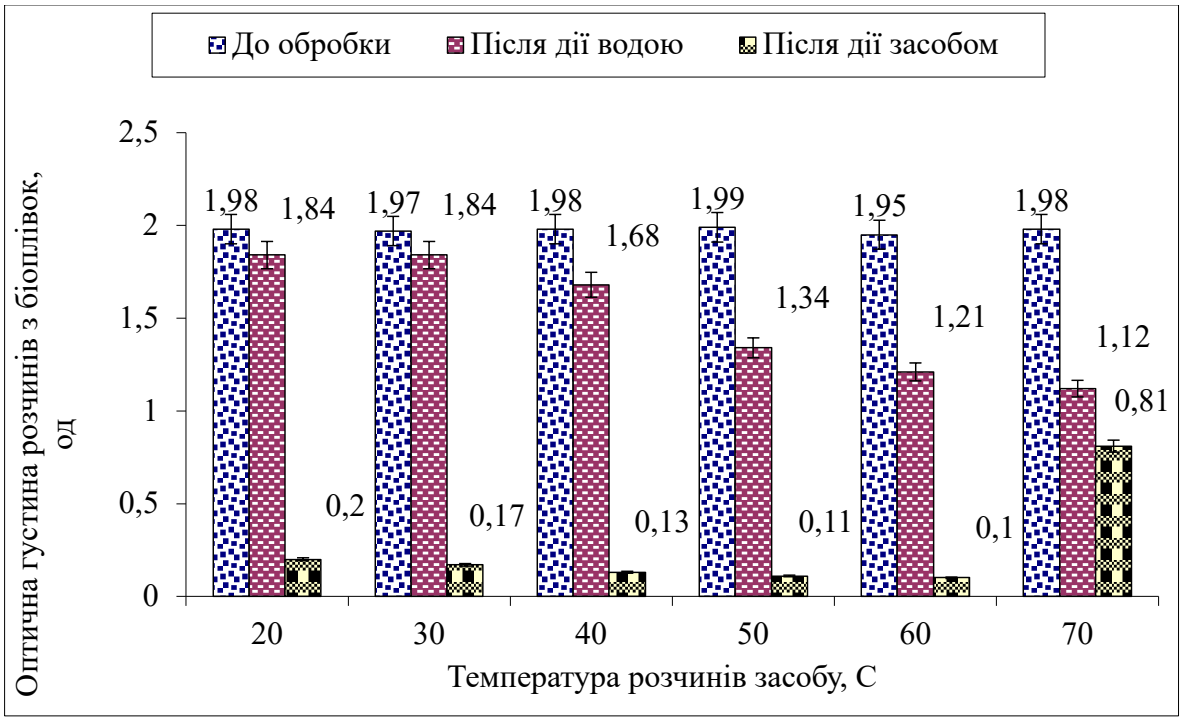

Рис. 3.10. Зміна щільності біоплівок синьогнійної палички після обробки 0,5 % засобом «Ензидез» за різних температур розчинів та експозиції 15 хв, M±m, n=5

Отже, підсумовуючи дані дослідження можна відзначити, що із підвищенням температури дезінфікуючого засобу «Ензидез» з + 20 до + 60 °С відбувається збільшення деградації біоплівок, сформованих золотистим стафілококом, кишковою і синьогнійною паличками. При цьому, з отриманих даних випливає, що деззасіб можна ефективно використовувати в 0,5 % концентрації за кімнатної температури розчинів. Дані результати було застосовано у подальших дослідженнях з обґрунтуванням оптимального часу експозиції.

Крім вибору найефективнішої концентрації і температури дезінфікуючого засобу, дослідження з визначення оптимального часу

експозиції являються одними із пріоритетними, так як правильно підібрана експозиція дезінфікуючого засобу є важливою складовою бактерицидної активності та в подальшому розробки ефективного режиму його застосування. Результати досліджень з визначення зміни щільності біоплівок золотистого стафілококу після обробки 0,5 % розчином засобу «Ензидез» за температури 20 ± 1 °С та різного часу експозиції наведено на рис. 3.11.

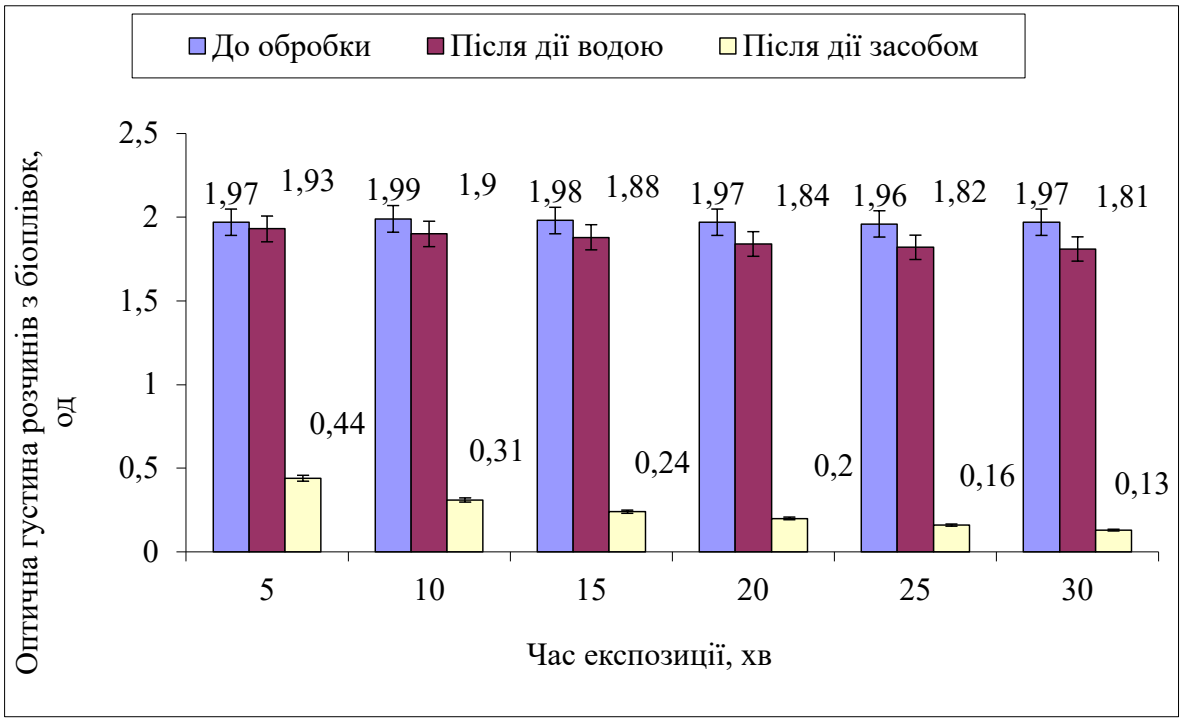

Рис. 3.11. Зміна щільності біоплівок золотистого стафілококу після обробки 0,5 % розчином засобу «Ензидез» за температури 20 ± 1 °С та різного часу експозиції, M±m, n=5

Дані рис. 3.11 вказують, на наявність прямо залежного ефекту щодо інтенсивності зниження щільності біоплівок золотистого стафілококу від тривалості часу експозиції дезінфікуючого засобу. Зокрема, після 5 хв дії деззасобу «Ензидез» оптична густина розчинів з біоплівок знизилася до 0,44 ± 0,03 од, а через 15 хв експозиції вона була в 1,8 раза ($p < 0,05$) менша (0,24 ± 0,02 од), ніж за п'ятихвилинної дії. Загалом, для видалення біоплівок золотистого стафілококу 0,5 % засобом «Ензидез» за температури розчинів +20 ± 1 °С необхідно, щоб час експозиції становив від 15 до 30 хв. Протягом

даного періоду дії деззасобу оптична густина розчинів з біоплівок зменшувалася до 0,24 – 0,13 од, що вважається як слабка щільність біоплівки.

Динаміка зміни щільності біоплівок кишкової палички після обробки 0,5 % розчином засобу «Ензидез» за температури 20 ± 1 °С та різного часу експозиції наведена на рис. 3.12.

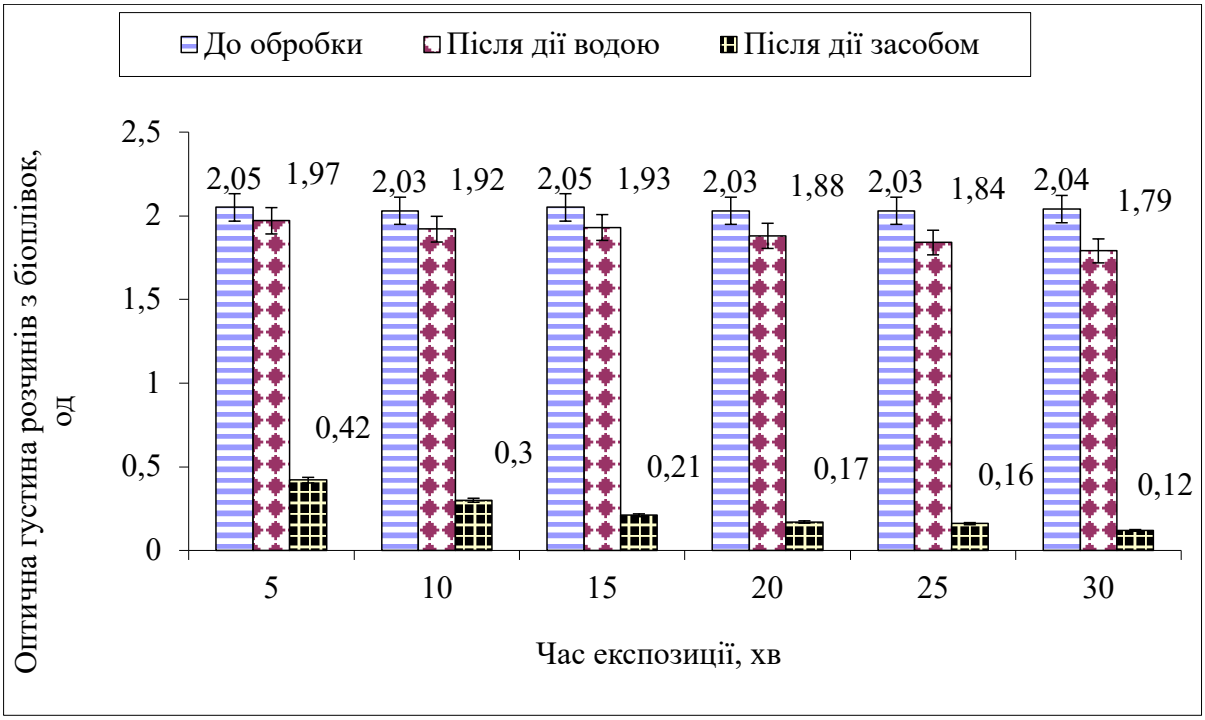

Рис. 3.12. Зміна щільності біоплівок кишкової палички після обробки 0,5 % розчином засобу «Ензидез» за температури 20 ± 1 °С та різного часу експозиції, M±m, n=5

З даних рис. 3.12 видно, що навіть за п’ятихвилинної дії деззасобом «Ензидез» спостерігається суттєва деградація біоплівок, так як оптична густина розчинів з біоплівок зменшилася в 4,7 раза ($p < 0,05$) до 0,42 ± 0,03 од, порівняно з обробкою водою протягом даного часу. Наступне подовження експозиції деззасобу до 15 хв сприяло зменшенню щільності біоплівок в 2,0 раза ($p < 0,05$) до 0,21 ± 0,02 од, проти 5 хв дії. За часу експозиції деззасобу від 15 до 30 хв відбулася практично повністю деградація біоплівок кишкової палички з поверхні пластин нержавіючої сталі.

Аналогічні зміни відбувалися щодо процесу деградації біоплівок, сформованих синьогнійною паличкою за впливу деззасобу «Ензидез» (рис. 3.13). Зокрема, протягом 15 – 30 хв експозиції 0,5 % розчину засобу «Ензидез» за температури + 20 ± 1 °С видаляється в повній мірі біоплівка, що вказує на недоцільність збільшення часу експозиції більше 30 хв.

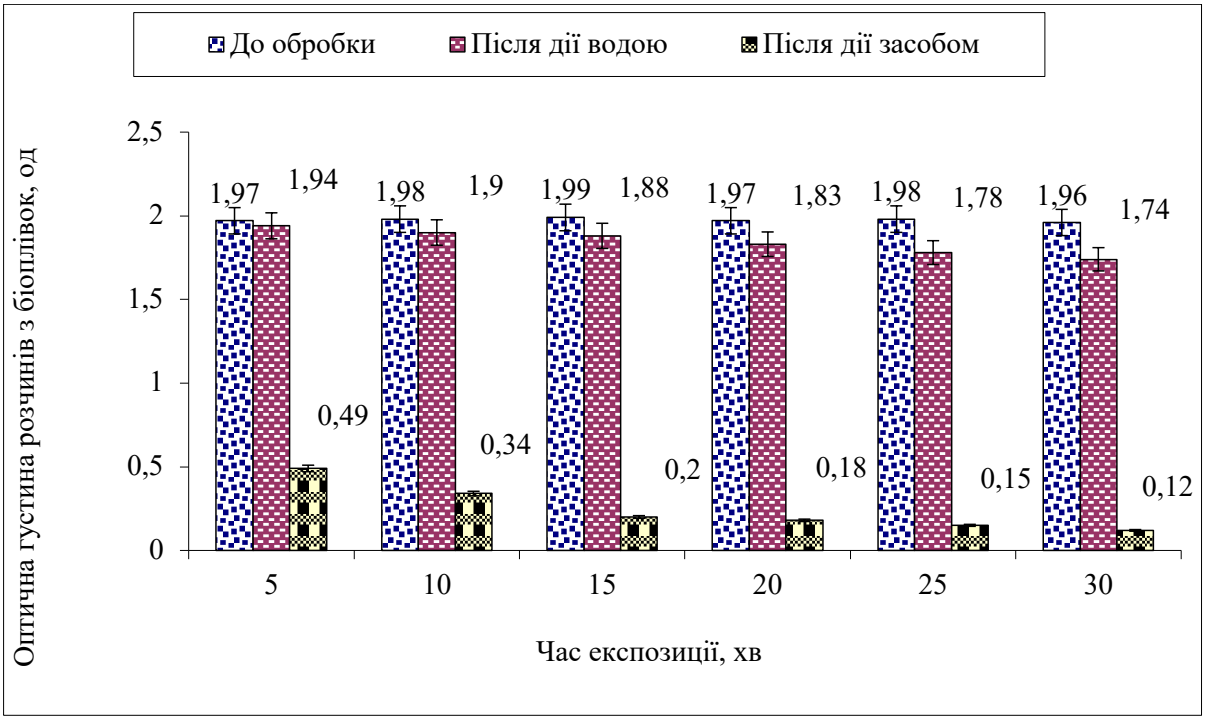

Рис. 3.13. Зміна щільності біоплівок синьогнійної палички після обробки 0,5 % розчином засобу «Ензидез» за температури 20 ± 1 °С та різного часу експозиції, M±m, n=5

Отже, дані дослідження вказують, що ефективний, оптимальний час дії дезінфікуючого засобу «Ензидез» на біоплівки, сформовані *S. aureus, E. coli* і *P. Aeruginosa,* становить 15 − 30 хв.

Результати дослідження опубліковано в науковій статті: Kozhyn, V., Kukhtyn, M., Horiuk, V., Vichko, O., & Kryzhanivsky, Y. (2021). The activity of the disinfectant «Enzidez» against bacteria in biofilms. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 23(101), 67–74 [205].

3.6. Оцінка дезінфікуючого засобу «Ензидез» за фізико-хімічними показниками

Попередні лабораторні дослідження [91, 205] показали, що створений деззасіб є високоактивним відносно бактерій у біоплівках та мікрофлори навіть за значного органічного забруднення. Тому проведення подальших лабораторних досліджень з визначення фізико-хімічних показників, які всебічно характеризують його дію є обов'язковим на етапі оцінки в умовах *in vitro.* Метою роботи даного підрозділу було визначити фізико-хімічні показники створеного дезінфікуючого засобу «Ензидез», активного на біоплівкові форми бактерій та за можливого органічного навантаження.

На першому етапі фізико-хімічних досліджень деззасобу «Ензидез» було визначено розчинність розчинів різної концентрації. Встановлено, що розчини засобу у концентрації від 0,25 до 5 % % добре розчинялися у воді за температури + 20 ± 1 °С протягом часу до 30 с, що вважається, як швидкорозчинні засоби [63]. Це вказує, що для приготування робочих розчинів дезінфектанту можна використовувати звичайну воду за кімнатної температури. pH розчинів засобу становила 8,0 – 8,2 од, що вважається оптимальним для активності протеолітичних і ліполітичних ензимів, наявних у складі деззасобу.

Для забезпечення доброго контакту засобу з поверхнею, що обробляється, необхідно, щоб поверхневий натяг розчину був нижчий рекомендованої межі у 60 мН/м [63]. Адже, чим нижча величина поверхневого натягу розчину, тим краще буде змочуватися поверхня, тим самим діючі речовини деззасобу глибше проникнуть у западини поверхні. Результати дослідження з визначення величини поверхневого натягу за різних концентрацій деззасобу «Ензидез» наведено на рис. 3.14.

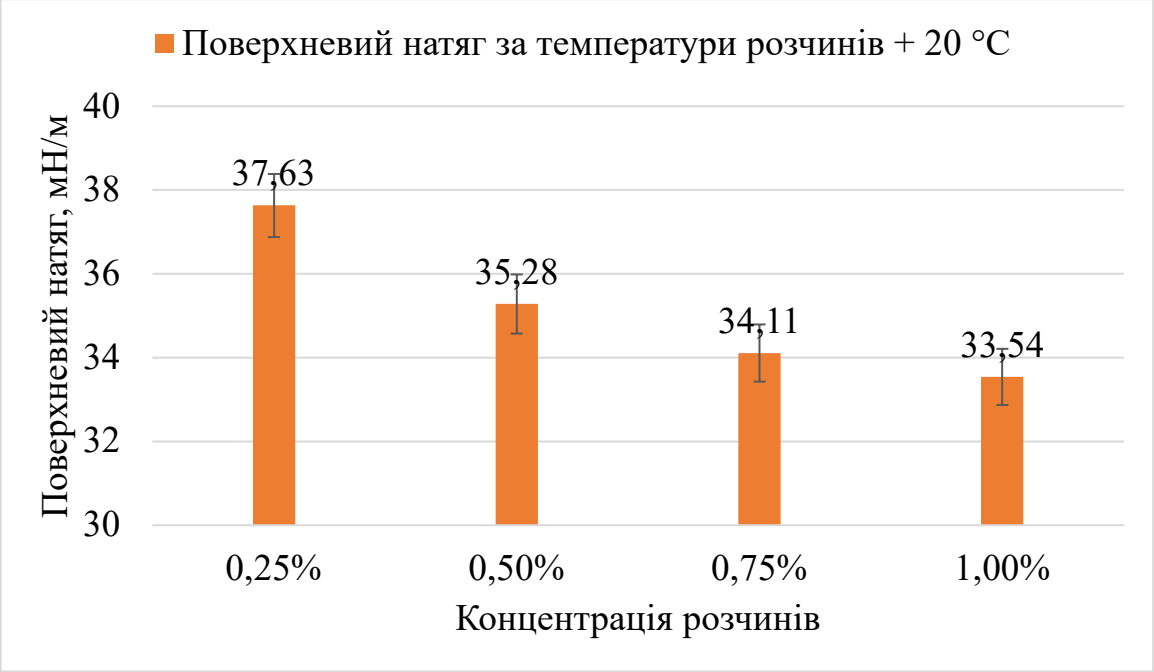

Рис. 3.14. Величина поверхневого натягу за різних концентрацій деззасобу «Ензидез», n=12

З даних рис. 3.14 видно, що по мірі зростання концентрації розчинів засобу «Ензидез» поверхневий натяг знижувався. При цьому різниця між 0,25% концентрацією розчину та 1,0 % становила 4,09 ± 0,52 мН/м, що вказує на його добру змочувальну здатність навіть за 0,25 % концентрації застосування, так як засоби з таким поверхневим натягом проявляють мийний ефект.

Показники змочувальної здатності розчинів засобу «Ензидез» наведено на рис. 3.15.

З даних рис. 3.15 видно, що краєвий кут змочування розчинів за концентрації від 0,25 до 1,0 % був нижче 90 град., що відповідає вимогам, які висуваються до дезінфікуючих засобів для санітарної обробки поверхонь [63]. При цьому навіть за температури + 20 ± 1 °С краєвий кут змочування був низьким, а з підвищенням концентрації зменшувався, зокрема за 0,25 % концентрації він становив 69,5 ± 0,7 град та зменшився на 9,7 ± 0,6 град. за 1,0% розчину. Отже, застосування засобу «Ензидез» навіть у 0,25 % концентрації розчину буде забезпечувати добру змочуваність поверхні.

