

Грузинский государственный сельскохозяйственный университет

На правах рукописи

ЦИЦИНО СИХАРУЛИДZE

**БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКИЙ, БАКТЕРИОЦИДНЫЙ И
МУТАГЕННЫЙ ЭФФЕКТ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ
ПРЕПАРАТОВ**

**16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология, иммунология**

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**

**Тбилиси
2006 год**

Работа выполнена в Грузинском государственном зоотехническо-ветеринарном университете и в Центральной клинической железнодорожной больнице им. акад. Е. Пипиа.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ: НАЧКЕБИЯ ДЖЕМАЛ

доктор ветеринарных наук,
профессор (16.00.03)

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ: 1. НАТИДЗЕ МЕРАБ

доктор ветеринарных наук,
профессор (16.00.03)

2. ГИОРГОБИАНИ ГИОРГИЙ

кандидат медицинских наук,
доцент (14.00.27)

Защита диссертации состоится " _____ " _____ 2006 года в " _____ " часов на заседании диссертационного совета V. 16.00 №6 Грузинского государственного сельскохозяйственного университета.

Адрес: 0165, Тбилиси – Крцаниси, Грузинский государственный сельскохозяйственный университет

С диссертационной работой можно ознакомиться в библиотеке Грузинского государственного сельскохозяйственного университета (0165, Тбилиси – Крцаниси).

Автореферат разослан " _____ " _____ 2006 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доцент

Г. ЦКВИТИНИДZE

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

При изложении частной микробиологии и вирусологии используют подход, в основе которого лежат особенности эпидемиологии (кишечные, воздушно-капельные, особо опасные инфекции) заболеваний и принципы классификации их возбудителей. Загрязнение окружающей среды (воздуха, воды, почвы) вредными для здоровья живых существ химическими веществами уже привело к экологической катастрофе, выход из которой возможен только усилиями всех стран мира.

Биологические факторы, прежде всего микроорганизмы, являются причиной инфекционных болезней.

Инфекционных болезней, вызываемых микроорганизмами, заболеваний очень много. Практически ими болеют в течение всей жизни хотя бы раз, а то и несколько каждый человек, животное. К микроорганизмам относятся живые существа, размеры которых очень малы, что они не видны невооруженным глазом.

Изменчивость окружающей среды влияет на свойства живых организмов, усиливает их приспособленность, способность к защите. Факторы действующие на грани критической могут вызвать изменение способствующие усилению защитных сил микробной клетки.

Среди физических факторов, под постоянным влиянием которых находятся микроорганизмы, одно из главных мест занимает дезинфекция. На жизнедеятельность микроорганизмов экстремально действуют дезинфицирующие препараты.

Различная концентрация дезинфектантов на микроорганизмы действуют бактериостатически, бактерицидно и проявляют мутагенный эффект.

АКТУАЛЬНОСТЬ И НАУЧНАЯ НОВИЗНА ТЕМЫ. Природа многообразна и едина. Все, что ее составляет, взаимосвязано. В конечном счете между собою взаимодействуют все живые существа, и вместе с тем на них воздействуют различные абиотические факторы окружающей среды.

Здоровый мир – это бесценный дар природы, но он постоянно подвергается атаке со стороны самых различных внешних сил, которые и вызывают болезни. Организм человека как бы постоянно балансирует между состоянием здоровья и болезни, переход между которыми может быть незаметным, постепенным.

Основные положения нашего исследования является признание того непреложного факта, что возникновение, развитие и исход инфекции как процесса взаимодействия между микро– и макроорганизмом зависит от свойств того и другого участников этого конкурентного взаимодействия и от условий внешней среды, в которых оно происходит.

Новизна работы заключается в том, что исходя из поставленной нами цели, установить тот предел, за которой бактерии могут расти и развиваться, т.к. литературные данные часто не соответствуют результатам, полученным опытными данным, что связано с измененными условиями внешней среды и, соответственно, с адекватной изменчивостью в бактериальной клетке. Таким образом, следует учесть то, что под воздействием тех или иных вредных факторов в популяций бактерий большое количество особей может погибнуть, но остаются естественно резистентные индивиды или мутанты, выявление которых обязательно при установлении причин появления инфекционных заболеваний. Исходя из сказанного, предлагаемая тема актуальна и изучение отмеченных вопросов обязательно как с теоретической, так и практической точки зрения.