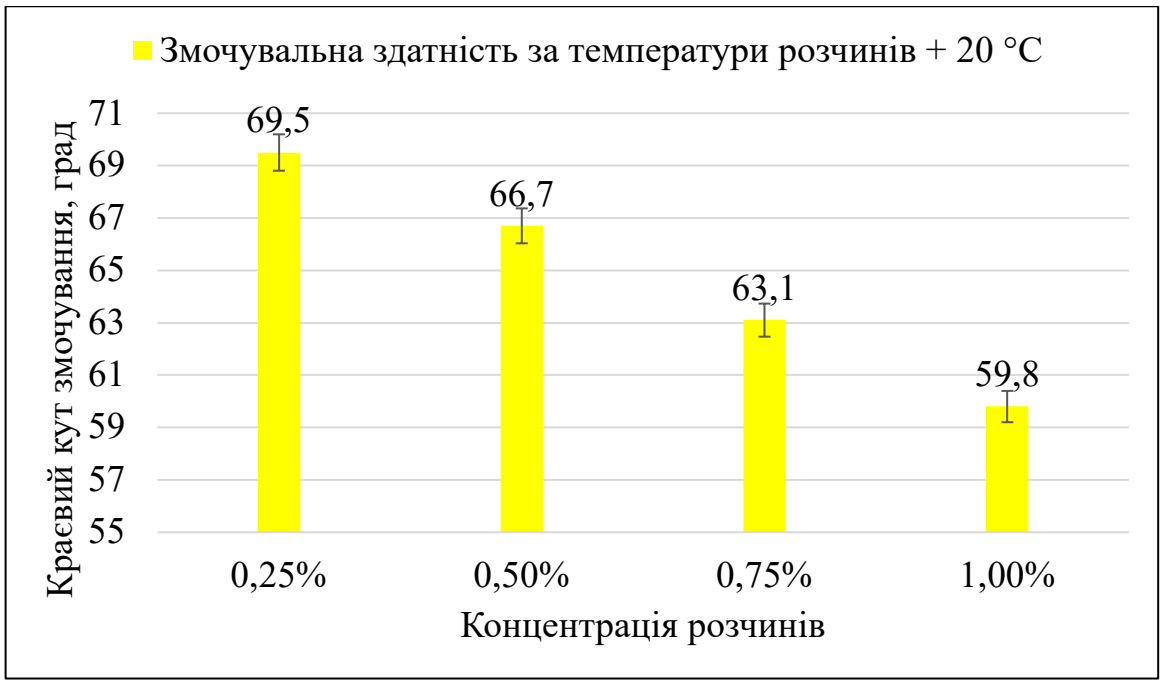

Рис. 3.15. Величина змочувальної здатності за різних концентрацій деззасобу «Ензидез», n=12

Поверхневий натяг, змочувальна здатність розчинів – це взаємопов'язані показники, які характеризують мийні властивості. Результати з визначення мийних властивостей розчинів деззасобу «Ензидез» наведено в табл. 3.13.

Таблиця 3.13

Мийні властивості та піноутворююча здатність деззасобу «Ензидез» за різних концентрацій розчинів, M±m, n=12

Концентрація розчину, %	Мийна здатність	Піноутворююча здатність, %	Стійкість піни, %
0,25	Добра	13,7 ± 0,5	11,3 ± 2,1
0,50	Добра	16,6 ± 0,4	12,5 ± 3,3
0,75	Добра	19,2 ± 0,6	14,3 ± 3,6
1,0	Відмінна	24,0 ± 0,8*	17,7 ± 3,7%

Примітка *– P<0,05 порівняно з 0,25 % концентрацією

Встановлено (табл. 3.13), що розчини Ензидезу у концентрації від 0,25 до 0,75 % проявляли мийну здатність на оцінку добре, водночас збільшення концентрації до 1,0 % забезпечувало відмінний мийний ефект. При цьому виявлено, що розчини дезінфектанту є досить пінними, так як за 0,25 % концентрації піноутворююча здатність становила 13,7 ± 0,5 % та збільшилася в середньому на 10 % за 1,0 % концентрації. Утворена піна не була доволі стійкою, так як висота піни в 1,0 % розчину становила 17,7 ± 3,7 % через 5 хв вимірювання, що вважається допустим для даної категорії засобів [63]. Це вказує, що для змивання засобу із робочих поверхонь об'єктів ветеринарного нагляду, додаткового інвентаря чи обладнання не буде використовуватися велика кількість води для ополіскування.

Отже, за показниками мийної здатності та піноутворення розчини дезінфікуючого засобу «Ензидез» у концентрації від 0,25 до 1,0 % проявляють добрий і відмінний мийний ефект, а піноутворювальна здатність та стійкість піни є цілком прийнятними з метою застосування для дезінфекції обладнання, інструментів, об'єктів ветеринарного нагляду, тощо у ветеринарній медицині.

Дезінфікуючі засоби, які матимуть контакт з металевими поверхнями, обов'язково перевіряються на їхню корозійну активність. Дезінфектанти, у яких корозійна дія перевищує встановлені вимоги, не допускаються до виробництва через швидке руйнування металів. Результати визначення величини корозії у деззасобу «Ензидез» наведено в табл. 3.14.

З даних табл. 3.14 видно, що величина корозії 0,25 % розчину дезінфектанту щодо нержавіючої сталі становила 0,001 г/м^2-рік, що практично в 2000 разів менше, ніж допускається норма для даного металу. Водночас, у 1,0 % розчину засобу величина корозії збільшилася в 3 рази, але вона всеодно була несуттєва. Швидкість корозії нержавіючої сталі також зростала із збільшенням концентрації розчину – з 0,25 до 1,0 %, проте вона також була в сотні разів нижча допустимої норми.

Таблиця 3.14

Величина корозійної дії деззасобу «Ензидез» на нержавіючу та оцинковану сталь за різних концентрацій розчинів, M±m, n=24

Концентрація розчинів засобу, %	Нержавіюча сталь		Оцинкована сталь	
	Величина корозії, г/м^2-рік	Швидкість корозії, мг/м^2-год	Величина корозії, г/м^2-рік	Швидкість корозії, мг/м^2-год
0,25	0,001	0,02	0,003	0,05
0,50	0,001	0,02	0,004	0,07
0,75	0,002	0,03	0,006	0,1
1,0	0,003	0,05	0,008	0,14
Контроль: дистильована вода	0,001	0,02	0,001	0,02

Примітка: норма − величина корозії - 2,0 г/м^2-рік; швидкість корозії - 6,0 мг/м^2-год

Оцинкована сталь вважається більш сприятливою до корозії, ніж нержавіюча сталь. Із досліджень видно, що величина корозії оцинкованої сталі за впливу 0,25 % розчину Ензидезу становила 0,003 %, що в три рази більше, порівняно з нержавіючою сталлю. Водночас, за 1,0 % концентрації Ензидезу величина корозії оцинкованої сталі становила 0,008 %, що в середньому у 2,7 раза більше, ніж у 0,25 % розчину деззасобу. Аналогічні зміни відбувалися щодо зміни швидкості корозії на оцинкованій сталі. Проте, за усіх концентрацій взятих у дослід, величина і швидкість корозії деззасобу щодо оцинкованої сталі була в сотні разів нижче допустимих значень.

Отже, дослідження вказують, що розроблений дезінфікуючий засіб із вмістом ЧАС, похідних бігуанідину, протеолітичних і ліполітичних ензимів за корозійною активністю щодо оцинкованої і нержавіючої сталі вважається

слабокорозійноактивним та може застосовуватися протягом тривалого часу щодо даних видів сталі.

Дезінфікуючий засіб «Ензидез» у своєму складі містить протеолітичний ензим для руйнування матриксу біоплівкових форм бактерій, а також для посилення його активності за органічного забруднення поверхонь. Мікробіологічні дослідження щодо впливу його на бактерії у біоплівках виявили високу його активність щодо деградації матриксу і бактерицидної дії. Для додаткової характеристики дії засобу за вмісту органічних забруднень нами було визначено його протеолітичну активність щодо розкладання молочних білків.

На першому етапі даного дослідження було визначено оптимальну температуру протеолітичної активності деззасобу «Ензидез» за концентрації розчинів від 0,5 до 1,0 %. У дослідженнях використали молоко з вмістом 0,5% жиру та масовою часткою білка 3,0 %. Протеолітичну активність визначали через 15 та 30 хв експозиції, тобто протягом часу, за якого засіб проявляв бактерицидну концентрацію на поверхнях тест-об'єктів. Результати отриманих даних за 15 хв дії дезінфектанту наведено на рис. 3.16.

З дослідження (рис. 3.16) видно, що протеолітична активність Ензидезу залежала, в основному, від температури розчину та в меншій мірі від збільшення концентрації з 0,5 % до 1,0 %. Зокрема, за температури 20 ± 1 °С протеолітична активність становила від 41,3 ± 0,4 % для 0,5 % розчину до 43,1 ± 0,5 % для 1,0 % розчину. Збільшення температури розчинів Ензидезу посилювало його протеолітичну активність, яка за + 40 ± 1 °С зростала в середньому на 10 %, порівнюючи з активністю за температури + 20 ± 1°С. Найвища протеолітична активність 0,5 – 1,0 % розчинів засобу «Ензидез» становила за температури + 60 ± 1 °С – від 63,7 ± 0,5 % до 6,5 ± 0,6 %, відповідно, що в середньому на 22 % більше, проти активності даних розчинів за температури 20 ± 1°С. Збільшення температури розчинів дезінфектанту до 70 ± 1 °С практично загальмувало дію протеолітичних ензимів засобу, в результаті чого активність становила від 8,7 ± 0,2 % до 11,2

± 0,2 %. Це пояснюється денатураційними змінами, які виникають у первинній структурі молекул ензиму під дією температури [83, 214]. Отже, збільшення температури розчинів деззасобу «Ензидез» вище + 60 °С буде призводити до інгібування наявних у його складі ензимів.

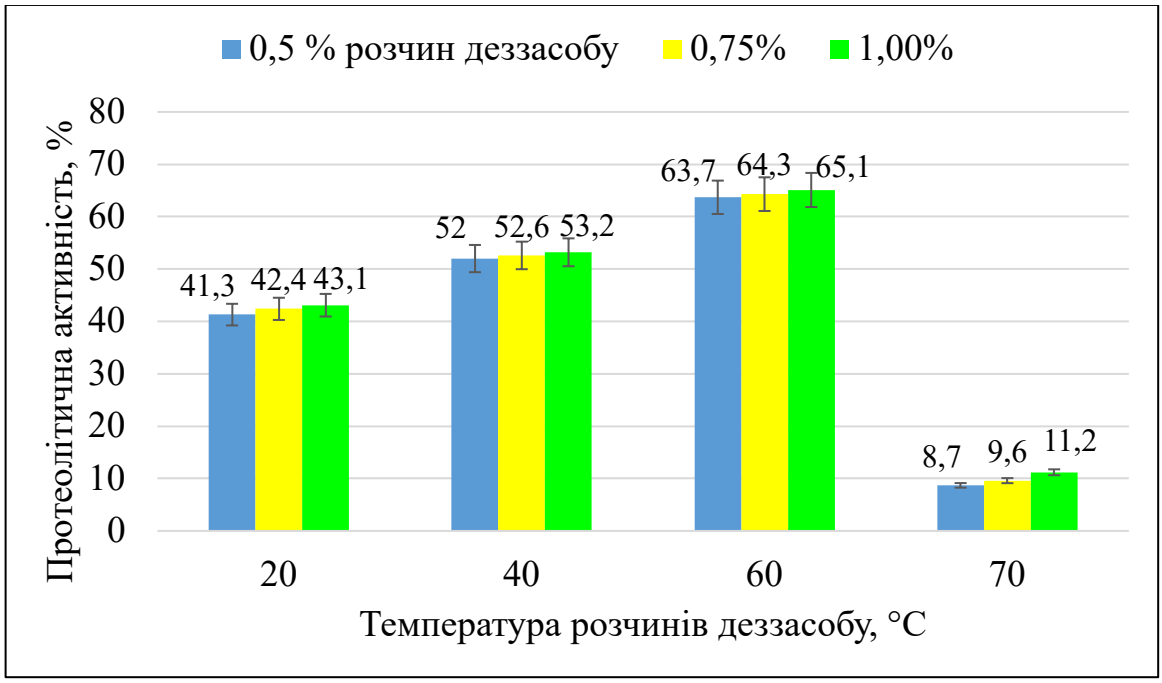

Рис. 3.16. Протеолітична активність деззасобу «Ензидез» за різних температур і концентрацій та тривалості дії 15 хв, n=36

Результати дослідження з визначення протеолітичної активності Ензидезу протягом 30 хв експозиції наведено на рис. 3.17.

Встановлено (рис. 3.17), що збільшення часу експозиції дезінфектанту до 30 хв посилювало його протеолітичну активність, порівнюючи з 15 хв дією. Зокрема, протеолітична активність 0,5 – 1,0 % розчинів деззасобу за температури 20 ± 1 °С становила від 45,7 ± 0,3 % до 47,3 ± 0,4 %, що на 4,3 % більше, ніж активність даних розчинів протягом 15 хв експозиції. Подібні зміни відбувалися і при визначенні протеолітичної активності за + 60 ± 1 °С протягом 30 хв. Так при даній температурі найвищу активність протеолізу відмічали у 1,0 % розчину – 69,7 ± 0,6 %, що на 4,6 % більше, ніж протягом 15хв впливу засобу.

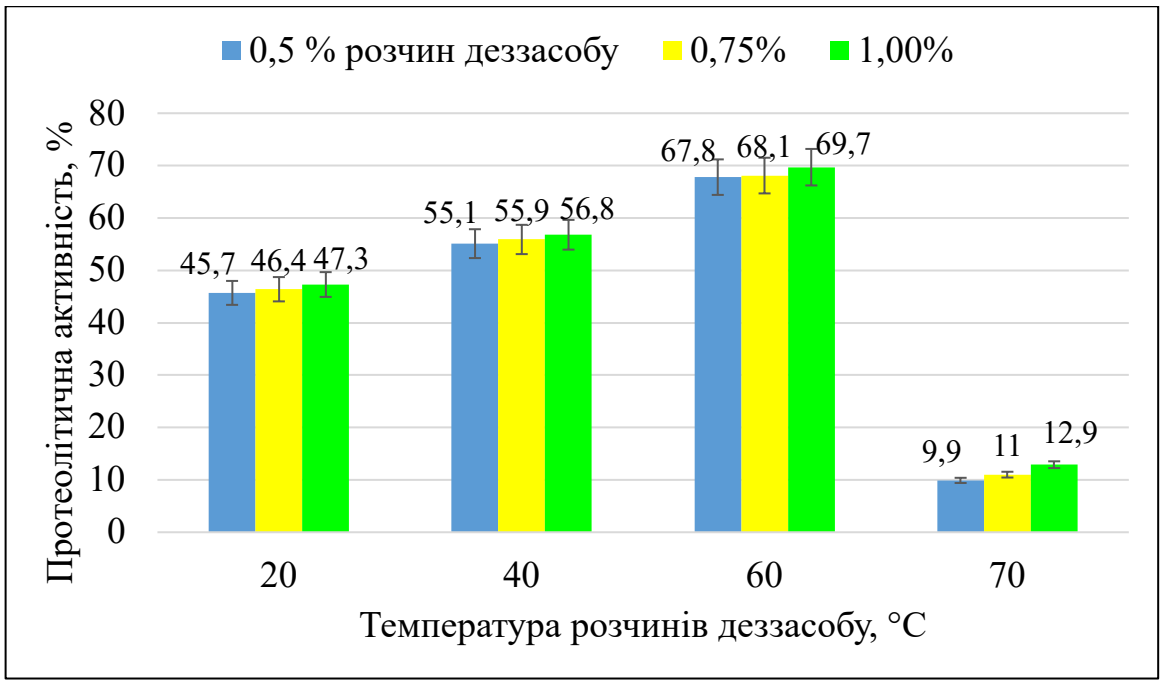

Рис. 3.17. Протеолітична активність деззасобу «Ензидез» за різних температур і концентрацій та тривалості дії 30 хв, n=36

З проведеного дослідження випливає, що дезінфікуючий засіб «Ензидез» проявляє вискоку протеолітичну активність, як за 0,5 %, так і за 1,0% концентрації та часу дії протягом 15 − 30 хв. Збільшення концентрації розчинів засобу з 0,5 до 1,0 % призводило до зростання протеолітичної активності, в середньому на 2 %, а збільшення тривалості експозиції з 15 до 30хв посилювало протеоліз на 4,2 – 4,6 %. Водночас, найбільший вплив на процес протеолітичної активності мала температура розчинів деззасобу. Зокрема, підвищення температури з + 20 °С до + 60 °С призводило до зростання протеолітичної активності Ензидезу в середньому на 20 %.

Загалом, для забезпечення найефективнішої дії деззасобу на об’єктах з органічним забрудненням доцільно підвищити температуру робочих розчинів до + 60 °С з часом експозиції 30 хв. За такого режиму відбувається приблизно на 70 % розкладання білкових речовин, що в кінцевому випадку зумовить кращий контакт дезінфікуючої речовини з мікробними клітинами.

Отже, розроблений дезінфікуючий засіб «Ензидез» за концентрації розчинів 0,5 – 1,0 % забезпечував добру змочувальну здатність, мийні

властивості на оцінку добре і відмінно, а піноутворювальна здатність та стійкість піни є цілком прийнятна з метою застосування для дезінфекції обладнання, інструментів, об'єктів ветеринарного нагляду. За корозійною активністю щодо оцинкованої і нержавіючої сталі «Ензидез» вважається слабо корозійноактивним та може застосовуватися протягом тривалого часу щодо даних видів сталі. Дезінфіктант проявляв протеолітичну активність за концентрації розчинів 0,5 – 1,0 % за температури + 20 °С на 41,3 – 43,1 %, відповідно, протягом 15 хв експозиції. Збільшення температури розчинів до +60 °С та експозиції 30 хв забезпечувало зростання протеолітичної активності до 70 %. «Ензидез» є високоактивним деззасобом для дезінфекції поверхонь навіть за органічного забруднення.

Результати досліджень опубліковано в науковій статті: Kukhtyn, M., Kozhyn, V., Horiuk, V., Horiuk, Y., & Boltyk, N. (2022). Evaluation of disinfectant «Enzidez» according to physical and chemical parameters. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, *24*(105), 3-9 [147].

3.7. Токсикологічні дослідження дезінфікуючого засобу «Ензидез»

Проведення доклінічних досліджень розчинів новостворених дезінфікуючих засобів є обов'язковою умовою для подальшої апробації їх у виробничих умовах. При цьому застосовують різні методи визначення можливого токсичного впливу розчинів деззасобу на клітини найпростіших організмів та теплокровних тварин [13, 62]. В контексті виконання діючого законодавства щодо контролю за хімічними сполуками, прийнятого Організацією з економічного співробітництва та розвитку, при впровадженні у виробничу практику нового дезінфікуючого засобу токсикологічні дослідження є обов'язковим компонентом під час розробки препаратів.

3.7.1. Дослідження токсичного впливу дезінфікуючого засобу «Ензидез» на клітини інфузорій

Розробка дезінфікуючих засобів – це складний етап проведення послідовних лабораторних і виробничих досліджень, спрямованих на максимальне отримання даних щодо механізму дії засобу, його впливу на живі клітини та обґрунтованого вибору оптимальних і ефективних режимів використання за різних умов. Токсикологічні дослідження – це обов'язкові дослідження, які визначають міру токсичності самого нативного засобу та його різних концентрацій. Саме токсикологічні дослідження дуже часто вносять корективи щодо робочої концентрації деззасобу, яку можна апробувати у виробничих умовах. Одним із методом токсикологічних досліджень є визначення міри токсичності розчинів дезінфікуючих засобів на клітинах інфузорій *Tetrachymena pyriformis*. Метою даного підрозділу було встановити токсичну концентрацію розчинів засобу «Ензидез» відносно лабораторного штаму WH-14 інфузорії *Tetrachymena pyriformis*. Тобто готували розчини засобу «Ензидез» за температури + 20 і + 30 °С та вносили у них штам інфузорії, витримували протягом 15 та 30 хв, відбирали матеріал для мікроскопії і підрахування кількості вижившихклітин тетрахімен в камері Горяєва. Час 15 та 30 хв експозиції було обрано з огляду на те, що засіб «Ензидез» використовують для дезінфекції поверхонь об'єктів ветеринарного нагляду протягом 15 та 30 хв. Міру токсичності засобу «Ензидез» за кількістю живих клітин інфузорій *Tetrachymena pyriformis* оцінювали відповідно до методичних рекомендацій [82]: відсоток живих клітин після впливу засобу не менше 81 % – середовище не токсичне для найпростіших; живих тетрахімен від 80 до 50 % − слаботоксичне: менше 50 % живих тетрахімен – токсичне.

Результати дослідження з визначення показників токсичності розчинів засобу «Ензидез» за температури + 20 °С наведено в табл. 3.15.

З даних досліджень (табл. 3.15) видно, що за 0,1 % концентрації засобу протягом 15 хв впливу кількість живих клітин інфузорій в полі зору

мікроскопа становила 31,0 ± 1,6 штук, що достовірно не відрізнялося від кількості в контрольному зразку. Усі клітини тетрахімен були живим, активно рухливими, рухи природні, поступальні, деформації тіла та різних вип'ячувань не відмічали. За такої кількості інфузорій дана концентрація розчину вважається нетоксичною. Збільшення часу витримки інфузорій у розчині до 30 хв зумовило зменшення кількості тетрахімен проти контрольного зразка. Зокрема, у досліді їх кількість становила 30,8 ± 1,5 штук у полі зору мікроскопа, що на 12,2 % менше, ніж у контрольному зразку. Також відмічаються клітини інфузорій із сповільненим та нехарактерним рухом. Хоча відповідно до класифікації токсичності за такої кількості живих клітин інфузорій розчини вважаються нетоксичними.

Таблиця 3.15

Показники токсичності дезінфікуючого засобу «Ензидез» за температури розчинів + 20 ± 1 °С на інфозоріях *Tetrachymena pyriformis* (лабораторний штам WH-14), n=12

Концентрація засобу, %	Кількість живих інфузорій через 15 хв, шт	Відсоток живих інфузорій через 15 хв, %	Кількість живих інфузорій через 30 хв, шт	Відсоток живих інфузорій через 30 хв, %
0,1	31,0 ± 1,6	92,1 ± 0,5	30,8 ± 1,5	87,8 ± 0,4
0,25	29,9 ± 1,5	88,7 ± 0,4	29,1 ± 1,4	83,1 ± 0,4
0,5	28,5 ± 1,5	84,5 ± 0,4	27,1 ± 1,3	77,3 ± 0,3*
0,75	20,6 ± 1,2	61,3 ± 0,2*	14,8 ± 1,1	42,2 ± 0,2*
Контроль (вода)	33,7 ± 1,8	100	35,1 ± 1,8	100

Примітка. *p<0,05 – порівняно з контролем

За 0,25 % концентрації розчинів деззасобу «Ензидез» протягом 15 хв дії виживаність найпростіших становила 88,7 ± 0,4 %. Хоч кількість живих

клітин була і меншою, як за 0,1 % концентрації розчину, проте дане зменшення не вважається токсичним для інфузорій. Вплив засобу у 0,25 % концентрації на інфузорій протягом 30 хв зумовив зменшення їх кількості на 16,9 %, порівняно з контрольним зразком. За такого режиму дії засобу відмічали деякі зміни руху інфузорій та незначні деформації, проте дана концентрація також згідно класифікації вважається нетоксичною, хоча і знаходяться на нижній межі визначеного нормативного показника.