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ. Целью нашей работы было изучить изменения, происходящие в микроорганизмах после воздействия химических дезинфицирующих растворов. Изучили факторы, определяющие эффективность обеззараживания – вид микроорганизма, концентрацию активно действующего вещества, экспозицию, pH, методы

определения антимикробных свойств дезинфицирующих средств. Указаны сроки выживания ряда патогенных микроорганизмов на различных объектах окружающей человека и животных.

Цель работы – под воздействием химических средств установить порог, за которым рост и размножение бактерий не возможны, но при попадании вновь в оптимальные условия, они могут проявить жизнедеятельную способность, т.е. в этом случае на бактерицидное воздействие, а подавление генеративной зоны.

Для этого мы решили изучить бактериоцидные, бактериостатические эффекты некоторых химических средств в зависимости от концентраций их растворов и экспозиций – времени, за которое могут погибнуть бактерии или временно потерять жизнедеятельную способность, или же временно испытывают мутации, т.е. приобретают или теряют некоторые характерные признаки. Изучение этого вопроса имеет огромное практическое значение потому, что измененные условия окружающей среды, контакт с новыми неизвестными веществами изменили генетический код микробов. Если они в прошлом были чувствительны к бактерицидным средствам, то на сегодняшний день эти микроорганизмы приобрели выраженную резистентность: соответственно – до сих пор известные константы и выносливость не совпадают с реально существующими.

АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ. Материалы диссертации доложены:

- на конференции молодых ученых и аспирантов Грузинской государственной зоотехническо-ветеринарной академии (2000);
- на научной конференции молодых ученых и аспирантов Грузинского государственного зоотехническо-ветеринарного университета (2003).

ПУБЛИКАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ. Материалы диссертационной работы опубликованы в 4 научных трудах, которые предложены СУЭ-ом.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ. Текст диссертации составляет 126 машинописных страниц и состоит из: введения, обзора литературы, материалов и методики исследования, данных собственных исследований, анализа полученных результатов, выводов и практических предложений. Диссертация иллюстрирована 10 таблицами, 4 графиками и 6 фотографиями. К работе приложен список использованной литературы из 110 источников.

2. СОДЕРЖАНИЕ РАБОТ

2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Бактериостатический и бактериоцидный эффект мы изучали на тест-микробах: *E.coli*, *St.epidermidis*, *Pr.vulgaris*, *Ps.aeruginosa*, *Salmonella cholera suis*. Работы проводили в Грузинском государственном зоотехническо-ветеринарном университете, а также в Центральной клинической железнодорожной больнице им. акад. Е. Пипиа. Объектами исследования служили материалы полученные из окружающей среды, в лаборатории поступившие материалы, а также от больных, заразившихся патогенными микроорганизмами.

Для начала эксперимента первым делом надо было уточнить вид микроорганизмов, выделить чистую культуру, т.к. в смешанных культурах идентификация отдельных видов очень трудно. В первую очередь большое внимание обращаем на те условия внешней среды, откуда выделили культуру. Тесты, которые служат для выделения чистой культуры, очень

разнообразны – изучают активность ферментов, бактериальную ДНК, дают возможность описать морфологически.

Опыты проводились на питательной среде, разработанной проф. Дж. Начкебия. В частности, которые готовятся из растительных субстратов, а также использование хорошо известных в микробиологии питательные среды – МПА, МПБ, агар–Эндо. По ходу эксперимента часто проводили пересев культур на чистую питательную среду, как в жидком, так и твердых. Существуют очень много факторов, которые влияют на питательные среды, исходя из этого зависит и жизнедеятельность микроорганизмов, обмен веществ. Тут же изучали род микроорганизма до и после посева, сразу проводили контроль тест-микроба и окрашивали по методу Грама, иммерсионной системой устанавливали вид бактерий: *E.coli*, *St.epidermidis*, *Ps.aeruginosa*, *Pr.vulgaris*, *Salmonella cholera suis*. Во время изучения этих тест-микробов проводили опыты на твердых и жидких средах. Старались получить строго изолированные колонии. Выросшие колонии на чашки Петри сперва изучали невооруженным глазом, а в последствии проводили окрашивание по Граму и исследовали под микроскопом. При визуальном осмотре изучали контуры, форму, консистенцию, цвет, структуру колоний. Размер колоний оценивали по характеру диаметра.