За 0,5 % концентрації засобу протягом 15 хв впливу спостерігали зменшення на 15,5 % живих клітин інфузорій, а за 30 хв експозиції на 26,7 %, порівняно з контролем. Відповідно експозиція даного розчину протягом 30 хв вважається слаботоксичною для тетрахімен. У полі зору мікроскопа відмічали інфузорії з деформованими клітинами – наявність різних вип'ячувань, сповільнення та наявність хаотичних рухів.

Найбільш токсичною для інфузорій виявилася 0,75 % концентрація засобу «Ензидез», за якої протягом 15 хв впливу відмічали 61,3 ± 0,2 % вижившихклітин інфузорій, порівняно з контролем. Такий режим вважався слаботоксичним для тетрахімен. При експозиції 30 хв живих виявляли тільки 42,2 ± 0,2 % інфузорій, тобто такий режим вважається токсичний для життєдіяльності *Tetrachymena pyriformis*. У даному випадку при мікроскопії наявна значна кількість інфузорій з патологічними змінами форми (короткі клітини) та з порушенням природного руху.

Отже, з досліду підсумовуємо, що за температури розчинів засобу «Ензидез» + 20 ± 1 °С слаботоксичною концентрацією для інфузорій вважається 0,5 % з впливом 30 хв, а 0,75 % концентрація виявилася слаботоксичною протягом 15 хв дії та токсичною протягом 30 хв експозиції.

Попередні наші дослідження виявили, що з підвищенням температури розчинів засобу «Ензидез» з + 20 до + 40–60 °С значно посилюється його протеолітична активність та мийна здатність внаслідок активізації ензимів засобу. Тому нами було досліджено токсичність розчинів дезінфектанту за

температури + 30 °С, так як за вищої температури інфузорія гине. Результати дослідження наведено в табл. 3.16.

Таблиця 3.16

Показники токсичності дезінфікуючого засобу «Ензидез» за температури розчинів + 30 ± 1 °С на інфозоріях *Tetrachymena pyriformis* (лабораторний штам WH-14), n=12

Концентрація засобу, %	Кількість живих інфузорій через 15 хв, шт	Відсоток живих інфузорій через 15 хв, %	Кількість живих інфузорій через 30 хв, шт	Відсоток живих інфузорій через 30 хв, %
0,1	29,8 ± 1,3	90,0 ± 0,4	30,1 ± 1,3	86,2 ± 0,4
0,25	28,8 ± 1,2	87,1 ± 0,3	28,4 ± 1,2	81,4 ± 0,3
0,5	24,1 ± 1,1	72,8 ± 0,3*	22,5 ± 1,2	64,5 ± 0,3*
0,75	15,1 ± 0,8	45,6 ± 0,1*	10,9 ± 0,6	31,3 ± 0,06*
Контроль (вода)	33,1 ± 1,6	100	34,9 ± 1,5	100

Примітка. *$p<0,05$ – порівняно з контролем

Результати дослідження (табл. 3.16) показують, що з підвищенням температури розчинів засобу «Ензидез» з + 20 °С до + 30 °С посилюється їх токсичний вплив на клітини *Tetrachymena pyriformis.* Зокрема, видно, що розчини засобу за концентрації 0,1 – 0,25 % та експозиції 15 – 30 хв незначно впливали на життєдіяльність інфузорій, так як кількість живих клітин становила не менше 80 %, що аналогічно, як за температури + 20 ± 1 °С. Водночас, за концентрації деззасобу 0,5 % токсичний вплив був сильніший, ніж за даної концентрації та температури + 20 ± 1 °С. Протягом 15 та 30 хв впливу засобу на інфузорії кількість вижившихклітин становила 72,8 ± 0,3 % та 64,5 ± 0,3 % ($p<0,05$), відповідно. За такої кількості інфузорій розчини даної концентрації вважаються слаботоксичними. У той же час, за

температури розчинів даної концентрації + 20 °С їх вплив на інфузорій був нетоксичним (експозиція 15 хв) та слаботоксичним (експозиція 30 хв). Посилення токсичного впливу з підняттям температури, очевидно, пов'язано з інтенсифікацією обмінних процесів в клітинах найпростіших, що виражається більшим споживанням засобу.

За 0,75 % концентрації Ензидезу кількість живих клітин становила 45,6 ± 0,1 % протягом 15 хв впливу та 31,3 ± 0,06 % протягом 30 хв дії, тобто дана концентрація виявилася токсичною за обох режимів впливу.

Отже, підсумовуючи необхідно відзначити, що дезінфікуючий засіб «Ензидез» за концентрації 0,1 – 0,25 % та температури розчинів від + 20 до + 30 °С протягом 30 хв впливу не був токсичний щодо клітин інфузорій. Розчини деззасобу «Ензидез» за концентрації 0,5 % проявляли слаботоксичний вплив тільки за експозиції протягом 30 хв, а з підвищенням їх температури до + 30°С і за 15 хв впливу. Дезінфектант у 0,75 % концентрації спричиняв слаботоксичну дію на тетрахімени за + 20 °С протягом 15 хв впливу та токсичну протягом 15 і 30 хв дії за температури розчинів + 30 °С. Це вказує на те, що при застосуванні для дезінфекції розчинів у 0,5 % концентрації та вище необхідно використовувати рукавички та засоби індивідуального захисту.

Результати дослідження опубліковано в науковій статті: Kozhyn, V. A., Kukhtyn, M. D., Horiuk, Y. V., Horiuk, V. V., Perkiy, Y. B., & Gufrij, D. F. (2021). Дослідження токсичного впливу дезінфікуючого засобу «Ензидез» на клітини інфузорій. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, *9*(4), 191-194 [18].

3.7.2. Дослідження показників гострої токсичності дезінфікуючого засобу «Ензидез» на лабораторних тваринах

Дослідження з встановлення параметрів підгострої (гострої) токсичності деззасобу «Ензидез» проводили на білих мишах живою масою 18 – 20 г. Для цього їм вводили через зонд внутрішньошлунково нативний

дезінфіктант у кількості 0,5 $см^3$ на одну мишу. Спостерігали за тваринами протягом 15 діб. Результати дослідження наведено в табл. 3.17.

Таблиця 3.17

Визначення LD_{50} за дії концентрованого (нативного) деззасобу "Ензидез" по Керберу, мг/кг, M±m, n=70

№ п/п	Доза деззасобу	Загинуло гол.	Вижило гол.	aM(LD_{50})
1	500,00	0	10	5525,0 ± 3,16
2	1000,00	1	9	5150,0 ± 3,08
3	2000,00	2	8	5300,0 ± 3,27
4	3000,00	4	6	5500,0 ± 3,38
5	4000,00	6	4	5700,0 ± 3,34*
6	5000,00	9	2	5900,0 ± 3,45*
7	6000,00	10	0	6000,0 ± 3,48*
Сума		32	38	39075,0 ±3,30
			LD_{50}	5582,1 ± 3,27

Примітка: *P<0,05 – порівнюючи із початковими значеннями

Встановлено (табл. 3.17), що в першій дослідній та контрольній групі (вводили 0,5 мл води) загибель мишей не реєстрували. У інших дослідних групах спостерігали загибель тварин протягом 1 – 13 добового періоду тривалості досліду. Як наслідок, за результатами обрахунків отриманих даних встановлено, що величина LD_{50} становила 5582,1 ± 3,27 мг/кг. Відповідно до визначеної класифікації, наведеної в стандарті [11], речовини із такою токсичністю належать до малотоксичних – четвертий клас.

Нами також проведено дослідження з визначення токсичності у гострому досліді найбільш можливої 1,0 % робочої концентрації Ензидезу. Результати наведено в табл. 3.18

За результатами досліду (табл. 3.18) встановлено, що робоча 1,0 % концентрація деззасобу «Ензидез» не спричиняла загибель мишей при

внутрішньошлунковому введенні в дозі від 5000 до 13000 мг/кг. Це вказує, що доза в 13000 мг/кг маси тіла буде переносимою (LD_0) для тварин, водночас середня смертельна (LD_{50}) доза буде вища даної кількості. Відповідно за класифікацією щодо шкідливості речовин [11] деззасіб у робочій концентрації 1,0 % буде вважатися малотоксичним (4 клас токсичності).

Таблиця 3.18

Дослідження гострої токсичності 1,0 % розчину деззасобу «Ензидез» по Керберу, мг/кг, M±m, n=35

№ п/п	Доза деззасобу	Загинуло	Вижило
		гол.	гол.
1	5000,00	7	7
2	7000,00	7	7
3	9000,00	7	7
4	11000,00	7	7
5	13000,00	7	7
Сума		35	35

Макроскопічні дослідження внутрішніх органів лабораторних мишей після введення їм летальних та робочих доз препарату «Ензидез». Для виявлення змін в тканинах і органах контрольних і дослідних мишей, які спричиняє «Ензидез» в летальних і робочих концентраціях розчинів, було проведено патолого-анатомічний розтин та макроскопічні дослідження. Розтин тварин проводили після їх загибелі. При розтині загиблих мишей (при введенні дози LD_{100}) дослідних груп виявляли такі макроскопічні зміни: в трахеї і бронхах піниста рідина; легені почервонілі. При розрізі з їх поверхні виділяється така ж рідина із пухирцями повітря; при оцінці серця виявлено, що воно заокруглене, видна чітка дилятація правої половини стінки серця; селезінка була темно-червоного забарвлення, консистенція дрябла, розмір

дещо збільшений; огляд слизової оболонки шлунка та тонкої кишки виявив, що фундальна та пілорична частини шлунка яскраво-червоного забарвлення з набряком; вміст у тонкій кишці і шлунку відсутній; лімфовузли (мезентеріальні) збільшені, мають темно-червоне забарвлення; у товстій кишці змін не виявлено; нирки відчутно дряблої консистенції мають темно-червоне забарвлення, межі між шарами кірковим і мозковим нечіткі. Печінка дряблої консистенції із заокругленими краями, забарвлення поверхні нерівномірне: бліді ділянки чергуються із темно-вишневими.

При розтині забитих тварин контрольної групи патолого-анатомічних змін не виявляли.

Таким чином, за застосування смертельних доз LD_{50} Ензидезу загибель дослідних мишей відбувалася від легеневої недостатності через гіперемію та набряк легень. За ступенем небезпечності засіб відноситься до 4 класу (малотоксичні речовини). За введення у шлунок робочого 1,0 % розчину дезінфектанту видимих патолого-анатомічних змін у дослідних мишей після ефтаназії не виявляли, що вказує на його низьку токсичність.

3.7.3. Дослідження подразнюючої дії деззасобу «Ензидез» та його 1 % розчину

Місцево подразнюючі властивості деззасобу «Ензидез» та його 1 % розчину визначали на білих кроликах. На кожну концентрацію використано три кролики і три кролики були в контролі. На підготовлену (стрижену) шкіру кроликів наносили нативний засіб (три кролики), а іншим трьом наносили 1 % розчин дезінфектанту. Після чотирьох годин експозиції шкіру промивали теплою водою і витирали марлевим тампоном. Час спостереження за тваринами – протягом 14 діб. У контролі наносили дистильовану воду. Встановлено, що при нанесенні концентрованого деззасобу на шкірі протягом 2 – 6 год появлялася гіперемія, яка проходила упродовж однієї доби і в подальшому видимої різниці між ділянками шкіри у дослідних і контрольних тварин не відмічали. Кроликам другої дослідної групи, яким

робили аплікацію 1 % розчином Ензидезу видимих змін на обробленій шкірі протягом періоду спостереження за тваринами не відмічали.

Отже, нативний розчин дезінфектанту спричиняє незначне подразнення шкіри, тому при приготуванні робочих концентрацій розчину необхідно використовувати гумові рукавиці. Робочий 1 % розчин Ензидезу не спричиняв подразнюючої дії.

3.7.4. Дослідження шкірно-резорбтивної дії деззасобу «Ензидез» та його 1 % розчину

Для з'ясування можливого всмоктування деззасобу та його розчинів через шкіру було визначено його резорбтивну дію. Дослід проведено на білих мишах, хвости яких поміщали у пробірку з нативним та робочим розчином дезінфектанту, витримували протягом двох годин та оцінювали результат і спостерігали за тваринами до 14 діб. Встановлено, що нативний засіб спричиняє почервоніння та гіперемію шкіри хвостів тварин, водночас, зміни в кількості рідини не відмічали. Робочий 1 % розчин не спричиняв подразнення та резорбтивної дії. Спостереження за мишами протягом досліду не виявило відхилення у їхній поведінці, порівнюючи з контрольними тваринами.

Отже, робочі розчини та нативний засіб «Ензидез» не спричиняє резорбтивної дії через шкіру.

3.7.5. Дослідження впливу деззасобу «Ензидез» та його 1 % розчину на слизові оболонки очей кроликів

Оцінку шкідливого впливу нативного та робочого 1 % засобу «Ензидез» проводили за бальною шкалою відповідно до монографії [13]. Результати досліджень виявили, що 1 %-й розчин Ензидезу при закапуванні в кон'юнктивальний мішок кроликам спочатку спричиняв деякий дискомфорт, кролики крутили головою, проте видимих змін слизової оболонки не спостерігали. Виділень, почервоніння та набряку повік також не відмічали

протягом двохдобового спостереження, око добре закривалося та відкривалося.

Під час дослідження нативного дезінфектанту «Ензидез» (закапування в кон'юнктивальний мішок кроликам) виявили наступні зміни слизових оболонок (табл. 3.19).

Таблиця 3.19

Вплив дезінфікуючого засобу «Ензидез» на слизові оболонки очей дослідних тварин, n = 3

Подразнююча дія	Доба досліджень													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Характеристика першого кролика														
Виділення	3	3	3	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Гіперемія	3	3	3	3	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Набряк	3	3	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Характеристика другого кролика														
Виділення	3	3	3	3	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0
Гіперемія	3	3	3	3	3	2	1	1	1	1	1	0	0	0
Набряк	3	3	3	2	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Характеристика третього кролика														
Виділення	3	3	3	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0
Гіперемія	3	3	3	2	2	1	1	1	1	1	0	0	0	0
Набряк	3	3	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0

Примітка: − 0 балів –зміни слизової оболонки ока не виявляли

Дані табл. 3.19 показують, що нативний дезінфікуючий засіб «Ензидез» спричиняв шкідливий вплив на слизову оболонку очей дослідних кроликів.

Зокрема, відмічена гіперемія, набряк та виділення з кон'юнтивального мішка, тобто ознаки місцевого запалення, які інтенсивно проходили впродовж перших п'яти діб від часу закапування. Потім запальний процес поступово зникав і на 12 добу видимих патологічних змін слизових оболонок очей не спостерігали, тобто вони не відрізнялися від слизових оболонок контрольних очей.

Таким чином, нативний розчин дезінфектанту спричиняв шкідливий вплив у 9 балів на слизову оболонку очей, а робочий − 1 % розчин не викликав видимих змін слизової оболонки. Тому під час роботи із нативним деззасобом «Ензидез» необхідно використовувати засоби для захисту очей – окуляри.

3.7.6. Дослідження кумулятивних властивостей деззасобу «Ензидез» та його 1 % розчину

Для того, щоб встановити чи здатний розроблений дезінфектант до кумуляції в органах і тканинах організму, було проведено лабораторні дослідження на білих мишах (масою 18 – 20 г). Для цього сформовано дві групи мишей (дослідна – 10 тварин та контрольна – 10), дослідним мишам внутрішньошлунково вводили дезінфектант «Ензидез» в кількості 0,1 частини від раніше встановленої DL_{50} за одноразового введення (у нашому випадку1/10 – це 558,2 мг/кг маси). Через чотири доби дозу збільшували в 1,5 раза, наступне збільшення дози в 1,5 раза також проводять через чотири доби, за такою схемою дослід проводили 28 діб. Контрольним мишам за такою схемою вводили воду.

Протягом періоду дослідження показали, що середня кумулятивна доза DL_{50} за багаторазового введення дезінфектанту «Ензидез» становила 6358,2 мг/кг маси. Відповідно до формули з визначення коефіцієнта кумуляції ($К_{кум}$) (2.3) та проведення розрахунків $К_{кум}$ = 6358,2/5582,0 = 1,4 од.

Отже, на підставі отриманих експериментальних даних з визначення коефіцієнта кумуляції дезінфікуючого засобу «Ензидез» на лабораторних

тваринах (мишах) встановлено, що дезінфектант належить до засобів з відсутніми властивостями до кумуляції, або вони вважаються низькими [13, 63, 76].

3.7.7. Дослідження морфологічних та біохімічних показників крові мишей за застосування 1 % розчину деззасобу «Ензидез»

Нами було проведено дослідження з визначення впливу найбільш можливої концентрації робочого розчину «Ензидез» (1 %) на морфологічні показники периферичної крові та на біохімічні показники сироватки крові. Для цього робочий розчин засобу вводили внутрішньошлунково у дозі 5000 мг/кг маси (дослідна група 7 мишей), у контролі задавали воду.

Результати дослідження морфологічних показників периферичної крові наведено в табл. 3.20.

Таблиця 3.20

Морфологічні показники периферичної крові мишей на 12 добу після введення 1 % розчину деззасобу «Ензидез», M±m, n=7, %

Показники	Групи тварин	
	дослід	контроль
Еритроцити, Т/л	8,7 ± 0,3	8,1 ± 0,2
Лейкоцити, Г/л	12,2 ± 0,3*	10,2 ± 0,2
Гемоглобін, г/л	108,5 ± 2,2	105,4 ± 3,0
Лейкограма:		
базофіли	1,5 ± 0,1	1,0 ± 0,1
еозинофіли	3,1 ± 0,2*	1,5 ± 0,1
Нейтрофіли:		
мієлоцити	–	–
юні	–	–
паличкоядерні	5,1 ± 0,1	4,5 ± 0,3

продовження табл. 3.20

сегментоядерні	17,9 ± 1,8	26,3 ± 2,1
лімфоцити	71,2 ± 0,5*	65,0 ± 0,4
моноцити	1,2 ± 0,2	1,7 ± 0,2

Примітка: * – $p < 0,05$ – проти контролю

З даних табл. 20 видно, що морфологічні показники крові мишей у двох групах знаходилися в межах фізіологічних величин, хоч виявлено зростання в середньому на 20 % лейкоцитів ($p < 0,05$) проти контролю, аналогічно вірогідно зростали і лімфоцити ($p < 0,05$), що є свідченням прояву медикаментозного лейкоцитозу внаслідок реактивності організму на шкідливу речовину. Кількість еритроцитів у дослідній групі мишей хоч і зростала, але це збільшення не було достовірним. Збільшення кількості в 1,5 раза ($p < 0,05$) еозинофілів у крові дослідних тварин вказує на алергічну реакцію на складові речовини деззасобу.

Отже, дослідження периферичної крові мишей за застосування робочої концентрації деззасобу «Ензидез» виявило, що морфологічні показники знаходяться в межах допустимих величин, що є свідченням нетоксичності та безпечності даної концентрації дезінфектанту.

Біохімічні показники сироватки крові за застосування розчину Ензидезу наведено в табл. 3.21.

Таблиця 3.21

Біохімічні показники сироватки крові білих мишей на 12 добу після введення 1 % розчину деззасобу «Ензидез», M±m, n=7, %

Показники, од. вимірювання	Дослід	Контроль
Загальний білок, г/л	60,1 ± 2,02	65,7 ± 2,34
Альбуміни, %	53,5 ± 2,05	56,1 ± 2,12
Глобуліни, %	46,5 ± 1,84	43,9 ± 1,91

продовження табл. 3.21

АлАТ, ммоль/л	0,62 ± 0,05	0,52 ± 0,6
АсАТ, ммоль/л	0,97 ± 0,05	0,87 ± 0,05
Холестерол, ммоль/л	20,5 ± 1,3	19,1 ± 1,2

З досліджень табл. 3.21 видно, що вірогідних змін, щодо кількісного вмісту білка та його фракцій не спостерігали у дослідній групі мишей, проти контрольної. Активність ензимів класу трансаміназ у дослідній групі хоч і збільшувалася проти контролю, проте дане зростання не було вірогідне. Деяке збільшення ензимів трансаміназ і холестеролу пов'язано із всмоктуванням дезінфектанту із шлунково-кишкового тракту та активізацію енергетичних та метаболічних процесів в організмі.

Отже, дослідження виявило, що розчини Ензидезу не є фактором, що порушує метаболітичні процеси в організмі мишей.

Дослідження щодо зміни маси внутрішніх організів мишей за введення розчину Ензидезу наведено в табл. 3.22.

Таблиця 3.22

Маса внутрішніх органів білих мишей

на 12 добу після введення 1 % розчину деззасобу «Ензидез», M±m, n=7

Внутрішні органи, мг	Дослід	Контроль
Тимус	32,5 ± 1,4	31,1 ± 1,6
Щитоподібна залоза	3,92 ± 0,08	3,94 ± 0,07
Селезінка	0,19 ± 0,03	0,17 ± 0,02
Печінка	1,23 ± 0,04	1,14 ± 0,03
Нирки	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,03

Виявлено (табл. 3.22), що при дослідженні внутрішніх органів мишей на 12 добу дослідження різниці проти контролю у масі таких органів, як тимус,

щитоподібна залоза, селезінка не виявлено. Дані органи за масою відповідали фізіологічним значенням. Це показує, що розчини Ензидезу за застосування протягом 12 діб не змінюють динаміку приросту організму мишей, проти контролю.

Загалом, за результатами токсикологічних досліджень крові та маси внутрішніх органів мишей встановлено, що робочий 1 % розчин деззасобу "Ензидез" за застосування внутрішньошлунково протягом 12 діб суттєво не впливає на функціонування організму мишей.