При оценке *St.epidermidis* образовались золотистые круглые выпуклые непрозрачные колонии. Вокруг колоний стафилококков, образующих лецитиназную активность, образуются зоны помутнения с перламутровым оттенком. Для окончательного установления стафилококка 2–3 колонии переседали в пробирки со скошенным питательным агаром для получения чистых культур. На следующий день делали посева с целью определения их дифференциальных признаков.

Для установления источника госпитальной инфекции выделили чистые культуры стафилококка от больных и бактерионосителей, после чего проводили их фаготипирование с помощью набора типовых стафилофагов устанавливая идентичность фаготипов.

Для выделения культуры бактерий *Ps.aeruginosa* (синегнойная палочка) исследуемый материал заседали на питательный агар в чашки Петри с целью получения изолированных колоний. Посевы инкубировали при 37⁰С в течение суток. Синегнойная палочка образовала круглые плоские слизистые колонии с характерным сине-зеленым пигментом, который диффундирует агар. При бактериоскопии нативных препаратов в "раздавленной" или "висячей" капле, приготовленных из колоний, обнаруживали подвижные и слегка изогнутые палочки, для установления вида популяции чистую культуру, которую идентифицировали по биохимическим признакам. Патогенные штаммы *Ps.aeruginosa* образуют белковые токсины (экзотоксины): гистотоксин, который обладает цитопатическим свойством, и лейкоцидин, лизирующий лейкоциты человека, их обнаруживали постановкой биопробы на белых мышах.

Для выделения культуры бактерий *E.coli* исследуемый материал заседали на одну дифференциально-диагностическую среду – агар Эндо, на которых образовались красные колонии, которых также окрашивали по Граму и изучали под иммерсионной системой микроскопа.

Для установления культуры бактерий рода *Proteus* исследуемый материал вносили в конденсационную воду скошенного в пробирке питательного агара. Посевы инкубировали при 37⁰С в течение 18–20 час. Характерным признаком протей являлся рост снизу, вверх по поверхности скошенного агара. При бактериоскопии препаратов в "висячей" или "раздавленной" капле видны были подвижные палочки.

Эксперименты проводили также на жидких питательных средах. Жидкую питательную среду готовили по рецепту проф. Дж. Начкебия, состоящие из растительных субстанций, а именно из зерновых культур разных сортов, где предусмотрен аминокислотный состав каждого компонента. На основе этой питательной среды готовили агар 1,5–2%.

Для наших опытов мы использовали следующие дезинфицирующие растворы: Наргосепт, Джеллисепт, КОН, NaOH, водный раствор йода, водный раствор бриллиантовой

зелени, тройной раствор (NaOH + формалин + дистиллированная вода), триклован, аниосим, перекись водорода, водный раствор нашатыри, карболовая кислота, перманганат калия, хлорная известь; а также аналоги препарата "Наргосепт".

1) N ₁ – Fe ³⁺ – 50%	2) N ₂ – Fe ²⁺ – 50%	3) N ₃ – (Fe ²⁺ + "M") – 50%
бело-молочного цвета, без запаха, имеет белый осадок;	без цвета, без запаха, раствор непрозрачный;	без цвета, с запахом железа, прозрачный раствор.

В качестве антисептических средств использован – "Триклован", "Аниосим", тройной раствор из состава NaOH + формалин + дистиллированная вода, раствор нашатырного спирта, раствор бриллиантовой зелени.

Эксперимент ставились на 2-х параллельных пробах – опытных и контрольных.

Из полученных данных можно заключить, что лучшим химическим средством против использованных тест-микробов оказались смесь дезинфектантов NaOH и формалина в дистиллированной воде и антисептик "Аниосим".

Что касается "Джелисепта", то его бактерицидный порог считается с 3% концентраций с 1 часовой экспозицией, даже по отношению к протеусу.

Из вышеперечисленных препаратов "Наргосепт" обладает сравнительно слабым бактерицидным и бактериостатическим свойствами.