3.8. Виробничі дослідження дезінфікуючого засобу «Ензидез» у клініках ветеринарної медицини

3.8.1 Дослідження впливу деззасобу «Ензидез» за дезінфекції поверхонь стін, підлоги, столів

Апробація дезінфікуючого засобу в реальних виробничих умовах дозволяє відкорегувати режими його застосування, які визначені на основі лабораторних досліджень. Тому наступною частиною наших досліджень було провести експерименти щодо ефективності різних концентрацій деззасобу «Ензидез» за дезінфекції різних об’єктів та знезараження виробів, інструментів, обладнання ветеринарного призначення у клініках ветеринарної медицини. Дослідження проведено у чотирьох приватних ветеринарних клініках, які знаходяться у м. Кам’янець-Подільський, Чернівці та Чортків: перша клініка «VitaeVet», друга «VetLife», третя «Пан Коцький», четверта «ZooVetSkill». Спочатку дослідили ефективність застосування різних концентрацій Ензидезу за дезінфекції підлоги, стін та різного типу столів, які призначені для огляду та хірургічного втручання тваринам. Дезінфекцію даних об’єктів проводили способом протирання їх за допомогою губки, змоченої у дезрозчин різної концентрації. До обробки та після обробки і експозиції 15 хв з даних об’єктів відбирали стерильним тампоном змиви з площі 10 × 10 см для подальшого мікробіологічного

дослідження з визначення ефективності дії деззасобу. Результати дослідження наведено в табл. 3.23.

Таблиця 3.23

Ефективність дезінфекції засобом «Ензидез» стін, підлоги, столів у ветеринарних клініках, M±m, n=36

Концентрація засобу, %	Об'єкт дослідження	До дезінфекції		Після дезінфекції		Ефективність дезінфекції, %
		МАФАнМ, КУО/мл змиву	БГКП	МАФАнМ, КУО/мл змиву	БГКП	
0,25	Стіни (плитка кахельна)	$8,2\pm0,3\times10^2$	>1	0	>1	100
0,50		$1,1\pm0,4\times10^3$	1	0	>1	100
0,75		$9,4\pm0,4\times10^2$	1	0	>1	100
1,00		$9,1\pm0,1\times10^2$	>1	0	>1	100
0,25	Підлога (плитка кахельна)	$7,3\pm0,4\times10^6$	0,1	$3,8\pm0,1\times10^1$	>1	99,99
0,50		$2,4\pm0,1\times10^6$	0,1	0	>1	100
0,75		$8,3\pm0,4\times10^5$	0,1	0	>1	100
1,00		$9,8\pm0,5\times10^5$	0,1	0	>1	100
0,25	Столи (сталь нержавіюча)	$9,7\pm0,5\times10^2$	1	0	>1	100
0,50		$5,9\pm0,2\times10^3$	>1	0	>1	100
0,75		$6,3\pm0,2\times10^3$	1	0	>1	100
1,00		$1,1\pm0,1\times10^4$	0,1	0	>1	100

З даних табл. 3.23 видно, що дезінфекція розчинами Ензидезу у концентрації 0,25 – 1,00 % поверхонь стін та підлоги, які вистелені кахельною плиткою, забезпечувала повне знищення мікроорганізмів, так як ефективність становила в основному 100 %. Тільки в одному випадку з поверхонь підлоги після дезінфекції 0,25 % розчином виділяли мікроорганізми, кількість яких становила $3,8\pm0,1\times10^1$ КУО/мл змиву. Проте, навіть за такого режиму ефективність дезінфекції становила 99,99 %.

За обробки Ензидезом у заданих концентраціях хірургічних столів та столів для огляду тварин також забезпечено 100 % дезінфікуючий ефект, оскільки мікроорганізмів із змивів не виділяли.

Отже, дослідження показує, що дезінфектант «Ензидез» можна застосовувати для дезінфекції стін і столів у 0,25 % концентрації, а для повного знищення мікроорганізмів на підлозі можна використовувати 0,25 – 0,5 % концентрацію.

3.8.2 Дослідження впливу деззасобу «Ензидез» під час достерилізаційного очищення хірургічних інструментів та виробів ветеринарного призначення у клініках ветеринарної медицини

У клініках ветеринарної медицини стараються усі маніпуляції з тваринами проводити стерильними інструментами та виробами для запобігання інфікування тварин через дані предмети та можливого контамінування стійкими патогенами. Тому у клініках після використання різних інструментів, виробів, обладнання їх очищають, миють та піддають різним методам стерилізації. Нами проведено достерилізаційне очищення хірургічних інструментів після їх використання за наступною схемою: споліскування водою з подальшим зануренням у деззасіб «Ензидез» за різної концентрації і експозиції 15 хв. До та після миття і дезінфекції відбирали змиви для виявлення мікроорганізмів. Результати дослідження наведено в табл. 3.24.

Встановлено (табл. 3.24), що після роботи інструментами та обладнанням з їх поверхонь виділяли грампозитивну і грамнегативну мікрофлору у кількості 10^3 КУО/змиву. Застосування режимів санації інструментів та обладнання деззасобом «Ензидез» у концентрації від 0,25 до 1,00 % забезпечувало бактерицидний ефект, як наслідок – мікроорганізмів з поверхонь не виділяли. Це вказує, що достерилізаційне очищення даних об’єктів може застосовуватися у випадку негайного їх використання навіть без проведення стерилізації сухим жаром, оскільки це дозволить економити

час і ресурси. Тому ми вважаємо, що режим достерилізаційного очищення шляхом занурення або протирання інструментів, обладнання чи виробів ветеринарного призначення у 0,25 – 1,0 % розчині Ензидезу можна використовувати у клініках ветеринарної медицини.

Таблиця 3.24

Ефективність дезінфекції засобом «Ензидез» хірургічних інструментів та виробів ветеринарного призначення у ветеринарних клініках, M±m, n=36

Концен-трація засобу, %	Об'єкт дослід-ження	Мікрофлора до дезінфекції / МАФАнМ, КУО/мл змиву	Після дезінфекції	МАФАнМ після дезінфекції, КУО/мл змиву
0,25	Хірургічні інструменти	Стафілококи, стрептококи, ентерококи, мікрококи, бацили, коринебактерії, ентеробактер, інші, $4,2\pm0,2\times10^3$	Не виявлено	0
0,50			Не виявлено	0
0,75			Не виявлено	0
1,00			Не виявлено	0
0,25	Стомато-логічні інструменти	Стафілококи, мікрококи, коринебактерії, стрептококи, дріжджі, спорові форми, БГКП, $2,7\pm0,1\times10^3$	Не виявлено	0
0,50			Не виявлено	0
0,75			Не виявлено	0
1,00			Не виявлено	0
0,25	Насадки для ото- і ляринго скопа	Стафілококи, мікрококи, коринебактерії, стрептококи, дріжджі, спорові форми, БГКП, $6,5\pm0,1\times10^3$	Не виявлено	0
0,50			Не виявлено	0
0,75			Не виявлено	0
1,00			Не виявлено	0

Нами також визначено ефективність запропонованих режимів дезінфекції за умови значного органічного та мікробного забруднення вищенаведених предметів. Адже у складі наявні протеолітичні і гліколітичні

ензими, які розкладають субстрати для кращої дії дезінфікуючих речовин. Результати дослідження наведено в табл. 3.25.

Таблиця 3.25

Ефективність дезінфекції засобом «Ензидез» хірургічних інструментів та виробів ветеринарного призначення за значного органічного забруднення, M±m, n=36

Концен-трація засобу, %	Об'єкт дослід-ження	МАФАнМ змиву до дезінфекції, КУО/мл	МАФАнМ після дезінфекції, КУО/мл змиву
0,25	Хірургічні інструменти	$5,7\pm0,3\times10^5$	0
0,50			0
0,75			0
1,00			0
0,25	Стоматологічні інструменти	$7,4\pm0,4\times10^5$	0
0,50			0
0,75			0
1,00			0
0,25	Насадки для ото- і ляринго-скопа	$8,6\pm0,6\times10^5$	0
0,50			0
0,75			0
1,00			0

З дослідження табл. 3.25 видно, що наявність значного мікробного і органічного забруднення поверхонь предметів, які дезінфікувалися не знижувало бактерицидну активність Ензидезу навіть за 0,25 % концентрації. Отже, це дає підставу застосовувати дезінфектант для обробки предметів і виробів ветеринарного призначення з різним мікробним забрудненням у концентрації 0,25 – 1,0 % та експозиції розчинів 15 хв.

РОЗДІЛ 4
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

Залежність медицини і ветеринарії від дезінфікуючих засобів постійно зростає через профілактичні стратегії і розвиток резистентності у мікроорганізмів [116, 133]. Тому на ринку з'являються все нові дезінфікуючі засоби з різним механізмом біоцидної активності щодо широкого кола патогенів. Проте, незважаючи на достатньо велику кількість дезінфікуючих засобів на ринку, ідеального – препарату не існує, так як мікроорганізми доволі швидко адаптуються до нових антибактеріальних субстанцій [59, 111, 129].

Перебування бактерій у біоплівці створює серйозні проблеми з інфікуванням різних поверхонь у медицині, ветеринарії та харчовій промисловості [104, 174]. Бактерії у біоплівках набагато складніше знищити антимікробними препаратами, що потенційно може призвести до накопичення і поширення небезпечних збудників. При цьому повідомляється, що концентрація біоциду, необхідна для знищення мікробних клітин у біоплівці, повинна в декілька разів перевищувати робочу для даного засобу [110, 111, 129]. Тому постійно проводяться зусилля щодо поліпшення роботи існуючих дезінфікуючих засобів або розробки нових для впливу на мікроорганізми у біоплівковому стані.

Літературні джерела вказують [43, 69, 89, 149], що саме за дезінфікуючими засобами з мийним ефектом, які активно видаляють органічні забруднення та впливають на біоплівкові форми бактерій, належить перспективність у їх розробці.

При визначенні бактерицидної дії катаміну як перспективної субстанції для створення нового деззасобу ми оцінювали його активність за різного значення pH розчинів. Встановлено, що з підвищенням pH розчинів катаміну відбувається підсилення бактерицидного ефекту, особливо це добре відмічається при порівнянні мінімальної бактерицидної дії катаміну за pH 7,0

та 11,0 од відносно штаму *S. aureus*. Збільшення величини pH до 11,0 од посилювало бактерицидний ефект розчинів, порівнюючи з pH 9,0 та 7,0 од. Зокрема, мінімальна бактерицидна концентрація протягом 10 хв експозиції становила 0,035 %, що на одне розведення менше, ніж за pH 9,0 од і за 20 хв експозиції становила 0,025 %, що також на одне розведення менше порівняно з pH 7,0 од. Виявлено, що *E. coli* є більш стійкіша, порівняно з *S. aureus* до розчинів катаміну. Зокрема, у нейтральному середовищі мінімальна бактерицидна концентрація катаміну становила 0,0691 % протягом 10 хв експозиції та на одне розведення менша (0,050 %) за 20 хв експозиції. Під час використання розчинів катаміну за pH 9,0 од відбулося зменшення мінімальної бактерицидної концентрації на одне розведення до 0,050 % протягом 10 хв експозиції та до 0,035% протягом 20 хв дії, що на одне розведення менше, ніж за дії катаміну в нейтральному середовищі. У дослідженнях [3] повідомляється, що у мийно-дезінфікуючому засобі Сан-актив (діюча речовина «Катамін АБ»), який використовується для санітарної обробки на забійних цехах і м'ясопереробних підприємствах, бактерицидна активність у лужному середовищі була краща, ніж самого лугу за даної концентрації. Крім того, «Катамін АБ» відноситься до четвертинних амонієвих сполук, які проявляють мийний ефект, тому поряд з наявною дезінфікуючою дією він посилює у засобах мийні властивості [22]. При дослідженні дезінфікуючого засобу «Геоцид» (діючі речовини «Катамін АБ» - 20,0 % та «Полігексаметиленгуанідин гідрохлорид» - 1,0 %) за pH розчинів 8,0 од мінімальна бактерицидна концентрація відносно *S. aureus* становила 0,017 % протягом 10 хв експозиції. Розробники вказують, що поєднання четвертинних амонієвих сполук з полігексаметиленгуанідином підсилює бактерицидну дію катаміну [115].

Отже, отримані дані дають підставу вважати, що введення катаміну у лужні основи мийних чи дезінфікуючих засобів не буде інгібуватися високим значенням pH середовища.

Використання біоцидів направлене на знищення планктонних і біоплівкових форм мікроорганізмів на різних поверхнях [102, 115, 117, 142]. Однак успішна боротьба з мікроорганізмами, які перебувають у біоплівках, можлива за умови застосування дезінфікуючих засобів, які руйнують екзополісахаридний матрикс і сприяють тіснішому контакту бактерій з біоцидом [129, 213]. Серед значного асортименту дезінфікуючих засобів значна частина їх містить як діючі речовини бігуаніди та четвертинні амонієві сполуки. Під час вивчення впливу дезінфікуючих субстанцій Вантоцил TG і Катамін АБ та ензимів Everlase 16 L і Termamyl 300 L щодо деградації матриксу біоплівки виявлено наступне. Вантоцил TG у мінімальній бактерицидній концентрації, яка визначена на планктонних бактеріях, сприяв зниженню щільності біоплівки *S. aureus* в 1,5 раза, *E. coli* – в 1,6 раза *і P. aeruginosa* – в 1,7 раза, порівнюючи з контролем до обробки. Це вказує на те, що у складі екзополісахаридного матриксу біоплівок присутні компоненти, які погано деградуються даним біоцидом. Водночас, обробка біоплівок протеолітичним і амілолітичним ензимами більш суттєво знижувала їх щільність. Зокрема, після обробки ензимом Everlase 16 L щільність біоплівки *S. aureus* зменшилася в 2,4 раза, *E. coli* – в 2,8 раза *і P. aeruginosa* – в 3,0 раза. За обробки біоплівок ензимом Termamyl 300 L деградація матриксу була менш ефективною, ніж за обробки Everlase 16 L. Зокрема, щільність біоплівок *S. aureus, E. coli і P. aeruginosa* знижувалася в 2,1, 2,4 та 2,8 раза, відповідно. Це вказує на неоднорідний хімічний склад біоплівки у різних бактерій і для їх руйнування необхідно застосовувати ензими різних класів [83, 169, 213, 215]. За даними [103, 127, 136, 167, 196] склад матриксу біоплівки залежить від багатьох чинників, наявності поживних речовин, видового складу мікрофлори, pH середовища, типу поверхні, тощо, завдяки цьому захисна функція навіть у одного виду бактерій у біоплівці буде різнитися. Крім того, про кращу ефективність щодо руйнування матриксу біоплівкок протеолітичними ензимами повідомляють дослідження [83, 179], які виявили, що деградація біоплівки *P. aeruginosa*

ензимом Savinase була сильнішою, ніж за обробки Alphamylase. При обробці біоплівок вантоцилом з ензимами виявили синергізм дії, зокрема оптична густина розчинів з біоплівок *S. aureus, E. coli і P. aeruginosa* зменшилася в 4,1, 4,8, 5,6 раза, порівняно з контролем, і біоплівки ставали низької щільності. Про синергізм різних ензимів у боротьбі з гетерогенними біоплівками повідомляють дані [85, 103, 136, 127, 186, 213]. Незважаючи на те, що катамін у мінімальній бактерицидній концентрації для планктонних культур у меншій мірі руйнував біоплівки *S. aureus, E. coli і P. aeruginosa,* порівнюючи з вантоцилом, загальні закономірності впливу на біоплівки катаміну з ензимами були такі ж, як за обробки вантоцилом.

Під час дослідження впливу дезінфікуючих субстанцій на кількісний вміст мікроорганізмів у біоплівці виявлено, що з одного мл змиву з біоплівки після впливу вантоцилу виділяли від $1,9\times10^3$ до $4,3\times10^3$ мікробних клітин, а після обробки катаміном від $5,6\times10^3$ до $1,7\times10^4$. Отримані результати підтверджують дані багатьох дослідників [106, 110, 111, 141, 146, 176], про те, що визначена мінімальна бактерицидна концентрація на планктонних бактеріях не діє бактерицидно на біоплівкові форми. Водночас, після обробки біоплівок вантоцилом і катаміном разом з ензимами спостерігали зменшення кількості клітин *S. aureus, E. coli* і *P. aeruginosa,* в середньому на два порядки до 10^1 КУО/мл, порівнюючи з обробкою тільки біоцидами. Тобто спостерігається чітко виражений синергізм ензимів і біоцидів, що в кінцевому етапі більш згубно діє на бактерії у біоплівках. Отже, у даному випадку можна стверджувати, що ензими руйнують матрикс біоплівки, що сприяє кращому контакту антибактеріальних речовини з клітинами-мішенями.

На підставі мікробіологічних досліджень бактерицидної дії дезінфікуючих субстанцій та даних фізико-хімічних властивостей їх сумісності з ензимами, комплексонами, іінгібіторами корозії, стабілізаційними складовими було розроблено 9 дослідних зразків дезінфікуючого засобу, оптимальним яким став зразок наступного складу:

Катамін АБ – розчин з вмістом 49 − 51 % алкілдиметилбензиламоній хлориду – 8,0 − 12,0 %; Вантоцил TG – 20 % водний розчин полігексаметиленбігуанідину гідрохлориду – 1,0 − 2,0 %; інгібітор корозії (натрій кремнієвокислий) та комплексони – 4,5 %; протеолітичний ензим – *Everlase 16 L* та амілолітичний ензим – *Termamyl 300 L* у кількості 0,5 − 0,75% та дистильована вода – 81,25−86,50 %. Даний деззасіб було названо дезінфікуючий засіб "Ензидез".

При вивченні мінімальної бактерицидної концентрації деззасобу «Ензидез» було встановлено, що за експозиції 15 хв відносно *S. aureus* становило 1:1466,3 (0,0691 % за препаратом), а за 30 хв – 1:2834,7 (0,0352 %). *E. coli* і *P. aeruginosa* виявилися більш чутливі до дії дезінфікуючого засобу «Ензидез», порівняно з *S. aureus.* Зокрема, мінімальне бактерицидне розведення деззасобу відносно *E. coli* за експозиції 15 хв становило 1:2834,7 (0,0352 % за препаратом), а відносно *P. aeruginosa* в 1,9 раза ($p < 0,05$) нижче, порівняно з розведенням відносно *E. coli*. За умови наявності у середовищі, що піддається дезінфекції, до 10 % крові (білка) відбувається зниження бактерицидної активності Ензидезу в середньому в 1,4 раза щодо штамів *S. aureus, E. coli* та *P. aeruginosa.* Також встановлено, що бактерицидна активність деззасобу «Ензидез» відносно штаму *S. aureus* №АТСС 25923 була, в середньому 12,7 раза сильніша, порівняно з бактерицидною дією розчину фенолу. Бактерицидна активність Ензидезу відносно штамів *E. coli* і *P. aeruginosa* виявилася в 24,0 та 28,8 раза сильніша, відповідно, порівняно з дією фенолу. У дослідженнях [43, 89, 115], також вказують, що засоби на основі ЧАС та полігексаметиленбігуанідину хлориду (ПГМБГХ) (Сандез, Санактив, Барез, Геоцид) проявляють високу бактерицидну дію за низьких концентрацій. Тому ми вважаємо, що засіб «Ензидез» буде проявляти добру антимікробну дію у виробничих умовах.

При вивченні впливу деззасобу «Ензидез» на тест-об’єкти з різних рельєфом поверхні було встановлено, що за 0,05 % концентрації протягом 15 хв дії препарат не забезпечував знезараження поверхні кахельної плитки та

нержавіючої сталі від штамів *S. aureus B. subtilis ma Candida spp.* Для знищення бактерійної і грибкової 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.

Крім того, наші результати узгоджуються з дослідженнями авторів [43, 69], які повідомляють, що дезінфікуючі засоби «Санактив», «Сандез» з діючою дезінфікуючою речовиною 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 ± 5 °С [89]. 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* [218]. У нашому випадку поєднання ЧАС, ПГМБГХ 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.

Під час дослідження впливу дезінфікуючого засобу «Ензидез» на біоплівкоутворювальні штами умовно-патогенних мікроорганізмів встановлено наступне. Деззасіб «Ензидез» руйнує біоплівки взятих у дослід музейних тест-культур *S. aureus, E. coli* і *P. aeruginosa.* Зокрема, за впливу найнижчої взятої у дослід концентрації 0,075 % оптична густина промивних розчинів з біоплівок *S. aureus* зменшилася в 2,6 раза*,* біоплівок *E. coli* і *P. Aeruginosa* – в 2,9 раза*,* відповідно, порівнюючи з біоплівками після обробки водою. За дії такої концентрації засобу «Ензидез» біоплівки хоч значно деградували, проте вони ще були середньої щільності, більше 0,5 од. Підвищення концентрації засобу з 0,075 % до 0,5 % сприяло інтенсивності деградації біоплівки тест-культур в середньому в 3,0 раза ($p < 0,05$) і вони

ставали слабкої щільності (0,24 – 0,20 од). Підвищення концентрації засобу «Ензидез» до 1,0 % і більше не суттєво руйнувало матрикс біоплівки мікроорганізмів, так як оптична густина промивних розчинів була як у контролі. Це вказує на те, що додавання у склад засобу ензимів різних класів є доброю перспективою для руйнування мікробних біоплівок та деградації органічних компонентів із поверхні. Руйнування матриксу дозволяє знизити ефективну робочу бактерицидну концентрацію деззасобу, так як планктонні клітини в декілька десятків разів є чутливіші до антимікробних препаратів, проти біоплівкових форм цих мікроорганізмів [110, 111, 129, 177].

При визначенні впливу температури робочих розчинів засобу «Ензидез» на його плівкоруйнуючу активність, встановлено, що із підвищенням температури дезінфікуючого засобу «Ензидез» з + 20 до + 60 °С відбувається збільшення деградації біоплівок, сформованих золотистим стафілококом, кишковою і синьогнійною паличками. При цьому з отриманих даних випливає, що деззасіб можна ефективно використовувати в 0,5 % концентрації за кімнатної температури розчинів. При обґрунтуванні часу експозиції деззасобу «Ензидез» виявлено, що для видалення біоплівок *S. aureus, E. coli* і *P. aeruginosa* 0,5 % засобом за температури розчинів + 20 ± 1 °С необхідно, щоб час дії становив від 15 до 30 хв. Протягом даного періоду дії деззасобу оптична густина розчинів з біоплівок зменшувалася до 0,24 – 0,13 од, що вважається, як слабка щільність біоплівки. Тобто, спостерігається чітко виражений синергізм ензимів і дезінфікуючої субстанції, що в кінцевому етапі більш згубно діє на бактерії у біоплівках. У даному випадку можна стверджувати, що ензими руйнують матрикс біоплівки, що сприяє кращому контакту антибактеріальних речовини з клітинами-мішенями.

Загалом з отриманих даних даного дослідження можна підсумувати таке. Наявність мікробних біоплівок на поверхнях медичних та ветеринарних інструментів, операційному обладнанні, протезах, катетерах, об’єктах ветеринарного нагляду, технологічних лініях у харчовій промисловості

вважається чинником, який сприяє інфікуванню макроорганізму, забрудненню сировини та продукції. Тому використання біоцидів направлене на знищення планктонних і біоплівкових форм мікроорганізмів на різних поверхнях. Однак успішна боротьба з мікроорганізмами, які перебувають у біоплівках, можлива за умови застосування дезінфікуючих засобів, які руйнують екзополісахаридний матрикс і сприяють тіснішому контакту бактерій з біоцидом.

Під час розробки дезінфікуючих засобів обов'язковою складовою лабораторних досліджень є визначення фізико-хімічних показників, які дозволяють глибше зрозуміти механізми їх дії та в подальшому розробити оптимальні режими застосування. Розроблений нами дезінфікуючий засіб з ензимами – «Ензидез» для дезінфекції у клініках ветеринарної медицини для передстерилізаційної дезінфекції та стерилізації ветеринарних виробів, інструментів хірургічного призначення (пластмаса, гума, скло, нержавіюча сталь) та об'єктів ветеринарного нагляду (столи, інвентар, стіни, підлога, двері, вікна, тощо) з органічним навантаженням, виявився добре розчинним у воді та має pH 0,25 – 1,0 % розчинів в межах 8,2 – 8,0 од. У рекомендаціях щодо оцінки дезінфікуючих засобів [63] робочі розчини їх повинні добре розчинятися у водопровідній воді, мати низький поверхневий натяг (нижче 60 мН/м) та краєвий кут змочування нижче 90 град. Отримані нами дослідження виявили, що засіб «Ензидез», навіть за 0,25 % концентрації та температури розчинів +20 ± 1 °С мав поверхневий натяг 37,63 ± 0,50 мН/м та краєвий кут змочування 69,5 ± 0,7 град. Це дає підставу вважати, що обробка робочих поверхонь даним засобом буде забезпечувати добру змочуваність поверхні та додатково до дезінфікуючої дії забезпечувати мийний ефект. У дослідженнях вчених [22, 69, 89], повідомляється, що мийно-дезінфікуючі засоби «Сандез», «Сан-актив», які у своєму складі містять ЧАС та луг, проявляють мийні властивості. Інші автори [6, 191] вказують про засіб «Мілкодез», який містить похідні гуанідину та ортофосфорну кислоту також проявляв відмінний мийний ефект. У нашому деззасобі «Ензидез» у складі

наявні ЧАС, похідні бігуанідину, мийний ефект на оцінку «відмінно» проявлявся тільки за концентрації розчинів 1,0 % і вище. Тому ми можемо вважати, що розроблений нами дезінфікуючий засіб проявляє мийний ефект, але це його додаткова властивість, яка посилить його активність під час застосування. Дезінфікуючі засоби, які рекомендуються для обробки металевих поверхонь повинні бути слабокорозійно активними. При оцінці корозійної дії Ензидезу у концентрації розчинів від 0,25 до 1,0 % величина корозії на нержавіючу сталь була в сотні разів нижча допустимої нормативної межі. За впливу на оцинковану сталь дещо вища, ніж на нержавіючу, але також в декілька десятків нижче норми. Низька корозійна активність Ензидезу пов'язана з наявністю у його складі антикорозійних добавок, тому застосування засобу у виробничих умовах не буде спричиняти швидке зношування металевого обладнання та інструментів.

Новизна складу дезінфікуючого засобу «Ензидез» полягає у поєднанні ЧАС, похідних гуанідину, протеолітичних і гліколітичних ензимів. Саме наявність ензимів у складі деззасобу дозволяє руйнувати захисний пептидносахаридний матрикс мікробної біоплівки на поверхнях, що обробляються і тим самим покращити контакт дезінфектанта з мікробними клітинами. Адже успішна боротьба з мікроорганізмами, які перебувають у біоплівках, можлива за умови застосування дезінфікуючих засобів, які руйнують екзополісахаридний матрикс [91, 102, 209, 213]. Дослідження з визначення протеолітичної активності деззасобу «Ензидез» щодо білків молока виявило, що дезінфіктант розщеплював білки за концентрації розчинів 0,5 – 1,0 % за температури + 20 °С на 41,3 – 43,1 %, відповідно протягом 15 хв експозиції. Проте, збільшення температури розчинів до + 60 °С та експозиції 30 хв забезпечувало зростання протеолітичної активності до 70 %. Про високу протеолітичну ефективність мийних засобів із ензимами для санітарної обробки у молочній промисловості повідомляють дослідження [85, 86], відповідно у засобу «Ензимий» із вмістом протеолітичного ензиму відбувався значний протеоліз молочно-білкових

залишків. Це дає підставу вважати, що дезінфікуючі засоби із ензимами будуть мати значні перспективи у ветеринарній медицині у боротьбі з мікробними біоплівками на об'єктах ветеринарного нагляду.

Розробка дезінфікуючих засобів передбачає проведення токсикологічних досліджень на різних живих модельних об'єктах для встановлення класу його токсичності та впливу на навколишнє середовище. Нами було визначено токсичність новоствореного дезінфікуючого засобу «Ензидез» з вмістом четвертиноамонієвих сполук, похідних бігуанідину та ензимами на культуру лабораторного штаму *Tetrachymena pyriformis.* Встановлено, що дезінфікуючий засіб «Ензидез» за концентрації 0,1 – 0,25 % та температури розчинів від + 20 до + 30 °С протягом 30 хв впливу не був токсичний щодо клітин інфузорій. Розчини деззасобу «Ензидез» за концентрації 0,5 % проявляли слаботоксичний вплив тільки за експозиції протягом 30 хв, а з підвищенням їх температури до + 30 °С і за 15 хв впливу. Дезінфектант у 0,75 % концентрації спричиняв слаботоксичну дію на тетрахімени за + 20 °С протягом 15 хв впливу та токсичну протягом 15 і 30 хв дії за температури розчинів + 30 °С. Це вказує на те, що при застосуванні для дезінфекції розчинів у 0,5 % концентрації та вище необхідно використовувати рукавички та засоби індивідуального захисту. У дослідженнях [89, 218] зазначається, що мийно-дезінфікуючий «Сан-актив» та «Аргіцид», який містить четвертиноамонієві сполуки також був слаботоксичним та токсичним за концентрації розчинів 1,5 та 2,0 % на клітини тетрахімен. Дезінфікуючі засоби Barez, Biochlor and Geocide [115], які у своєму складі мають діючі речовини похідні бігуанідину також проявляли токсичний вплив за використання у робочих концентраціях на *Tetrachymena pyriformis*. Водночас, у дослідженнях [9] мийний засіб на основі ферментів не проявляв токсичного впливу за робочої концентрації на клітини найпростіших. Тому ми вважаємо, що дезінфікуючі субстанції із класу похідних бігуанідину та ЧАС є токсичними на клітини тетрахімен за використання їх у деззасобах у бактерицидних концентраціях. Водночас,

наявність ензимів у складі деззасобу на нашу думку не посилює токсичний вплив Ензидезу. Тому за проведення дезінфекції даними засобами необхідно дотримуватися загальних правил охорони праці з використанням рукавиць, окулярів та захисного одягу.

Дослідження з встановлення параметрів підгострої (гострої) токсичності деззасобу «Ензидез» на білих мишах виявили, що робоча 1,0 % концентрація деззасобу «Ензидез» не спричиняла загибель мишей при внутрішньошлунковому введенні в дозі від 5000 до 13000 мг/кг. Це вказує, що доза в 13000 мг/кг маси тіла буде переносимою (LD_0) для тварин, водночас середня смертельна (LD_{50}) доза буде вища даної кількості. Відповідно за класифікацією щодо шкідливості речовин [11] деззасіб у робочій концентрації 1,0 % буде вважатися малотоксичним (4 клас токсичності). При паталогоанатомічному розтині лабораторних мишей після введення їм летальних та робочих доз препарату «Ензидез» встановлено, що загибель мишей відбувалася від легеневої недостатності через гіперемію та набряк легень. За ступенем небезпечності засіб відноситься до 4 класу (малотоксичні речовини). За введення у шлунок робочого 1,0 % розчину дезінфектанту видимих патолого-анатомічних змін у дослідних мишей після ефтаназії не виявляли, що вказує на його низьку токсичність. Крім того виявлено, що нативний розчин дезінфектанту спричиняє незначне подразнення шкіри білих кроликів, тому при приготуванні робочих концентрацій розчину необхідно використовувати гумові рукавиці. Робочий 1 % розчин Ензидезу в свою чергу не спричиняв подразнюючої дії. При дослідженні шкіроно-резорбтивної дії деззасобу «Ензидез» встановлено, що нативний засіб спричиняє почервоніння та гіперемію шкіри хвостів тварин, водночас зміни в кількості рідини не відмічали. Робочий 1 % розчин не спричиняв подразнення та резорбтивної дії. Отже, робочі розчини та нативний засіб «Ензидез» не спричиняє резорбтивної дії через шкіру. До того ж виявлено, що нативний розчин дезінфектанту спричиняв шкідливий вплив у 9 балів на слизову оболонку очей, а робочий − 1 % розчин не викликав

видимих змін слизової оболонки. Тому під час роботи із нативним деззасобом «Ензидез» необхідно використовувати засоби для захисту очей – окуляри. Водночас, під час досліджень з визначення коефіцієнта кумуляції виявлено, що він становив 1,4 од, це вказує на те, що деззасіб не здатний до кумуляції, або вона незначна [13, 63, 76].

При дослідженні морфологічних і біохімічних показників крові дослідних тварин за введення їм 1 % розчину деззасобу «Ензидез», встановлено, що морфологічні показники були в межах допустимих значень, але у контрольній групі відмічали на 20 % збільшення кількості лейкоцитів, та зростання в 1,5 раза еозинофілів, що вказує на алергічну реакцію на препарат. Біохімічні показники крові у дослідній групі також дещо відрізнялися від контрольної, проте зміни не виходили за фізіологічні параметри. Отже, отримані результати вказують, що розчини Ензидезу до 1 % концентрації є нетоксичними, безпечними та суттєво не порушують метаболітичні процеси в організмі дослідних тварин.

Виробничу ефективність деззасобу Ензидез визначали за різних концентрацій застосування у клініках ветеринарної медицини. Адже саме від ефективності деззасобів у реальних практичних умовах щодо клінічних штамів мікроорганізмів залежить його широке виробниче впровадження [115, 149]. Ефективність дезінфекції засобом «Ензидез» в концентрації 0,25 – 1,00% стін, підлоги, столів у ветеринарних клініках, за їх різного мікробного та органічного забруднення становила 100 %. Тільки в одному випадку з поверхонь підлоги після дезінфекції 0,25 % розчином виділяли мікроорганізми, кількість яких становила $3,8\pm0,1\times10^1$ КУО/см^3 змиву. Проте, навіть за такого режиму ефективність дезінфекції становила 99,99 %. Ефективність дезінфекції Ензидезом під час достерилізаційного очищення хірургічних інструментів та виробів ветеринарного призначення виявила, що основна мікрофлора до обробки була представлена стафілококами, мікрококами, коринебактеріями, стрептококами, дріжджами, БГКП в кількості від 10^3 до 10^5 КУО/см^3 змиву. Після обробки у концентрації від 0,25

до 1,00 % деззасобом забезпечувався бактерицидний ефект, як наслідок мікроорганізмів з поверхонь не виділяли в жодному випадку. Тому ми вважаємо, що розроблений засіб для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації у клініках ветеринарної медицини «Ензидез» є високоефектиним дезінфіктантом для застосування у концентрації 0,25 – 1,0 % та експозиції розчинів 15 – 30 хв.

Отже, підсумовуючи результати експериментальних досліджень та аналізу літературних даних, ми стверджуємо, що поставлена мета дисертаційного дослідження експериментально обґрунтувати та розробити дезінфікуючий засіб на основі ЧАС, похідних біогуанідину та протеолітичних і гліколітичних ензимів активного щодо бактерій у біоплівках та органічного забруднення, для застосування у клініках ветеринарної медицини нами повністю виконана.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі на основі теоретичного аналізу та експериментальних досліджень розроблено дезінфікуючий засіб «Ензидез» активний за органічного забруднення на бактерії у біоплівках. Визначено його антимікробні, фізико-хімічні властивості та проведено токсикологічні і виробничі дослідження. Розроблено режими застосування деззасобу для дезінфекції і достерилізаційного очищення та стерилізації у клініках ветеринарної медицини.

1. Виявлено, що бактерії у біоплівках витримували мінімальну бактерицидну концентрацію вантоцилу і катаміну, яка була встановлена на планктонних їх формах. З одного $см^3$ змиву з біоплівки після впливу вантоцилу виділяли від $1,9\times10^3$ до $4,3\times10^3$ мікробних клітин, а після обробки катаміном – від $5,6\times10^3$ до $1,7\times10^4$. Водночас, після обробки біоплівок біоцидами разом з ензимами спостерігали зменшення кількості клітин *S. aureus, E. coli* і *P. aeruginosa,* в середньому на два порядки – до $5,1\times10^1$ КУО/мл, порівнюючи з обробкою тільки біоцидами.

2. На основі дослідження ЧАС, похідних бігуанідину, сумісності та активності протеолітичних та гліколітичних ензимів розроблено дезінфікуючий засіб «Ензидез», який містить наступні діючі речовини: Катамін АБ – розчин з вмістом 49 − 51 % алкілдиметилбензиламмоній хлориду – 8,0 − 12,0 %; Вантоцил TG – 20 % водний розчин полігексаметиленбігуанідину гідрохлориду – 1,0 − 2,0 %; інгібітор корозії та комплексони – 4,5 %; протеолітичний ензим – *Everlase 16 L* та амілолітичний ензим – *Termamyl 300 L* у кількості 0,5 − 0,75 % та дистильовану воду – 81,25−86,50 %.

3. Встановлено, що розроблений дезінфікуючий засіб «Ензидез» є високоактивним відносно тест-культур мікроорганізмів. Мінімальне бактерицидне розведення деззасобу за експозиції 15 хв відносно *S. aureus* становило 1:1466,3 (0,0691 % за препаратом), а за 30 хв – 1:2834,7 (0,0352 %).

E. coli і *P. aeruginosa* виявилися більш чутливі до дії дезінфікуючого засобу «Ензидез», порівняно з *S. aureus.* Зокрема, мінімальне бактерицидне розведення деззасобу відносно *E. coli* за експозиції 15 хв становило 1:2834,7 (0,0352 % за препаратом), а відносно *P. aeruginosa* – в 1,9 раза ($p < 0,05$) нижче, порівняно з розведенням відносно *E. coli.*

4. Встановлено, що для знищення бактерійної (*S. aureus, E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis)* і грибкової (*Candida spp.)* мікрофлори на поверхні нержавіючої сталі та у глибині кахелю необхідно, щоб робоча концентрація Ензидезу була не нижче 0,1 % та експозиція менше 15 хв.

5. Встановлено, що дезінфікуючий засіб «Ензидез» проявляє добру ефективність щодо руйнування біоплівки музейних штамів *S. aureus, E. coli і P. aeruginosa.* Зокрема, за концентрації 0,5 % та температури розчинів + 20 ± 1°С і експозиції 15 хв оптична густина промивних розчинів з біоплівок зменшувалася з 1,98 – 2,04 од. до 0,24 – 0,20 од. і вони вважалися низької щільності. З підвищенням температури розчинів деззасобу з + 20 до + 60 °С відбувається повна деградація біоплівок, сформованих *S. aureus, E. coli і P. aeruginosa.*

6. Дезінфікуючий засіб «Ензидез» добре розчинний у воді, має pH 0,25 – 1,0 % розчинів у межах 8,4 – 8,0 од. За температури розчинів + 20 ± 1 °С має поверхневий натяг не вище 37,63 ± 0,50 мН/м та краєвий кут змочування 69,5 ± 0,7 град. За корозійною активністю щодо оцинкованої і нержавіючої сталі «Ензидез» вважається слабо корозійноактивним, величина корозії в сотні разів нижча допустимої нормативної межі. Протеолітична активність дезінфектанта становила 41,3 ± 0,4 % за 0,5 % концентрації та температури розчину + 20 °С і експозиції 15 хв. Збільшення температури розчину до + 60 °С та експозиції 30 хв забезпечувало зростання протеолітичної активності до 70 %.

7. Встановлено, що 1 % розчин деззасобу «Ензидез» належить до малотоксичних речовин (LD_{50} більша 5000 мг/кг маси тіла – 4 клас), не спричиняє подразнюючої та шкірно-резорбтивної дії, не викликає видимих

змін слизової оболонки очей кроликів, концентрований засіб має слабовиражену кумулятивну дію (коефіцієнт 1,4 од). Морфологічні дослідження периферичної крові та біохімічні сироватки мишей за внутрішньошлункового введення робочої концентрації розчину дезінфектанту через 12 діб спостереження не виявили значних змін, які б виходили за фізіологічні величини.

8. Дезінфікуючий засіб «Ензидез» виявився слаботоксичним щодо клітин паспортизованого штаму *Tetrachymena pyriformis* у 0,5 % концентрації протягом 30 хв впливу за температури розчинів + 20 °С та протягом 15 хв впливу за температури розчинів + 30 °С.

9. Дезінфектант «Ензидез» застосовують для дезінфекції кахельних стін і столів у 0,25 % концентрації, а для повного знищення мікроорганізмів на підлозі використовують 0,25 – 0,5 % концентрацію протягом 15 хв експозиції. Для проведення достерилізаційного очищення та стерилізації інструментів, обладнання чи виробів ветеринарного призначення у клініках ветеринарної медицини використовують 0,25 % розчин Ензидезу за температури від + 20 до + 60 °С і експозиції 15 хв.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Деззасіб «Ензидез» рекомендується використовувати в клініках ветеринарної медицини для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації об’єктів (стіни, підлога, столи, тощо) та усіх видів виробів, інструментів та обладнання ветеринарного призначення. Необхідно використовувати наступні режими: за умови змочування, протирання, занурення концентрація деззасобу 0,25 – 0,5 %, температура розчину + 20 − + 60 °С, експозиція 15 – 30 хв, за умови аерозольної дезінфекції (зрошування) витрати розчину 50 $см^3/м^2$ площі. (Дезінфікуючий засіб «Ензидез» ТУ У 21.2–22769675–002:2022).

2. Результати дисертаційного дослідження пропонується до впровадження у навчальний процес з підготовки магістрів за спеціальностями 211 – «Ветеринарна медицина» та 212 – «Ветеринарна гігієна та санітарія», із дисциплін: ветеринарна мікробіологія, фармакологія, ветеринарна санітарія, ветеринарна хірургія, тощо.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ЛІТЕРАТУРИ

1. Аналіз ринку дезінфікуючих засобів в Україні / О. І. Касяненко та ін. *Науково – технічний бюлетень Інституту біології тварин і ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок.* 2019. № 20. С. 439–445.

2. Бабайкін В., Василенко П. Дезінфекція з використанням аерозолей важлива ланка у профілактиці та ліквідації захворювання тварин. *Ветеринарна медицина України*. 2000. № 2. С. 4-8.

3. Бактерицидна активність мийно-дезінфікуючого засобу Сан-актив на тест-об'єктах відносно *E. coli* та *S. aureus* / В. З. Салата та ін. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини*. 2015. Вип. 31, №2. С. 245–248.

4. Березовський А. В., Фотіна Т. І., Фотіна Г. А.. Застосування новітніх засобів і методів санації об'єктів птахівництва та контроль їх ефективності: методичні рекомендації. Суми, 2007. 9 с.

5. Березовський А.В., Фотіна Т.А. Визначення параметрів токсичності нового дезінфектанту Бровадез плюс / *Науково-технічний бюлетень ІБТ УААН і ДНДКІ ветеринарних препаратів та кормових добавок*. 2007. Вип. 8. № 3–4. С. 326–330.

6. Верхолюк М. Аналіз засобів для миття і дезінфекції доїльного обладнання, яке використовуються в Україні. *Стан і перспективи харчової науки та промисловості*: збірник тез доповідей V міжнародної науково-технічної конференції, 10-11 жовтня 2019 р. Тернопіль: ТНТУ, 2019. С. 41–42.

7. Визначення віруліцидних властивостей нового біоциду «ДезСан» / О. Л. Нечипоренко та ін. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького*. 2019. Вип. 21. № 96. С. 81–85.

8. Вплив мийно-дезінфікуючого засобу «Аргомол» на організм лабораторних тварин (доклінічні дослідження)/ Д. А. Засєкін та ін. *Науковий*

вісник НУБіП України. Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва. 2018. № 285. С. 84–89.

9. Вплив дезінфікуючого засобу «Ензидез» на тест-об'єкти контаміновані мікроорганізмами / М. Кухтин та ін. *Аграрний вісник Причорномор'я*. 2022. С. 102–103.

10. Гаркавенко Т. О. Методичні рекомендації щодо контролю санітарного стану виробництва, реалізації та якості дезінфекції, які підлягають ветеринарному нагляду: методичні рекомендації. К., 2016. 38 с.

11. ГОСТ 12.1.007-76. ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. [Введ. 1977–01–01; Изменен № 1; Переиздан 01.12.81]. – М.: Изд-во стандартов, 1982. – 6 с. – (Государственный стандарт Союза ССР).

12. Гунчак В.М., Солтис М.П., Гутий Б.В. Спосіб передінкубаційної обробки яєць: патент на корисну модель №144831 Україна. Заявник і патентовласник Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. опубл. 26.10. 2020,бюл. №20.

13. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / І. Я. Коцюмбас, О. Е. Малик, І. П. Патерега та ін. Львів.: Тріада плюс, 2006. 360 с.

14. Дослідження ефективності дезінфекції у тваринницьких приміщеннях препаратом на основі ефірних олій. / В.Л. Коваленко та ін. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. 2018. Вип 10, № 45. С. 109–113.