Против использованных тест-микробов лучший бактерицидный и бактериостатический эффект проявил водный раствор йода. Его 1% водный раствор с 2-х часовой экспозиции губительно действует как на референтные штаммы, так и на микробы изоляты.

На следующем этапе был изучен уровень воздействия лазерного луча на микрофлору мяса бройлера – птицы мясной породы.

Для этой цели был использован гелио-неоновый лазерный луч – длина волны $\lambda=0,6$ микрон, мощностью 25–32 эр вт, 1 м², модифицированным устройством ЛГН–222 красного спектра.

Обрабатывалась поверхность кожи убойного бройлера, а также поверхность на рынке приобретенного окорока с разными экспозициями.

Опытные пробы обрабатывали лазерным лучом с разными экспозициями – 5, 10, 20 мин; контрольные пробы оставили без обработки.

Затем изучили и первые и последние на микробную загрязненность.

3. ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИЦИДНОГО, БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОГО И МУТАГЕННОГО ЭФФЕКТА ДЕЙСТВИЯ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ

3.1. ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИЦИДНОГО И БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ И АНТИСЕПТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ПРОТИВ САНИТАРНО-ПОКАЗАТЕЛЬНЫХ ТЕСТ-МИКРОБОВ (*E.coli*, *St.epidermidis*, *Pr.vulgaris*, *Ps.aeruginosa*, *Salmonella cholera suis*)

Необходимость изучения действия дезинфицирующих и антисептических химических средств связано с тем, что многие патогены вырабатывают факторы устойчивости, связанное с селекционированием резистентных рас из оставшихся в живых клеток микроорганизмов после контакта с дезинфектантами, с чем обязательно следует считаться и имеющиеся до сих пор данные, требуют определенных поправок. Эксперименты были проведены на референтных штаммах тест-микробов и изолятов тех же видовых представителей – эшерихии, протей, стафилококков, синегнойной палочки и Сальмонелл.

Изоляты были получены методом седиментации на твердых питательных средах из воздуха животноводческих помещений экспериментального хозяйства нашего университета. Изучали основные биологические свойства выделенных культур, сопоставляя их со свойствами референтных штаммов (*Ps.aeruginosa* 1019, *St.epidermidis* И-209, *E.coli* М-17, *Pr.vulgaris* 12, *Salmonella cholera suis*).

В качестве антисептических средств использовали – "Триклозан", "Аниосим", тройной раствор из состава NaOH + формалин + дистиллированная вода, водный раствор нашатыря, раствор бриллиантовой зелени.

Опыты ставились на четырех тест-микробах: стафилококках, эшерихиях, протеусе и синегнойной палочке, сальмонелл.

На упомянутых бактериях в пределах критического порога были изучены антисептические и дезинфицирующие свойства химических средств. И к тому же надо учесть, что могут возникнуть мутагенные и бактерицидные пороги, которые дадут нам возможность внести коррекцию в уже установленные концентрации. Изучение этого вопроса дает возможность избежать те ошибки, которые связаны с ростом, развитием и сохранением жизнедеятельной способности микроорганизмов. Полученные результаты дают нам возможность глубже вникнуть в вопросы дезинфекции, стерилизации, пастеризации и в методы обезвреживания продуктов питания и т.д. Для получения чувствительности и стойкости бактерицидного и бактериостатического воздействия в пределах определенной концентрации и экспозиции антисептических и дезинфицирующих средств в опытах применяли референтные штаммы и полученные из окружающей среды изоляты стафилококков, эшерихиев и протеуса, синегнойной палочки, сальмонелл. Из референтных штаммов были взяты стафилококковый №209 штамм, Э.коли – штамм М-17, протеуса – штамм №1019 и Кл.перфрингенс – штамм №242 типа E, а воздействовали на них следующими химическими средствами: Наргосептом (представлен одной из химических лабораторий для определения активности), Джелисептом (импортный препарат, применяемый как объект сравнения с Наргосептом), гидроксидом натрия и водным раствором йода.