15. Дослідження противірусного та токсичного впливу дезінфектанту Оргасепт на культурах клітин СНЕВ, ПТП / В.Л. Коваленко та ін. *Ветеринарна біотехнологія*. 2018. № 32. С. 181–189.

16. Дослідження бактерицидної дії мийно-дезінфікуючого засобу «Аргомол» щодо мікробних тест-культур / Д. А. Засєкін та ін. *Науковий вісник Національного університету біоресурсів і природокористування України*. *Серія: Ветеринарна медицина, якість і безпека продукції тваринництва*. 2017. Вип. 265. С. 117–122.

17. Дослідження бактерицидної дії катаміну аб залежно від значення pH розчинів / V. A. Kozhyn et al. *Podilian Bulletin: Agriculture, Engineering, Economics*. 2021. №34 С. 166–174.

18. Дослідження токсичного впливу дезінфікуючого засобу «Ензидез» на клітини інфузорій / V. A. Kozhyn et al. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*. 2021. Вип. 9, №4. С. 191–194.

19. ДСТУ ISO 4833:2006 Мікробіологія харчових продуктів і кормів для тварин. Горизонтальний метод підрахунку мікроорганізмів. Техніка підрахування колоній за температури 30 °С (ISO 4833:2003, IDT). [Чинний від 01.10.2007]. К.: Держспоживстандарт України. 2007. С. 18.

20. Ензими для рідких засобів [Электронный ресурс]: Режим доступа: *https://biakhim.com.ua/produkty/novozymes*

21. Ефективність сучасних дезінфікувальних і мийно-дезінфікувальних засобів для санітарної обробки молочного обладнання / М. Д. Кухтин та ін. *Вісник аграрної науки*. 2020. Вип 98, №5. С. 77–82.

22. Загальні вимоги до засобів, які використовують для санітарної обробки доїльного устаткування та молочного інвентаря / Я. Й. Крижанівський та ін. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Ґжицького*. 2012. №14. С. 161–164.

23. Засєкін Д. А., Пушкова А. Г., Димко Р. О. Морфологічні дослідження крові мишей за впливу мийно-дезінфікуючого засобу «Аргомол». *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування*. 2020. Вип. 6. С. 27–30.

24. Застосування засобу «Біомой» з метою достерилізаційного очищення виробів медичного призначення: методичні вказівки. Центральна санітарно-епідеміологічна станція МОЗ України за участю НВ ТОВ «Фармакос», 2009. 14 с.

25. Касяненко О. І., Нагорна Л. В., Касяненко С. М. Ефективність застосування мийно-дезінфікуючого засобу «Сандез» для дезінфекції

пташників. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія Ветеринарна медицина.* 2020. Вип 4, № 49. С. 16–23.

26. Коваленко В. Л., Недосєков В. В. Концепція розробки та використання комплексних дезінфектантів для ветеринарної медицини: монографія. К., 2011. 146 с.

27. Коваленко В. Л. Загальні методи профілактики шляхом застосування комплексних дезінфікуючих засобів: науковий посібник. К., 2017. 408 с.

28. Коваленко В.Л. Сучасні дезінфектанти на контроль біобезпеки. *Ветеринарна біотехнологія.* 2012. № 21. С. 61–71.

29. Коваленко В. Л., Недосєков В. В. Методичні підходи щодо контролю дезінфікуючих засобів для ветеринарної медицини: монографія. К., 2011. 224 с.

30. Коваленко В. Л., Гаркавенко Т.О., Горбатюк О. І., Козицька Т. Г., Гаркавенко В. М., Ординська Д. О. Визначення бактерицидної активності та контролю відсутності бактеріостатичного ефекту дезінфікуючих засобів: методичні рекомендації. К., 2019. 28 с.

31. Коваленко, В. Л., Лясота, В. П., Балацький, Ю. О., & Пономаренко, Г. В. Визначення токсичності дезінфікуючого препарату Геоцид з використанням інфузорії Tetrachymena pyriformis. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини.* 2014. Вип. 29 №2, 262-265.

32. Коваленко В.Л., Гаркавенко В.М. Експериментальний підбір безпечних та ефективних концентрацій дезінфікуючого засобу щодо вірусу міксоматозу кролів. «*Вісник БНАУ*». 2018. Вип.1, №137. С. 56–59.

33. Коваленко В. Л., Засєкін Д. А. Розробка і контроль дезінфікуючого засобу: монографія. К., 2013. 166 с.

34. Ковальчук В. П., Кондратюк В. М., Трофіменко Ю. Ю. Результати порівняльного дослідження чутливості до антисептиків плівкових та планктонних форм бактерій. *Biomedical and biosocial anthropology*. 2014. Вип. 22. С. 92–95.

35. Кожин В.А., Горюк В.В., Кухтин М. Д. Вплив якості води на ефективність миття і дезінфекції. *Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти: Міжнародна науково-технічна конференція, м.* Тернопіль, 20–21 травня 2021 року: тези доповіді. Тернопіль, 2021. С. 63.

36. Кожин В. А. Бактерицидні властивості дезінфікуючого засобу «Ензидез». *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування*. 2021. №8. С. 27–33.

37. Кожин В. А., Кухтин М. Д., Горюк В. В. Застосування дезінфікуючого засобу «Ензидез»: методичні рекомендації. Кам'янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 2022. 19 с.

38. Кожин В.А., Кухтин М.Д., Болтик Н.П. Вплив біоцидів та ензимів на мікробні біоплівки. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин.* 2021. С. 13–14.

39. Коцюмбас І. Я., Веліченко О. Б., Коцюмбас Г. І. Перспективи застосування гіпохлоритів у ветеринарній медицині. Львів. 2009. – 312 с.

40. Кравченюк Х. Ю., Кухтин М. Д. Формування біоплівок на нержавіючій сталі AISI 321, залежно від шорсткості поверхні та початкової кількості E. coli. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Ґжицького*. 2017. Вип. 19, № 75. С. 144–148.

41. Кравченюк Х. Ю. Характеристика процесу плівко утворення Enterococcus faecalis на нержавіючій сталі AISI 321 залежно від шорсткості поверхні. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Ґжицького*. 2018. Т. 20, № 90. С. 58–62.

42. Кравченюк Х. Ю., Лазарюк В. В., Кухтин М. Д. Вплив шорсткості поверхні нержавіючої сталі AISI 321 на адгезію і процес формування біоплівки *E.coli. Інноваційні аспекти розвитку обладнання харчової і готельної індустрії в умовах сучасності.* 2017. С. 63–64.

43. Кривохижа Є.М., Кухтин М.Д., Карпенко М.М. Порівняльна характеристика засобів для санітарної обробки технологічного устаткування молокопереробних підприємств. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького*. 2014. Т.16, №3 (60). Ч.3. С. 321–327.

44. Крушельницька Н. В. Вплив санітарної обробки доїльного устаткування та технології доїння корів на гігієнічну якість молока : автореф. дис. … канд. вет. наук: 16.00.06/СНАУ. Суми, 2014. 20 с.

45. Курагіна Н. В., Ануріна О. В., Скляр Т. В. Дослідження протимікробної активності дезінфікуючих препаратів по відношенню до бактеріальних асоціацій. *Вірусологія. Мікробіологія. Паразитологія*. 2018. Вип. 34. С. 1–10.

46. Кухтин М. Д.,. Коваленко В. Л, Гаркавенко Т. О., Салата В. З., Горбатюк О. І., Козицька Т. Г., Болтик Н. П., Климик В. Т., Рущинська Т. М., Горюк Ю. В. Визначення бактерицидної активності дезінфікуючих засобів на бактеріях у біоплівках: методичні рекомендації. К., 2020. 21 с.

47. Кухтин М. Д., Касянчук В.В. Контамінація доїльного устаткування і молока сирого бактеріями роду *Pseudomonas* в залежності від ефективності санітарної обробки. *Вісник Сумського національного аграрного університету*. 2010. № 8. С. 56–59.

48. Кухтин М. Д., Перкій Ю. Б. Спосіб визначення бактерицидної концентрації мийно-дезінфікуючих засобів до мікроорганізмів у біоплівках: патент на корисну модель №63101 Україна. C12Q 1/22 (2006.01). Заявник і патентовласник Тернопільська дослідна станція ІВМ УААН. № № u201102967; заявлено 14.03.2011. опубліковано 26.09.2011, бюл. № 18.

49. Кухтин М.Д., Перкій Ю.Б., Крушельницька Н.В. Формування мікробних біолівок на поверхнях різних матеріалів мікроорганізмами, які виділені з технологічного устаткування. *Ветеринарна біотехнологія*. 2013. Вип. 22. С. 292–297.

50. Кухтин М. Д, Перкій Ю.Б., Крушельницька Н. В. Формування змішаних біоплівок мікроорганізмами, які виділені з доїльного устаткування та молока сирого. *Ветеринарна наука: міжвідомчий тематичний науковий збірник.* 2013. № 97. С. 442–443.

51. Кухтин М. Д., Перкій Ю. Б., Крушельницька Н. В., Кривохижа Є. М. Спосіб руйнування мікробних біоплівок на молочному технологічному устаткуванні розчинами ензимів: патент на корисну модель № 2013 06961 Україна. A23C 1/00. Заявник і патентовласник Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя. u201306961; заявлено 03.06.2013; опубліковано 11.11.2013, Бюл. № 21.

52. Лабораторні дослідження дослідних варіантів кислотного мийно-дезінфікуючого засобу для санітарної обробки доїльного устаткування / С. В. Лайтер-Москалюк та ін. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина».* 2016. Вип. 6, №38. С. 38 − 42.

53. Лайтер-Москалюк С. В. Розробка режимів санітарної обробки молочного посуду та доїльного обладнання кислотним мийно-дезінфікуючим засобом «ТДС». *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини.* 2016. Вип. 32. Ч.2. С. 261−265.

54. Лясота В.П., Соколова Л.М. Дезінфекційні засоби, сучасна характеристика та безпечність при застосуванні у тваринництві / *Науковий вісник ветеринарної медицини: збірник наукових праць.* БНАУ. 2018. №2. С. 87–99. DOI: https://doi:10.33245/2310-4902-2018-144-2-87-99

55. Мандигра М. С., Лисиця А. В., Воловик Г. П., Мандигра Ю. М., & Бойко О. П. Дезінфекція і довкілля. *Ветеринарна біотехнологія*. 2018. Вип. 32. №2. 355-364.

56. Марієвський В. Ф., Бубало В. О. Визначення чутливості сальмонел в біоплівках до дії хімічних дезінфектантів. *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії*. 2013. №13. С. 133–136.

57. Медична мікробіологія, вірусологія, імунологія / В.П. Широбоков та ін. Вінниця. Нова Книга. 2017. 951 с.

58. Методи вивчення динаміки формування біоплівок умовно-патогенними бактеріями / О. Сідашенко та ін. *Вісник Львівського університету*. 2014. №65. С. 20–33.

59. Нечипоренко О. Л., Березовський А. В., Фотіна Т. І, Петров Р. В. Дослідження корозійної активності та піноутворюючих властивостей біоциду «ДезСан». *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Ґжицького*. 2019. № 21. С. 88−92.

60. Определитель бактерий Берджи / Дж. Хоулта. и др. перевод с англ. под ред. академ. РАН Г.А. Заварзина. 9 изд. в 2 Т. М.: Мир. 1997. С. 799.

61. Палій Г. К., Ковальчук В. П., & Фоміна Н. С. Характеристика сучасного арсеналу дезінфекційних засобів та проблеми дезінфектології. *Biomedical and biosocial anthropology.* 2014. Вип. 22. 82-85.

62. Патоморфологічні зміни в організмі білих мишей за впливу різних доз дезінфікуючого засобу «Унівайт» / Д. Засекін, Р. Димко, Ю. Сердюков, В. Коваленко. *Наукові доповіді НУБіП України.* 2016. № 3. С. 60. DOI: https://doi.org/10.31548/dopovidi2016.03.016.

63. Перкій Ю. Б., Крижанівський Я. Й., Кривохижа Є. М., Моткалюк Н. Ф., Кухтин М. Д. Оцінка придатності та ефективності мийних, дезінфікуючих і мийно-дезінфікуючих засобів для санітарної обробки доїльного устаткування та молочного інвентаря: методичні рекомендації. Тернопіль, 2012. 67 с.

64. Покас О.В., Поліщук О. І., Тодосійчук Т.С. Дія ферментного препарату «Циторецифен-М» на здатність утворення біоплівок штамами Pseudomonas aeruginosa. *Профілактична медицина*. 2011. Вип. 2, №14. С. 81–85.

65. Покас О. В. Вивчення дії препаратів з наночастинками на здатність до утворення біоплівок штамами *Pseudomonas aeruginosa*. *Профілактична медицина*. 2012. Вип. 1. С. 37–42.

66. Порівняльна характеристика засобів для санітарної обробки технологічного устаткування молокопереробних підприємств / Є. М. Кривохижа, М. Д. Кухтин, М. М. Карпенко. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Ґжицького*. 2014. Вип.3, № 3. С. 321–326.

67. Проскудіна Н.О. Сучасні дезінфектанти: плюси і мінуси. *Сучасне птахівництво.* 2016. Вип. 4, № 161. С. 16–22.

68. Розробка режимів санітарної обробки доїльного устаткування кислотним засобом «ТДС» / С. В. Лайтер-Москалюк. та ін. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С. З. Гжицького*. 2016. Т.18, №1(65). Ч.2. С. 188 − 192.

69. Салата В.З., Кухтин М.Д., Перкій Ю.Б., Супрович Т.М. Бактерицидна активність мийно – дезинфікуючого засобу «Сан-актив» на тест об`єктах відносно E. coli ta S. aureus. *Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини.* 2015. № 31. С. 245–248.

70. Салата В.З. Фізико-хімічні властивості мийно-дезінфікуючого засобу «Сан-актив» для санітарної обробки на підприємствах м’ясної промисловості. *Вісник Житомирського національного агроекологічного університету «Ветеринарна медицина».* 2015. Вип. 1 № 49. С. 272–277.

71. Салата В.З. Деякі мікробіологічні дослідження мийно-дезінфікуючого засобу «Сан-актив» для санітарної обробки на м’ясопереробних підприємствах. *Вісник Сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина».* 2016. Вип.6. № 38, 57–61.

72. Салата В.З. (2016). Токсикологічні дослідження мийно-дезінфікуючого засобу «Сан-актив» для санітарної обробки технологічного обладнання на м’ясопереробних підприємствах галузі. *Науковий вісник*

Львівського національного університету ветеринарної медицини і біотехнологій імені С.З. Ґжицького. 2016. Вип. 18. № 1 (65), 142–148.

73. Санітарний стан пташників в період технологічних перерв утримання птиці / О.І. Касяненко та ін. *«Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини».* 2018. № 35. С. 124–145.

74. Санітарія і гігієна на підприємствах з виробництва та переробки молока й молочних продуктів / М. В. Чорний, Н. М. Наливайская, В.А. Пасічник, Т.М. Рижкова. Київ. ІПДО НУХТ, 2010. 284 с.

75. Семанюк Н. В. Лікування собак за хронічного катарального гінгівіту. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. Ґжицького*. 2014. № 3. С. 306–311.

76. Солтис М. П. Фармако-токсикологічна характеристика та антибактеріальна дія препарату на основі гіпохлориту натрію: дис. … на здобуття освітньо-наукового рівня доктора філософії за напрямом підготовки 21 – «ветеринарна медицина», спеціальність 211 – «ветеринарна медицина». Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Ґжицького, Міністерства освіти і науки України, Львів, 2021. 175 с.

77. Спосіб визначення мийних властивостей мийних і мийно-дезінфікуючих засобів для санітарної обробки технологічного обладнання у м'ясній промисловості : пат. 112503. № u 2016 04544 ; заявл. 25.04.2016 ; опубл. 26.12.2016, Бюл. № 24.

78. Спосіб визначення протиадгезивних властивостей харчової сталі за показником щільності мікробної біоплівки шт. Staphylococus aureus ATCC 25. Х. Ю. Кравченюк та ін. Патент України №201710506; заявлено 30.10.17; опубліковано 26.03.18; Бюл. № 6. С. 4.

79. Сучасні засоби ветеринарної дезінфекції / О. І. Сергієнко та ін. *Ветеринарна медицина України*. 2010. №1. С. 36–38.

80. Сучасні погляди на санітарну обробку технологічного устаткування у харчовій промисловості / М. Кухтин та ін. *Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені СЗ Ґжицького*. 2012. №14. Р. 302–307.

81. ТУ У 20.2-364223868-003:2012. Засіб дезінфікуючий «Бланідас Актив Ензим». К., 2012. 25 с.

82. Чечет, О. М., Коваленко, В. Л., & Гайдей, О. С. Доклінічні випробування препарату «Біомагн» на лабораторних тваринах та з використанням культури Tetrahymena pyriformis. *Medical and Clinical Chemistry.* 2021. №3. С. 48-56.

83. Шинкарук О. Ю. Характеристика мийного засобу «Ензимий» за здатністю руйнування мікробних біоплівок. *Вісник Національного університету «Львівська політехніка»*. 2018. №886. С. 158–162.

84. Шинкарук О. Ю., Кухтин М. Д. Вплив мийного засобу ензимий на мікробні біоплівки Enterococcus faecalis ta Escherichia coli. *Вісник Житомирського національного агроекологічного університету*. 2017. №1. С. 153–160.

85. Шинкарук О. Ю., Кухтин М. Д., Покотило О. С. Фізико-хімічні властивості дослідного варіанту рідкого ензимного мийного засобу для санітарної обробки устаткування у молочній промисловості. *Вісник Херсонського національного технічного університету.* 2016. №1. С. 136–140.

86. Шинкарук О. Ю., Кухтин М. Д., Кравченюк Х. Ю. Рідкий ензимний мийний засіб «Ензимий»: деклараційний патент на корисну модель № 109856 Україна. A23C 7/00, B08B 3/08(2006.01). Заявник і патентовласник Шинкарук О. Ю., Кухтин М. Д., Кравченюк Х. Ю. № u201602651; заявлено 17.03.16; опубліковано 12.09.16; Бюл. № 17. 3 с.

87. Якубчак О.М., Хоменко В.І., Коваленко В.Л. Рекомендації щодо санітарно – мікробіологічного дослідження змивів з поверхонь тест об`єктів та об`єктів ветеринарного нагляду і контролю: методичні рекомендації. К., 2005. 18 с.

88. Якубчак О. М. Ветеринарна дезінфекція: інструкція та методичні рекомендації. «Компанія Біопром», 2010. 152 с.

89. 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, no. 1. P. 10–16. DOI: https://doi.org/10.32718/ujvas1-1.02

90. Activity of a dry mist-generated hydrogen peroxide disinfection system against methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Acinetobacter baumannii / N. Piskin et al. *American Journal of Infection Control*. 2011. Vol. 39, no. 9. P. 757–762. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ajic.2010.12.003

91. Activity of disinfecting biocides and enzymes of proteases and amylases on bacteria in biofilms / M. Kukhtyn et al. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*. 2021. Vol. 27, no. 4. P. 495–502. DOI: https://doi.org/10.9775/kvfd.2021.25770

92. Acute toxicity studies, antioxidant and in vitro antibacterial activities of extract from the barks of Ricinodendron heudoletti (Euphorbiaceae) / V. A. Oyono et al. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 2014. Vol. 6, no. 4. P. 47–53. DOI: https://doi.org/10.5897/jpp2014.0312

93. An evaluation of disinfectants for the sanitation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-contaminated transport vehicles at cold temperatures / S. Dee et al. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2005. Vol. 69, no 1. P. 64– 70.

94. Analgesic effectiveness of new nanosilver drug / A.M. Kovalenko et al. *Ukrainian Journal of Ecolog.* 2020. Vol.10, no 1. P. 300–306. DOI: https://doi.org/10.15421/2020_47

95. Anin-vitroinvestigation into the efficacy of disinfectants used in the duck industry against Salmonella / R. J. Gosling et al. *Avian Pathology*. 2016. Vol. 45, no. 5. P. 576–581. DOI: https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1188369

96. Antibacterial effect of vegetable essential oils based on metal nanoparticles in vitro / V. L. Kovalenko et al. *Journal for veterinary medicine, biotechnology and biosafety*. 2017. Vol. 3. P. 34–36.

97. Antimicrobial resistance to disinfectants in biofilms / P. Araújo et al. *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances.* 2011. P. 826–834.

98. Antimicrobial testing methods & procedures developed by EPA's microbiology laboratory / EPA. Retrieved from U.S. Environmental Protection Agency website: DOI: https://www.epa.gov/pesticideanalyticalmethods/antimicrobialtestingmethodsproceduresdevelopedepasmicrobiology

99. Assessment of the anti-Salmonellaactivity of commercial formulations of organic acid products / A. Wales et al. *Avian Pathology*. 2013. Vol. 42, no. 3. P. 268–275. DOI: https://doi.org/10.1080/03079457.2013.782097

100. Assessment of disinfectant performance in chicken cages using co-liphages / S. L. Fankem et al. *Food and Environmental Virology*, 2009 Vol. 1, no 3-4. P. 155–160.

101. Assessment of the efficacy of disinfectants on surfaces / B. van Klingeren et al. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1998. Vol. 41, no. 3-4. P. 289–296. DOI: https://doi.org/10.1016/s0964-8305(98)00020-1

102. Augustin M., Ali-Vehmas T., Atroshi F. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. *Journal of pharmacy and pharmaceutical science.* 2004. №7 С. 55–64

103. Bacterial biofilms removal using fungal enzymes / B. Orgaz et al. *Enz. Microb. Technol.* 2006. Vol. 40, no. 1. P. 51−56.

104. Behavior of Foodborne Pathogens Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus in Mixed-Species Biofilms Exposed to Biocides / V. Oxaran et al. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018. Vol. 84, no. 24. P. 18−38. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.02038-18

105. Berchieri A., Barrow P. A. The antibacterial effects for Salmonella Enteritidis phage type 4 of different chemical disinfectants and cleaning agents tested under different conditions. *Avian Pathology*. 1996. Vol. 25, no. 4. P. 663–673. DOI: https://doi.org/10.1080/03079459608419173

106. Berry D., Xi C., Raskin L. Microbial ecology of drinking water distribution systems. *Current Opinion in Biotechnology*. 2006. Vol. 17, no. 3. P. 297–302. DOI: https://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.05.007

107. Bessems E. The effect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1998. Vol. 41, no. 3-4. P. 177–183. DOI: https://doi.org/10.1016/s0964-8305(98)00022-5

108. Biocide tolerance in bacteria / T. Morente et al. *International Journal of Food Microbiology.* 2013 Vol. 162(1), P. 13–25. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.028

109. Biofilm control strategies based on enzymatic disruption of the extracellular polymeric substance matrix a modeling study / J.B. Xavier et al. *Microbiol*. 2005. Vol. 51, no. 1. P. 3817−3832.

110. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments / M. Abdallah et al. *Archives of Microbiology*. 2014. Vol. 196, no. 7. P. 453–472. DOI: https://doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1.

111. Biofilm formation in bovine mastitis pathogens and the effect on them of antimicrobial drugs / Y. Horiuk et al. *Independent Journal of Management & Production*. 2019. Vol. 10, no. 7. P. 897. DOI: https://doi.org/10.14807/ijmp.v10i7.1012.

112. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety / S. Marchand et al. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2012. Vol. 11, no. 2. P. 133–147. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x

113. Böhm R. Disinfection and hygiene in the veterinary field and disinfection of animal houses and transport vehicles. *International*

Biodeterioration & Biodegradation. 1998. Vol. 41, no. 3-4. P. 217–224. DOI: https://doi.org/10.1016/s0964-8305(98)00030-4

114. Buckingham-Meyer K., Goeres D. M., Hamilton M. A. Comparative evaluation of biofilm disinfectant efficacy tests. *Journal of Microbiological Methods*. 2007. Vol. 70, no. 2. P. 236–244. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.010

115. Changes in lipid composition of Escherichia coli and Staphylococcus areus cells under the influence of disinfectants Barez®, Biochlor® and Geocide® / V. L. Kovalenko et al. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018. Vol. 8, no. 1. P. 547–550. DOI: https://doi.org/10.15421/2018_248

116. Characteristics of antibiotic sensitivity of Staphylococcus aureus isolated from dairy farms in Ukraine / O. M. Berhilevych et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017. Vol. 8, no. 4. P. 559–563. DOI: https://doi.org/10.15421/021786

117. 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, no. 1. P. 1847–1856.

118. Chmielewski R. A., Frank J. F. Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2003. Vol. 2, no. 1. P. 22–32. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x

119. Choice of sterilizing/disinfecting agent: determination of the Decimal ReductionTime (D-Value) / P. G. Mazzola et al. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009. Vol. 45, no. 4. P. 701–708. DOI: https://doi.org/10.1590/s1984-82502009000400013

120. Comparison of the minimum bactericidal concentration of antibiotics on planktonic and biofilm forms of Staphylococcus aureus: Mastitis causative agents / Y. V. Horiuk et al. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2018. Vol. 9, no 6. P. 616–622.

121. Comparison of sampling procedures and microbiological and non-microbiological parameters to evaluate cleaning and disinfection in broiler houses / K. Luyckx et al. *Poultry Science*. 2015. Vol. 94, no. 4. P. 740–749. DOI: https://doi.org/10.3382/ps/pev019

122. Comparison of the Efficacy of a Hydrogen Peroxide Dry-Mist Disinfection System and Sodium Hypochlorite Solution for Eradication of Clostridium difficile Spores / F. Barbut et al. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2009. Vol. 30, no. 6. P. 507–514. DOI: https://doi.org/10.1086/597232

123. Comparative testing of disinfectants using proposed European surface test methods / S. F. Bloomfield et al. *Letters in Applied Microbiology*. 1993. Vol. 17, no. 3. P. 119–125. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1993.tb01439.x

124. Connor J. T. O., Clegg T. A., More S. J. Efficacy of washing and disinfection in cattle markets in Ireland. *Irish Veterinary Journal*. 2017. Vol. 70, no. 1. DOI: https://doi.org/10.1186/s13620-017-0081-1

125. Contamination of milk with Bacillus cereus by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping / V. C. Salustiano et al. *Food Control*. 2009. Vol. 20, no. 4. P. 439–442. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.07.004

126. Corte, L., Casagrande Pierantoni, D., Tascini, C., Roscini, L., & Cardinali, G. Biofilm specific activity: a measure to quantify microbial biofilm. *Microorganisms*. 2019. Vol. 7 no. 3. 73.

127. Correction: Biofilm Formation As a Response to Ecological Competition / N. M. Oliveira et al. *PLOS Biology*. 2015. Vol. 13, no. 8. P. 1-10. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002232

128. ClpXP proteases positively regulate alginate overexpression and mucoid conversion in Pseudomonas aeruginosa / D. Qiu et al. *Microbiology*. 2008. Vol. 154, no. 7. P. 2119–2130. DOI: https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/017368-0

129. Davin-Regli A., Pages J.M. Cross-resistance between biocides and antimicrobials: an emerging question. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*. 2012. Vol. 31, no. 1. P. 89–104. DOI: https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2099

130. Davin-Regli A., PagÃ¨s J. M. Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*. 2015. Vol. 6. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00392

131. Davison S., Benson C. E., Eckroade R. J. Evaluation of Disinfectants against Salmonella enteritidis. *Avian Diseases*. 1996. Vol. 40, no. 2. P. 272. DOI: https://doi.org/10.2307/1592220

132. Disinfectant testing for veterinary and agricultural applications: A review / A. D. Wales et al. *Zoonoses and Public Health*. 2021. Vol. 68, no. 5. P. 361–375. DOI: https://doi.org/10.1111/zph.12830

133. Disinfectant choices in veterinary practices, shelters and households: ABCD guidelines on safe and effective disinfection for feline environments / D. D. Addie et al. *Journal of feline medicine and surgery*. 2015. Vol. 17, no.7. P. 594–605.

134. Dynamics of morphological and biochemical parameters in the blood of white mice under the action of the drug «Vitosept» / M. P. Soltys et al. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. 2020. Vol. 22, no. 99. P. 167–172. DOI: https://doi.org/10.32718/nvlvet9925

135. Dynamics of biofilm formation by Listeria monocytogenes on stainless steel under mono-species and mixed-culture simulated fish processing conditions and chemical disinfection challenges / E. Papaioannou et al. *International Journal of Food Microbiology*. 2018. Vol. 267. P. 9–19. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.020

136. Effects of commercial enzymes on the adhesion of a marine biofilm-forming bacterium / C. Leroy et al. *Biofouling*. 2008. Vol. 24, no. 1. P. 11–22. DOI: https://doi.org/10.1080/08927010701784912

137. Efficacy of disinfectants for sanitizing boots under dairy farm conditions / J. Kirk et al. *Bovine Practitioner*. 2003. Vol. 37, no 1. P. 50–53.

138. Efficacy of disinfectants and detergents intended for a pig farm environment where Salmonella is present / R. J. Gosling et al. *Veterinary Microbiology*. 2017. Vol. 204. P. 46–53. DOI : https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.004

139. Efficacy of agricultural disinfectants on biofilms of the bacterial ring rot pathogen / R. J. Howard et al. Clavibacter michiganensis subsp sepedonicus. *Canadian Journal of Plant Pathology*. 2015. Vol. 37, no 3. P. 273–284.

140. Efficiency of Different Disinfectants on Bacillus cereus Sensu Stricto Biofilms on Stainless-Steel Surfaces in Contact With Milk / H. O. Silva et al. *Frontiers in Microbiology*. 2018. Vol. 9. P. 1–10. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02934

141. El-Azizi M., Farag N., Khardori N. Efficacy of selected biocides in the decontamination of common nosocomial bacterial pathogens in biofilm and planktonic forms. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. 2016. Vol. 47. P. 60–71. DOI: https://doi.org/10.1016/j.cimid.2016.06.002

142. Evaluation of acute toxicity of the "Orgasept" disinfectant / V.L. Kovalenko et al. *Ukrainian Journal of Ecology.* 2020. Vol. 10, no. 4. P. 273–278. DOI: https://doi.org/10.15421/2020_199

143. Evaluation of changes induced by temperature, contact time, and surface in the efficacies of disinfectants against avian influenza virus / Y. Jang et al. *Poultry Science*. 2014. Vol. 93, no. 1. P. 70–76. DOI: https://doi.org/10.3382/ps.2013-03452

144. Evaluation of commonly-used farm disinfectants in wet and dry models of Salmonella farm contamination / I. McLaren et al. *Avian Pathology*. 2011. Vol. 40, no. 1. P. 33–42. DOI: https://doi.org/10.1080/03079457.2010.537303

145. Evaluation of disinfectants commonly used by the commercial poultry industry under simulated field conditions / K. Stringfellow et al. *Poultry Science*. 2009. Vol. 88, no. 6. P. 1151–1155. DOI: https://doi.org/10.3382/ps.2008-00455

146. Evaluation of the effectiveness of hydrogen-peroxide-based disinfectants on biofilms formed by Gram-negative pathogens / P. K. Perumal et al. *Journal of Hospital Infection*. 2014. Vol. 87, no. 4. P. 227–233. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.05.004

147. Evaluation of disinfectant «Enzidez» according to physical and chemical parameters / M. Kukhtyn et al. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2022. Vol. 24, no 1. P. 3–9.

148. Finkel J. S., Mitchell A. P. Genetic control of Candida albicans biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*. 2010. Vol. 9, no. 2. P. 109–118. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro2475

149. Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them / M. Kukhtyn et al. *Eastern-European journal of Enterprise Technologies*. 2017. Vol. 5, no. 11. P. 26−33. DOI: https://doi.org/10.15587/1729-4061.2017.110488

150. Fu T. Y., Gent P., Kumar V. Efficacy, efficiency and safety aspects of hydrogen peroxide vapour and aerosolized hydrogen peroxide room disinfection systems. *Journal of Hospital Infection*. 2012. Vol. 80, no. 3. P. 199–205. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.11.019

151. Furuta K., Yoshizawa M. Effect of High Concentration of a Disinfectant Solution on Reduction of Viable Bacteria. *Japanese poultry science*. 1997. Vol. 34, no. 2. P. 132–136. DOI: https://doi.org/10.2141/jpsa.34.132

152. Guidance document on quantitative methods for evaluating the activity of microbicides used on hard non-porous surfaces / OECD Retrieved from Organisation for Economic Co-operation and Development website. DOI: http://www.oecd.org/env/ehs/pesticides-biocides/efficacytesting.htm

153. Gürkök, S.. Microbial enzymes in detergents: a review. *Int J Sci Eng Res*, 2019. №10, Vol. 9, 75-81.

154. Hall-Stoodley L., Costerton J. W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 2004. Vol. 2, no. 2. P. 95–108. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro821

155. Haracteristics of antibiotic sensitivity of Staphylococcus aureus isolated from dairy farms in Ukraine / O. M. Berhilevych et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017. Vol. 8, no. 4. P. 559–563. DOI: https://doi.org/10.15421/021786

156. Hasan, F., Shah, A. A., Javed, S., & Hameed, A. Enzymes used in detergents: lipases. *African journal of biotechnology*. 2010. Vol. 9 no 31. 4836-4844.

157. Hydrolytic Enzymes as Potentiators of Antimicrobials against an Inter-Kingdom Biofilm Model / A. Ruiz-Sorribas et al. *Microbiology Spectrum*. 2022. Vol. 10, no. 1. DOI: https://doi.org/10.1128/spectrum.02589-21

158. Holah J. T. Progress report on CEN/TC 216/Working Group 3: Disinfectant test methods for food hygiene, institutional, industrial and domestic applications. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1995. Vol. 36, no. 3-4. P. 355–365. DOI: https://doi.org/10.1016/0964-8305(95)00097-6

159. Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces / F. Ait Ouali et al. *International Journal of Food Microbiology*. 2014. Vol. 191. P. 116–124. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.011

160. Identification and biocide susceptibility of dominant bacteria after cleaning and disinfection of broiler houses / K. Luyckx et al. *Poultry Science*. 2017. Vol. 96, no. 4. P. 938–949. DOI: https://doi.org/10.3382/ps/pew355

161. Inactivation of Avian Influenza Virus Using Commercial Chemical Disinfectants in Small Scale Poultry Production / A. Gamal et al. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*. 2014. Vol. 41, no. 1. P. 102. DOI: https://doi.org/10.5455/ajvs.154692

162. Inclusion of detergent in a cleaning regime and effect on microbial load in livestock housing / L. R. Hancox et al. *Veterinary Record*. 2013. Vol. 173, no. 7. P. 167. DOI: https://doi.org/10.1136/vr.101392

163. In vitro evaluations of microbial biofilms and their responses to chemical disinfectants / M. W. Harding et al. *Acta Horticulturae*. 2014. No. 1053. P. 245–255. DOI: https://doi.org/10.17660/actahortic.2014.1053.27

164. John L. Pace, Mark E. Rupp, Roger G. Finch. Microbial Biofilms. *Biofilms, Infection and Antimicrobial Therapy*. 2005. P. 21–38. DOI: https://doi.org/10.1201/9781420028232-5

165. Kukhtyn M. D. et al. Bacterial biofilms formation of Cattle mastitis pathogens //Journal for veterinary medicine, biotechnology and biosafety. 2016. №. 2, Iss. 4. P.30-32.

166. Kumari S., Sarkar P. K. Bacillus cereus hazard and control in industrial dairy processing environment. *Food Control*. 2016. Vol. 69. P. 20–29. DOI: https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.012

167. Lafaurie, G. I., Sabogal, M. A., Castillo, D. M., Rincón, M. V., Gómez, L. A., Lesmes, Y. A., & Chambrone, L. Microbiome and microbial biofilm profiles of peri-implantitis: a systematic review. *Journal of Periodontology*. 2017. Vol. *88*. no.10. 1066-1089.

168. Levis K. Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobical Agents and Chemotherapy*. 2001. Vol. 45, № 4. P. 999−1007.

169. Loiselle M., Anderson K. W. The Use of Cellulase in Inhibiting Biofilm Formation from Organisms Commonly Found on Medical Implants. *Biofouling*. 2003. Vol. 19, no. 2. P. 77–85. DOI: https://doi.org/10.1080/0892701021000030142

170. Lyutskanov M., Urumova V., Zhelev G. Comparative evaluation of the efficacy of various sanitizers in a poultry hatchery. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 2010. Vol. 13, no 2. P. 111–116.

171. Maillard J. Y. Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology*. 2002. Vol. 92. P. 16–27. DOI: https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.3.x

172. Marin C., Hernandiz A., Lainez M. Biofilm development capacity of Salmonella strains isolated in poultry risk factors and their resistance against

disinfectants. *Poultry Science*. 2009. Vol. 88, no. 2. P. 424–431. DOI: https://doi.org/10.3382/ps.2008-00241

173. Martelli, F., Lambert, M., Butt, P., Cheney, T., Tatone, F. A., Callaby, R., ... & Smith, R. P. Evaluation of an enhanced cleaning and disinfection protocol in Salmonella contaminated pig holdings in the United Kingdom. *PloS one*. 2017. Vol. 12, no. 6. P. e0178897. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178897

174. Membrane Active Small Molecules Show Selective Broad Spectrum Antibacterial Activity with No Detectable Resistance and Eradicate Biofilms / J. Hoque et al. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2015. Vol. 58, no. 14. P. 5486−5500. DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00443

175. Méthode de mesure de l'efficacité des procédés de nettoyage et de désinfection des surfaces ouvertes / A. Brouillaud-Delattre et al. *Le Lait*. 1994. Vol. 74, no. 1. P. 79–88. DOI: https://doi.org/10.1051/lait:199417

176. Microbial biofilm formation: a need to act / U. Römling et al. *Journal of Internal Medicine*. 2014. Vol. 276, no. 2. P. 98–110. DOI: https://doi.org/10.1111/joim.12242

177. 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, no 11 (98). P. 14–21. DOI: https://doi.org/10.15587/1729-4061.2019.160142

178. Mohamed J. A., Huang D. B. Biofilm formation by enterococci. *Journal of medical microbiology*. 2007. Vol. 56, no 12. P. 1581–1588.

179. Molobela I. P., Cloete T. E., Beukes M. Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *African Journal of Microbiology Research.* 2010. Vol. 4, no 14. P. 1515–1524.

180. Monds R. D., O'Toole G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiology*. 2009. Vol. 17, no. 2. P. 73–87. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.001

181. Nazir R., Zaffar M. R., Amin I. Bacterial biofilms. *Freshwater Microbiology*. 2019. P. 307–340. DOI: https://doi.org/10.1016/b978-0-12-817495-1.00008-6

182. Novozymes is the world leader in biological solutions. Together with customers, partners and the global community, we improve industrial performance while preserving the planet's resources and helping to build better lives. [Электронный ресурс]: Режим доступа: *https://www.novozymes.com/en*

183. Paliy A. P. Antibacterial effect of "Ecocide C" disinfectant against mycobacteria. *Ukrainian Journal of Ecology*. 2018. Vol. 8, no. 1. P. 141–147. DOI: https://doi.org/10.15421/2018_198

184. Procedural Revision to the AOAC Germicidal Spray Products as Disinfectants Test Method: Establishment of Minimum and Maximum Log Density Values for Test Microbes on Inoculated Carriers / R. M. Pines et al. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. 2013. Vol. 96, no. 3. P. 567–572. DOI: https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-406

185. Psl trails guide exploration and microcolony formation in Pseudomonas aeruginosa biofilms / K. Zhao et al. *Nature*. 2013. Vol. 497, no. 7449. P. 388–391. DOI: https://doi.org/10.1038/nature12155

186. Quantative Methods in Modern Science organized by Academic Paper Ltd / T. Zhamal et al. *Morphological And Anatomical Features Of The Genus Gagea Salisb. Growing In The East Kazakhstan Region*. DOI: https://doi.org/10.26782/jmcms.spl.10/2020.06.00041

187. Rähse, W.. Production of Tailor-made enzymes for detergents. *ChemBioEng Reviews*. 2014. Vol.1 no 1. 27-39.

188. Removal of microbial biofilms from dispense equipment: Effect of enzymatic predigestion and detergent treatment / S. M. Walker et al. *Inst. Brew.,* 2007. Vol. 113, no. 1. P. 61−66.

189. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review / A. Bridier et al. *Biofouling*. 2011. Vol. 27, no. 9. P. 1017–1032. DOI: https://doi.org/10.1080/08927014.2011.626899

190. Resistance of nosocomial strains to antibacterial drugs and its link to biofilm formation / T. V. Sklyar et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017. Vol. 8, no. 4. P. 540–546. DOI: https://doi.org/10.15421/021783

191. Resistance of S. Aureus Atcc 25923, E. Coli 055k59 No. 3912/41 and P. Aeruginosa 27/99 to the Wash-disinfectant «Milkodez» / M. Verkholyuk et al. *EUREKA: Health Sciences.* 2020. Vol. 1. P. 55–60.

192. Römling U., Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*. 2012. Vol. 272, no. 6. P. 541–561. DOI: https://doi.org/10.1111/joim.12004

193. Russell A. D. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003. Vol. 52, no. 5. P. 750–763. DOI: https://doi.org/10.1093/jac/dkg422

194. Russell A. Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *The Lancet Infectious Diseases*. 2003. Vol. 3, no. 12. P. 794–803. DOI: https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00833-8

195. Salata V. Z. THE BACTERICIDAL PROPERTIES OF DETERGENT-DISINFECTANT «SAN-ACTIV». *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2015. Vol. 17, no 2. P. 197–201.

196. Sauer K., Rickard A. H., Davies D. G. Biofilms and biocomplexity. *Microbe-American Society for Microbiology*. 2007. Vol. 2, no 7. P. 347.

197. Schneider P. M. New technologies and trends in sterilization and disinfection. *American Journal of Infection Control*. 2013. Vol. 41, no. 5. P. 81–86. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ajic.2012.12.007

198. Spatial Patterns of DNA Replication, Protein Synthesis, and Oxygen Concentration within Bacterial Biofilms Reveal Diverse Physiological States / S. A. Rani et al. *Journal of Bacteriology*. 2007. Vol. 189, no. 11. P. 4223–4233. DOI: https://doi.org/10.1128/jb.00107-07

199. Standard quantitative disk carrier test method for determining bactericidal, virucidal, fungicidal, mycobactericidal, and sporicidal activities of chemicals / ASTM Retrieved from ASTM International website. DOI: https://doi.org/10.1520/E2197-17E01

200. Stiefel P., Mauerhofer S., Schneider J., Maniura-Weber K. Enzymes enhance biofilm removal efficiency of cleaners. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016. Vol. 60. no. 6. 3647-3652.

201. Study of the influence of savinase®evity16l enzyme on biofilms formation of staphylococcus aureus on stainless steel with different roughness / M. Kukhtyn et al. *EUREKA: Life Sciences*. 2019. Vol. 2. P. 26–32. DOI: https://doi.org/10.21303/2504-5695.2019.00858

202. 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. 1-10. DOI: https://doi.org/10.1016/j.nmni.2020.100794

203. Surface-attached cells, biofilms and biocide susceptibility: implications for hospital cleaning and disinfection / J. A. Otter et al. *Journal of Hospital Infection*. 2015. Vol. 89, no. 1. P. 16–27. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jhin.2014.09.008

204. Tolerance of Pseudomonas aeruginosa in in-vitro biofilms to high-level peracetic acid disinfection / A. B. Akinbobola et al. *Journal of Hospital Infection*. 2017. Vol. 97, no. 2. P. 162–168. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.06.024

205. The activity of the disinfectant «Enzidez» against bacteria in biofilms / V. Kozhyn et al. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2021. Vol. 23, no 101. P. 67–74.