Действия вышеуказанных препаратов изучали с малых концентраций (0,5%) с 10 минутной экспозицией; по мере роста культуры – увеличивали концентрацию и время воздействия дез.растворов как на референтные штаммы, так и на полученные из объектов окружающей среды – изоляты, выделенные из воздуха свиноводческой фермы учебного хозяйства университета (ферма принадлежит ООО "Крцаниси" – заведующий Дж.Каландадзе), а также материалы брали из стационара (Грузинская центральная клиническая железнодорожная больница им. акад. Е. Пипиа).

Из вышеперечисленных препаратов "Наргосепт" обладает сравнительно слабым бактерицидным и бактериостатическим свойствами. Только на стафилококках был зафиксирован бактерицидный эффект Наргосепта и то, в очень низких концентрациях от 0,5 до 1%, может показаться парадоксом, но этот препарат в высоких концентрациях (10–15%) с 2 часовой экспозицией и больше – теряет свои свойства, что дает повод думать о том, что активным началом является фосфат железа [$Fe_3(PO_4)_2$], который действует на бактерии как стимулятор, или активность препарата снижается в период хранения и разрушается (отметим, что соблюдали правила хранения данного препарата).

Что касается Джелисепта, то его бактерицидный порог считается с 3% концентрации с 1 часовой экспозицией, даже по отношению к протеусу из всех применяемых нами тест-микробов. Особенно резистентным оказался протеус по отношению к гидроксиду калия (KOH), 5% раствор с 2 часовой экспозицией, который дает бактерицидный эффект.

Против использованных тест-микробов лучший бактерицидный и бактериостатический эффект проявил водный раствор йода. Его 1% водный раствор с 2 часовой экспозицией губительно действует как на референтные штаммы, так и на микробы изоляты.

Особенно надо отметить, что выделенные из объектов окружающей среды бактерии (выбранные из группы тест-микробов) проявляют высокую резистентность по сравнению с референтными штаммами. Это явление, по нашему мнению, связано с частым контактом вышеупомянутых микроорганизмов с антисептическим и дезинфицирующими средствами и естественным отбором селективных мутантов.

Тут резистентность протейсы и синегнойной палочки превосходит спорообразующих микроорганизмов (*Cl.perfringens*), что требует большого внимания медиков и ветеринаров при проведении дезинфекции.

3.2. ИЗУЧЕНИЕ БАКТЕРИЦИДНОГО И БАКТЕРИОСТАТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ НА ИЗОЛЯТЫ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Для наших опытов из объектов окружающей среды мы получали изоляты и референтные штаммы золотистого стафилококка – штамм №209, Э.коли – штамм М17, протейсы – штамм №1019, сальмонелл, а воздействовали на них следующими средствами: перекисью водорода, формалином, гидроксидом калия, карболовой кислотой.

Действие дезинфектантов изучили с малых концентраций, по мере роста культуры – увеличивали концентрацию раствора и экспозицию.

Для постановки опытов применяли разработанные на кафедре зоогигиены и экологии питательные среды (жидкие и твердые), которые готовятся на основе растительных субстанций, а именно, из разных сортов зерновых культур (автор проф. Дж. Начкебия).

Изоляты, полученные из окружающей среды, в частности из воздуха ферм птицеводства и свиноводства учебного хозяйства нашего университета методом осаждения (ферма принадлежит ООО "Вит Джорджия"), а также из стационара (Грузинская центральная клиническая железнодорожная больница им. акад. Е. Пипиа).

Дезинфекционный раствор формалина брали в следующих концентрациях: 1, 1,5, 2, 3% с 30 минутной, 2 часовой экспозициями. Раствор 1% формалина с 1 часовой экспозицией дал бактерицидный эффект на все вышеупомянутые тест-микробы.

А дезинфектант фенол применяли с 1, 1,5 и 2,5% концентрациями с 30 минутной, 1 и 2 часовыми экспозициями. В результате опытов получили следующую картину:

1 и 1,5% концентрации с 30-минутной, 1 и 2-часовыми экспозициями давали рост все микробы. Действие бактерицидного порога начинается с 2% концентрацией с 1 часовой экспозицией как на *E.coli*, так и на *St.epidermidis* и *Pr.vulgaris*, *Ps.aureginosa*, *Salmonella cholera suis*.