206. The antiseptic activity of the drug, based on sodium hypochlorite in experimental and spontaneously infected wounds in animals / M. P. Soltys et al. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*. 2022. Vol. 24, no. 105. P. 73–82. DOI: https://doi.org/10.32718/nvlvet10511

207. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms / H. Ceri et al. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999. Vol. 37, no. 6. P. 1771–1776. DOI: https://doi.org/10.1128/jcm.37.6.1771-1776.1999

208. The effect of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of bacteria that are isolated from chronic anal fissures / I. M. Kozlovska et al. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017. Vol. 8, no. 4. P. 577–582. DOI: https://doi.org/10.15421/021789

209. The influence of disinfectants on microbial biofilms of dairy equipment / M. Kukhtyn et al. *EUREKA: Life Sciences*. 2017. Vol. 5. P. 11–17. DOI: https://doi.org/10.21303/2504-5695.2017.00423

210. The synergistic effect of enzymatic detergents on biofilm cleaning from different surfaces / A. Tsiaprazi-Stamou et al. *Biofouling*. 2019. Vol. 35, no. 8. P. 883–899. DOI: https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1666108

211. The Veterinary Programs at the Romanian University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine / V. Crivineanu et al. *Journal of Veterinary Medical Education.* 2006. Vol. 33, no. 2. P. 228–232. DOI: https://doi.org/10.3138/jvme.33.2.228

212. Understanding the Mechanism of Bacterial Biofilms Resistance to Antimicrobial Agents / S. Singh et al. *The Open Microbiology Journal*. 2017. Vol. 11, no. 1. P. 53–62. DOI: https://doi.org/10.2174/1874285801711010053

213. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry / Y. Lequette et al. Biofouling. 2010. Vol. 26, no. 4. P. 421–431. DOI: https://doi.org/10.1080/08927011003699535

214. Valls, C., Pujadas, G., Garcia-Vallve, S., & Mulero, M. (2011). Characterization of the protease activity of detergents laboratory practicals for studying the protease profile and activity of various commercial detergents. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, *39*(4), 280-290.

215. Vickery K., Pajkos A., Cossart Y. Removal of biofilm from endoscopes: evaluation of detergent efficiency. *American Journal of Infection*

Control. 2004. Vol. 32, no. 3. P. 170–176. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ajic.2003.10.009

216. Virucidal Activity of Fogged Chlorine Dioxide- and Hydrogen Peroxide-Based Disinfectants against Human Norovirus and Its Surrogate, Feline Calicivirus, on Hard-to-Reach Surfaces / N. Montazeri et al. *Frontiers in Microbiology*. 2017. Vol. 8. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01031

217. Verkholiuk M. M., Peleno R. A., Semaniuk N. V. Development of a regime of disinfection of milking equipment and milk inventory with the acid detergent "Milkodez". *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*. 2019. Vol. 21, no 96. P. 153–157.

218. Vyznachennia bakterytsydnosti kompleksnoho dezinfikuiuchoho preparatu na osnovi poliheksametylenhuanidyn hidrokhloryda / V. L. Kovalenko et al. *Veterynarna biotekhnolohiia Biuleten*. 2011. Vol. 18. P. 106–110.

219. Wales A., Breslin M., Davies R. Assessment of cleaning and disinfection in Salmonella-contaminated poultry layer houses using qualitative and semi-quantitative culture techniques. *Veterinary Microbiology*. 2006. Vol. 116, no. 4. P. 283–293. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.04.026

220. Watnick P., Kolter R. Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology*. 2000. Vol. 182, no. 10. P. 2675–2679. DOI: https://doi.org/10.1128/jb.182.10.2675-2679.2000

221. Wood T. K., Knabel S. J., Kwan B. W. Bacterial Persister Cell Formation and Dormancy. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013. Vol. 79, no. 23. P. 7116–7121. DOI: https://doi.org/10.1128/aem.02636-13

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

Стаття у закордонному виданні, яке проіндексоване у базі даних Scopus:

1. Kukhtyn, M., Kozhyn, V., Horiuk, V., Malimon, Z., Horiuk, Y., Yashchuk, T., & Kernychnyi, S. (2021). Activity of Disinfecting Biocides and Enzymes of Proteases and Amylases on Bacteria in Biofilms. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, *27*(4), 495-502. *(Здобувач провів дослідження впливу біоцидів на біоплівки та підготовив матеріали до друку).*

Статті у фахових наукових виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз даних:

2. Kozhyn, V. A., Horiuk, V. V., Kukhtyn, M. D., & Boltyk, N. P. (2021). Дослідження бактерицидної активності катаміну АБ залежно від значення pH розчинів. *Podilian Bulletin: Agriculture, Engineering, Economics*, (34), 166-174. *(Здобувач визначив мінімальну бактерицидну концентрацію катаміну залежно від pH розчинів, проаналізував отримані дані та підготовив їх до друку).*

3. Kozhyn, V. A. (2021). Бактерицидні властивості дезінфікуючого засобу «Ензидез». *Ветеринарія, технології тваринництва та природокористування*, (8), 27-33.

4. Кухтин, М., Кожин, В., Горюк, Ю., Горюк, В., & Гриневич, Н. (2022). Вплив дезінфікуючого засобу «Ензидез» на тест-об'єкти контаміновані мікроорганізмами. *Аграрний вісник Причорномор'я*, 102-103. *(Здобувач визначив антимікробну дію деззасобу «Ензидез» на тест-об'єкти (нержавіюча сталь, кахельна плитка, бетон, проаналізував отримані дані та підготовив їх до друку).*

5. Kozhyn, V., Kukhtyn, M., Horiuk, V., Vichko, O., & Kryzhanivsky, Y. (2021). The activity of the disinfectant «Enzidez» against bacteria in biofilms. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 23(101), 67–74. *(Здобувач визначив вплив деззасобу «Ензидез» на біоплівкові форми бактерій, проаналізував отримані дані та підготовив їх до друку).*

6. Kukhtyn, M., Kozhyn, V., Horiuk, V., Horiuk, Y., & Boltyk, N. (2022). Evaluation of disinfectant «Enzidez» according to physical and chemical parameters. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary Sciences*, *24*(105), 3-9. *(Здобувач визначив основні фізико-хімічні властивості деззасобу «Ензидез» та проаналізував отримані дані та підготовив їх до друку).*

7. Kozhyn, V. A., Kukhtyn, M. D., Horiuk, Y. V., Horiuk, V. V., Perkiy, Y. B., & Gufrij, D. F. (2021). Дослідження токсичного впливу дезінфікуючого засобу «Ензидез» на клітини інфузорій. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, *9*(4), 191-194. *(Здобувач визначив вплив деззасобу "Ензидез" на клітини інфузорій проаналізував отримані дані та підготовив їх до друку).*

8. **Kozhyn**, V., Salata, V., Kukhtyn, M., Horiuk, Y., & Matviishyn, T. S. (2023). Production studies of the disinfectant «Enzidez». Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. Series: Veterinary sciences, 25(111), 78–83. (*Здобувач проводив дезінфекцію, відбирав змиви та мікробіологічні дослідження).*

Патенти України на корисну модель:

9. **Кожин В. А.,** Кухтин М. Д., Горюк Ю. В., Горюк В. В. Спосіб дезінфекції обладнання, інструментів, об’єктів ветеринарного нагляду у ветеринарній медицині: пат. 150859 Україна: МПК 20.06 A61L 2/16 (2006.01), A61L 101/00, A61L 101/32 (2006.01). № u 202102797; заявл. 27.05.2021; опубл. 04.05.2022, Бюл. №18/22. *(Здобувач брав участь у лабораторних дослідженнях, підготовці та подані матеріалів до патентування).*

Технічні умови України:

10. **Кожин В. А.,** Кухтин М.Д. Технічні умови ТУ У 21.2–22769675–002:2022 Дезінфікуючий засіб «Ензидез». Кам'янець-Подільський, 2022. 17 с. *(Здобувач приймав участь у розробці деззасобу, організації і проведенні експериментальних досліджень та підготовці відповідної документації).*

Методичні рекомендації:

11. **Кожин В. А.,** Кухтин М. Д., Горюк В. В. Застосування дезінфікуючого засобу «Ензидез»: методичні рекомендації. Кам'янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 2022. 19 с. *(Здобувач проводив експериментальні дослідження та оформлював методичні рекомендації).*

Матеріали і тези наукових конференцій та інші наукові видання, які додатково відображають наукові результати дисертації:

12. **Кожин, В**., Горюк, В., & Кухтин, М. Д. (2021). Вплив якості води на ефективність миття і дезінфекції. *Тези доповідей І Міжнародної науково-технічної конференції «Якість води: біомедичні, технологічні, агропромислові і екологічні аспекти»*, 63-63.

13. **Кожин В. А.,** Кухтин М. Д., Болтик Н. П. Вплив біоцидів та ензимів на мікробні біоплівки. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин:* щоріч. наук.- практ. конф. молодих вчених (Київ, 30 червня 2021 р.). Київ: Компринт, 2021. С. 13–14.

14. Кухтин М.Д., **Кожин В. А.** Дія дезінфікуючого засобу «Ензидез» на бактерії у біоплівках. *ІІ конференція «Сучасні методи діагностики, лікування та профілактика у ветеринарній медицині» присвячена 140-річчю відкриття навчального закладу «Цісарсько-королівська ветеринарна школа та школа підковування коней разом із клінікою-стаціонаром для тварин у Львові»*: тези доповідей, 18–19 листопада 2021 р. Львів: СПОЛОМ, 2021. С. 45.

15. **Кожин В.А.,** Кухтин М.Д., Болтик Н.П. Оцінка дезінфікуючого засобу «Ензидез» за фізико-хімічними властивостями. *Актуальні проблеми ветеринарної біотехнології та інфекційної патології тварин:* щоріч. наук.-

практ. конф. молодих вчених (Київ, 21 липня 2022 р.). Київ: Компринт, 2022. С. 7.

16. **Кожин**, В., Салата, В., & Кухтин, М. (2023). Протимікробна дія біоцидів в асоціації з ензимами на бактерії у біоплівках. Матеріали науково-практичної онлайн конференції «Безпечність та якість харчових продуктів у концепції «Єдине здоров'я» (м. Львів, 1–2 червня 2023 р.)**,** *ЛНУВМБ***,** 68-69.

Додаток Б

Патент України на корисну модель

УКРАЇНА

ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 150859

СПОСІБ ДЕЗІНФЕКЦІЇ ОБЛАДНАННЯ, ІНСТРУМЕНТІВ, ОБ'ЄКТІВ ВЕТЕРИНАРНОГО НАГЛЯДУ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі України корисних моделей **04.05.2022.**

Т.в.о. Генерального директора
Державного підприємства
«Український інститут
інтелектуальної власності» П.І. Іваненко

«УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ»
Ідентифікаційний код
31032378

(11) **150859**

(19) **UA**

(51) **МПК**
A61L 2/16 **(2006.01)**
A61L 101/00 **(2006.01)**
A61L 101/32 **(2006.01)**

(21) Номер заявки: **u 2021 02797**

(22) Дата подання заявки: **27.05.2021**

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **05.05.2022**

(46) Дата публікації відомостей про державну реєстрацію та номер Бюлетеня: **04.05.2022, Бюл. № 18**

(72) Винахідники:
Кожин Владислав Анатолійович, UA,
Кухтин Микола Дмитрович, UA,
Горюк Юлія Вікторівна, UA,
Горюк Віктор Васильович, UA

(73) Володілець:
ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРАРНО-ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Шевченка, 13, м. Кам'янець-Подільський, Хмельницька обл., 32300, UA

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ ДЕЗІНФЕКЦІЇ ОБЛАДНАННЯ, ІНСТРУМЕНТІВ, ОБ'ЄКТІВ ВЕТЕРИНАРНОГО НАГЛЯДУ У ВЕТЕРИНАРНІЙ МЕДИЦИНІ

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб дезінфекції обладнання, інструментів, об'єктів ветеринарного нагляду у ветеринарній медицині, що включає занурення (інструментів) на 15 хв або аерозольне нанесення на об'єкти з експозицією 15 хв дезінфікуючого засобу, який містить Катамін АБ - розчин з вмістом 49-51 % алкілдиметилбензиламонію хлориду - 8,0-12,0 %, Вантоцил TG - 20 % водний розчин полігексаметиленбігуанідину гідрохлориду - 1,0-2,0 %, інгібітор корозії - 4,0 %, дистильовану воду - 81,25-86,50 %, який **відрізняється** тим, що у склад дезінфікуючого засобу додатково вводять протеолітичний ензим Everlase 16 L та амілолітичний ензим Termamyl 300 L - 0,5-0,75 %, які зумовлюють деградацію біологічних забруднень з поверхні об'єктів.

Додаток В

Технічні умови України

ДКПП 21.20.2 **УКНД** 11.220

ЗАТВЕРДЖУЮ

Ректор Закладу вищої освіти

«Подільський державний університет»

_____ Володимир ІВАНИШИН

«24» _____05_____ 2022 р.

Дезінфікуючий засіб

«Ензидез»

Технічні умови

ТУ У 21.2–22769675–002:2022

(введено вперше)

Дата надання чинності _____

Чинні до _____

РОЗРОБЛЕНО:

Кандидат ветеринарних наук, доцент

_____ Віктор ГОРЮК

«24» _____05_____ 2022 р.

аспірант

_____ Владислав КОЖИН

«24» _____05_____ 2022 р.

Доктор ветеринарних наук, професор

_____ Микола КУХТИН

«24» _____05_____ 2022 р.

Кандидат ветеринарних наук

_____ Юлія ГОРЮК

«24» _____05_____ 2022 р.

Додаток Г

Методичні рекомендації

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ЗАКЛАД ВИЩОЇ ОСВІТИ «ПОДІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»

ФАКУЛЬТЕТ ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ І ТЕХНОЛОГІЙ У ТВАРИННИЦТВІ

Владислав КОЖИН, Юлія ГОРЮК, Микола КУХТИН

Методичні рекомендації

щодо застосування дезінфікуючого засобу «Ензидез» для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації у клініках ветеринарної медицини

м. Кам'янець-Подільський

ЗВО «ПДУ»

2022 рік

Г.2 – другий розділ додатка

УДК 619:616.636.

Розробники:

Владислав КОЖИН – аспірант кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

Юлія ГОРЮК – кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

Микола КУХТИН – доктор ветеринарних наук, професор, професор кафедри харчової біотехнології і хімії Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя

Рекомендовано до друку науково-методичною радою
Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»
(протокол № 8 від 22 листопада 2022 року)

Рецензенти:

Роман САЧУК – доктор ветеринарних наук, професор, професор кафедри екології, географії та хімії Рівненського державного гуманітарного університету, старший дослідник

Тетяна СУПРОВИЧ– доктор сільськогосподарських наук, професор, професор кафедри гігієни тварин та ветеринарного забезпечення кінологічної служби Національної поліції України Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

Методичні рекомендації щодо застосування дезінфікуючого засобу «Ензидез» для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації у клініках ветеринарної медицини / В.А. Кожин, Ю.В. Горюк, М.Д. Кухтин. Кам’янець-Подільський: ЗВО «ПДУ», 2022. − 23 с.

У методичних рекомендаціях наведені вимоги щодо використання дезінфікуючого засобу «Ензидез» для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації у клініках ветеринарної медицини.

© Владислав КОЖИН, Юлія ГОРЮК, Микола КУХТИН, 2022

Додаток Д

Акти впровадження результатів дисертаційної роботи у виробництво

Акт

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** Дезінфікуючий засіб "Ензидез" для застосування у клініках ветеринарної медицини з метою дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації об'єктів (стіни, підлога, столи, тощо) та усіх видів виробів, інструментів та обладнання ветеринарного призначення.

2. **Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР:** Дезінфікуючий засіб "Ензидез" ТУ У 21.2–22769675–002:2022.

3. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

4. **Коротка характеристика впровадження:** Дезінфікуючий засіб "Ензидез" – це поєднання дезінфікуючих субстанцій із класу ЧАС, похідних біогуанідину, протеолітичних та гліколітичних ензимів. Засіб "Ензидез" активний щодо біоплівкових форм бактерій за можливого органічного навантаження. Дезінфектант проявляє бактерицидний ефект щодо бактерій *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis* і грибів роду *Candida spp.* починаючи з 0,1 % концентрації та експозиції 15 хв, не корозійний щодо нержавіючої сталі, проявляє мийні властивості. Засіб є безпечний, не спричиняє подразнюючої та шкірно-резорбтивної дії. Аналогів в Україні не має.

5. **Назва організації, де проведено впровадження:** Клініка ветеринарної медицини «Пан Коцький»

6. **Рік та обсяг впровадження:** 2022 рік, 5 л.

7. **Результати впровадження:** Застосування дезінфікуючого засобу "Ензидез" у клініках ветеринарної медицини для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації об'єктів (стіни, підлога, столи, тощо) різних виробів, інструментів та обладнання ветеринарного призначення дозволяє забезпечити ефективність обробки на 99,99 – 100 %.

8. **Відповідальні за впровадження:**

від розробника
Владислав КОЖИН, аспірант кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

від «Пан Коцький»
Михайло МОЧЕРНЮК, лікар.

«10» лютого 2022 р.

Акт

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** Дезінфікуючий засіб "Ензидез" для застосування у клініках ветеринарної медицини з метою дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації об'єктів (стіни, підлога, столи, тощо) та усіх видів виробів, інструментів та обладнання ветеринарного призначення.

2. **Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР:** Дезінфікуючий засіб "Ензидез" ТУ У 21.2–22769675–002:2022.

3. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

4. **Коротка характеристика впровадження**: Дезінфікуючий засіб "Ензидез" – це поєднання дезінфікуючих субстанцій із класу ЧАС, похідних біогуанідину, протеолітичних та гліколітичних ензимів. Засіб "Ензидез" активний щодо біоплівкових форм бактерій за можливого органічного навантаження. Дезінфектант проявляє бактерицидний ефект щодо бактерій *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis* і грибів роду *Candida spp.* починаючи з 0,1 % концентрації та експозиції 15 хв, не корозійний щодо нержавіючої сталі, проявляє мийні властивості. Засіб є безпечний, не спричиняє подразнюючої та шкірно-резорбтивної дії. Аналогів в Україні не має.

5. **Назва організації, де проведено впровадження:** Ветеринарна клініка «Vitae Vet»

6. **Рік та обсяг впровадження:** 2022 рік, 5 л.

7. **Результати впровадження:** Застосування дезінфікуючого засобу "Ензидез" у клініках ветеринарної медицини для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації об'єктів (стіни, підлога, столи, тощо) різних виробів, інструментів та обладнання ветеринарного призначення дозволяє забезпечити ефективність обробки на 99,99 – 100 %.

8. **Відповідальні за впровадження:**

від розробника
Владислав КОЖИН, аспірант кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

від ветеринарної клініки «Vitae Vet»
Віталій ЧУХНО, директор.

«21» вересня 2022 р.

Акт

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** Дезінфікуючий засіб "Ензидез" для застосування у клініках ветеринарної медицини з метою дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації об'єктів (стіни, підлога, столи, тощо) та усіх видів виробів, інструментів та обладнання ветеринарного призначення.

2. **Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР:** Дезінфікуючий засіб "Ензидез" ТУ У 21.2–22769675–002:2022.

3. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

4. **Коротка характеристика впровадження:** Дезінфікуючий засіб "Ензидез" – це поєднання дезінфікуючих субстанцій із класу ЧАС, похідних біогуанідину, протеолітичних та гліколітичних ензимів. Засіб "Ензидез" активний щодо біоплівкових форм бактерій за можливого органічного навантаження. Дезінфектант проявляє бактерицидний ефект щодо бактерій *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis* і грибів роду *Candida spp.* починаючи з 0,1 % концентрації та експозиції 15 хв, не корозійний щодо нержавіючої сталі, проявляє мийні властивості. Засіб є безпечний, не спричиняє подразнюючої та шкірно-резорбтивної дії. Аналогів в Україні не має.

5. **Назва організації, де проведено впровадження:** Клініка ветеринарної медицини «VetLife»

6. **Рік та обсяг впровадження:** 2022 рік, 5 л.

7. **Результати впровадження:** Застосування дезінфікуючого засобу "Ензидез" у клініках ветеринарної медицини для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації об'єктів (стіни, підлога, столи, тощо) різних виробів, інструментів та обладнання ветеринарного призначення дозволяє забезпечити ефективність обробки на 99,99 – 100 %.

8. **Відповідальні за впровадження:**

від розробника
Владислав КОЖИН, аспірант кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

від ветеринарної клініки «VetLife»
Катерина ГОРБАНЬ, головний лікар.

«9» вересня 2022 р.

УКРАЇНА · ФІЗИЧНА ОСОБА · ПІДПРИЄМЕЦЬ · МІСТО ЧЕРНІВЦІ
Горбань Катерина Андріївна
Ідентифікаційний номер 3591305282

Акт

впровадження результатів завершених наукових досліджень

1. **Назва впровадження:** Дезінфікуючий засіб "Ензидез" для застосування у клініках ветеринарної медицини з метою дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації об'єктів (стіни, підлога, столи, тощо) та усіх видів виробів, інструментів та обладнання ветеринарного призначення.

2. **Назва завершеної НДР, що впроваджується і номер ДР:** Дезінфікуючий засіб "Ензидез" ТУ У 21.2–22769675–002:2022.

3. **Підрозділ установи-розробника:** кафедра ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет».

4. **Коротка характеристика впровадження**: Дезінфікуючий засіб "Ензидез" – це поєднання дезінфікуючих субстанцій із класу ЧАС, похідних біогуанідину, протеолітичних та гліколітичних ензимів. Засіб "Ензидез" активний щодо біоплівкових форм бактерій за можливого органічного навантаження. Дезінфектант проявляє бактерицидний ефект щодо бактерій *S. aureus, E. coli, P. aeruginosa, B. subtilis* і грибів роду *Candida spp.* починаючи з 0,1 % концентрації та експозиції 15 хв, не корозійний щодо нержавіючої сталі, проявляє мийні властивості. Засіб є безпечний, не спричиняє подразнюючої та шкірно-резорбтивної дії. Аналогів в Україні не має.

5. **Назва організації, де проведено впровадження:** Ветеринарна клініка «ZooVetSkill»

6. **Рік та обсяг впровадження:** 2022 рік, 5 л.

7. **Результати впровадження:** Застосування дезінфікуючого засобу "Ензидез" у клініках ветеринарної медицини для дезінфекції, достерилізаційного очищення та стерилізації об'єктів (стіни, підлога, столи, тощо) різних виробів, інструментів та обладнання ветеринарного призначення дозволяє забезпечити ефективність обробки на 99,99 – 100 %.

8. **Відповідальні за впровадження:**

від розробника
Владислав КОЖИН, аспірант кафедри ветеринарного акушерства, внутрішньої патології та хірургії Закладу вищої освіти «Подільський державний університет»

від ветеринарної клініки «ZooVetSkill»
Андрій СЛОЇК, директор.

«1» листопада 2022 р.