Что касается перекиси водорода (H_2O_2) и едкого калия (KOH), то при воздействии их в низких (0,5% и 1,5%) концентрациях с 30-минутной, 1 и 2-часовыми экспозициями на тест-микробы – наблюдался их обильный рост. Только 3% раствор данных химических средств давал бактерицидный эффект.

Надо отметить, что 3% растворы дезинфектантов – едкого калия и перекиси водорода с 1-часовой экспозицией давали бактерицидный эффект.

Для проведения опытов имели как опытные, так и контрольные пробы. Наблюдения проводились в течение 10 дней.

По полученным результатам мы можем сделать вывод: из вышеперечисленных дезинфектантов наиболее эффективно действует 1% раствор формалина с 1 часовой экспозицией даже на резистентный микроб протейсы.

Таблица 1

Действие антисептических и дезинфицирующих средств на санитарно-показательных тест-микробов

Антисептические и дезинфицирующие средства	Концентрация и экспозиция химических веществ															
	Конц. %	Культуры тест-микробов														
		Pr.vulgaris 1019			St.epidermidis U-209			E.coli M-17			Ps.aeruginosa 12			Salmonella cholera suis		
		30 мин	1 ч	2 ч	30 мин	1 ч	2 ч	30 мин	1 ч	2 ч	30 мин	1 ч	2 ч	30 мин	1 ч	2 ч
"Триклосан"	1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
"Аниосим"	0,5	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Бриллиантовая зелень	0,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1,5	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Тройной раствор NaOH 3% формалин 3% дист. Вода	по 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Водный раствор нашатыря	0,5	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1,5	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	

Таблица 2

Действие антисептических и дезинфицирующих средств на санитарно-показательных тест-микробов

Антисептические и	Концентрация и экспозиция химических веществ					
	Конц.	Культуры тест-микробов				
		Pr.vulgaris 1019	St.epidermidis	E.coli M-17	Ps.aeruginosa 12	Salmonella cholera suis

дезинфицирующие средства	%				U-209											
		30 мин	1 ч	2 ч	30 мин	1 ч	2 ч	30 мин	1 ч	2 ч	30 мин	1 ч	2 ч	30 мин	1 ч	2 ч
Формалин	1	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	1,5	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	2	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Карболовая кислота	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Перекись водорода	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
Гидроксид калия	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-

Воздействие дезинфицирующих растворов: перекиси водорода, едкого калия и карболовой кислоты на стафилококки, эшерихии, протейсы, синегнойные палочки и сальмонеллы – были менее эффективными. Только увеличение концентрации вышеуказанных дезинфицирующих растворов до 3% с 1-часовой экспозицией давал бактериоцидный эффект, а именно:

1. Лучшим бактериоцидным действием по отношению к тест-микробам обладает формалин (1% раствор с 1-часовой экспозицией).
2. Бактериоцидное действие 1% раствора фенола наступает с 1-часовой экспозицией.
3. В опыте использованные тест-микробы оказались более устойчивы к растворам перекиси водорода и едкого калия. Эффект данных дез.средств дают растворы только с 3% концентрацией с 1-часовой экспозицией.

Бактериоцидный эффект на тест-микробы был получен антисептиком "Триклозан" после 1 часа воздействия.

Антисептик "Аниосим" в концентрации 0,5 и 1% при воздействии от 30 минут до 2-х часов убивал клетки использованных культур.

При применении смеси двух дезинфектантов – NaOH 3% и формалина 3% в дистиллированной воде давали бактериоцидный эффект экспозиции 30 минут как на референтные штаммы, так и изоляты.

Нашатырный спирт был использован в концентрации 1, 1,5, 2 и 3% с экспозицией 30 минут, 1 и 2 часа. Растворы нашатырного спирта в концентрации 1, 1,5 и 2% с экспозицией 2 часа не оказывали бактериального воздействия на тест-микробы, лишь только 3%-ный раствор убивал клетки тест-микробов после 2-х часового воздействия.

Водный раствор бриллиантовой зелени применяли в концентрации 1, 1,5, 2 и 3% с экспозицией 30 мин, 2 часа. Из перечисленных концентраций эффективным оказался 2%-ный раствор при экспозиции 30 минут. Данные эксперимента изложены в таблице 1, 2.

Из полученных данных можно заключить, что лучшим химическим средством против тиспользованных тест-микробов оказались смесь дезинфектантов NaOH и формалина в дистиллированной воде и антисептик "Аниосим".

3.3. ИЗУЧЕНИЕ ИЗ ГРУППЫ ПРЕПАРАТА "Nargosept" – ТРЕХ ХИМИЧЕСКИХ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ ПРОТИВ РЕФЕРЕНТНЫХ ШТАММОВ (E.coli, St.epidermidis, Pr.vulgaris, Ps.aeruginosa, Salmonella cholerae suis)

Также в наших опытах мы изучили из группы препарата Nargosept три химических дезинфектанта.

- 1) N₁ – Fe³⁺ – 50%
- 2) N₂ – Fe²⁺ – 50%
- 3) N₃ – (Fe²⁺ + "M") – 50%

N₁ – бело-молочного цвета без запаха

N₂ – без цвета, без запаха

N₃ – без цвета, с запахом железа

В пробирках делает N₁ – белый осадок

N₂ – раствор непрозрачный

N₃ – прозрачный

Эксперименты провели на всех 5-ти тест-микробах: E.coli, St.epidermidis, Pr.vulgaris, Ps.aeruginosa, Salmonella cholerae suis. Опыты ставили на опытных и контрольных пробах.

Дезинфектанты изучали с малых концентраций, при росте культуры процентное содержание увеличивали. Опыты проводили и на твердой и на жидкой питательной среде,

также на скошенном агаре. При процентном увеличении культуры давали обильный рост. Процентная концентрация в нашем опыте было от 0,5% с экспозицией от 20 мин до 1 часа.

При возрастании концентрации дезинфектанта тест-микробы давали обильный рост как на чашке Петри, так и на скошенном агаре.

После воздействия на тест-микробы вышеуказанных дез.растворов низких концентраций (0,5%–3%) нарушаются процессы питания бактерий, высоких концентрациях повышается потребление дез.растворов, содержащих элементы: Fe, P. Низкое процентное содержание нарушает структуру клеток и клеточных стенок, происходит структурные изменения цитоплазмы и они разрушаются до мелких гранул.

Бактериоцидный эффект препаратов против грамотрицательных бактерий *E.coli*, *Pr.vulgaris*, *Ps.aeroginosa*, *Salmonella cholera suis* в высоких концентрациях не целесообразен, не происходит разрушение бактерий, как ни странно. Тут есть место реакции разложения, когда Fe в свободном положении действует как фактор роста. Микроорганизмы активно вступают в реакцию с компонентами и дают множественные колонии, а то и обильный рост.

Процентное соотношение по мере возможности мы повышали от 5% до 10% с экспозицией времени 2 часа.

Результаты опытов указаны в графиках 1, 2, 3.

Действие препарата Nargosept против тест-микробов

График 1

(*Pr.vulgaris*, *Ps.aeroginosa*, *Salmonella cholera suis*)

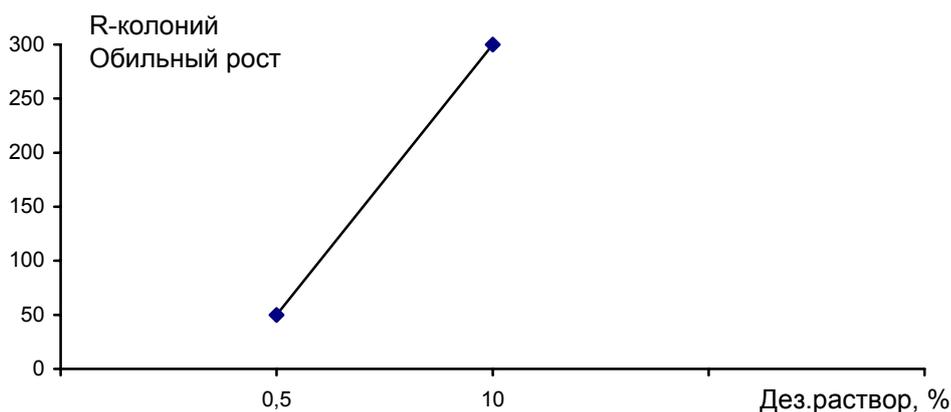


График 2

(*E.coli*)

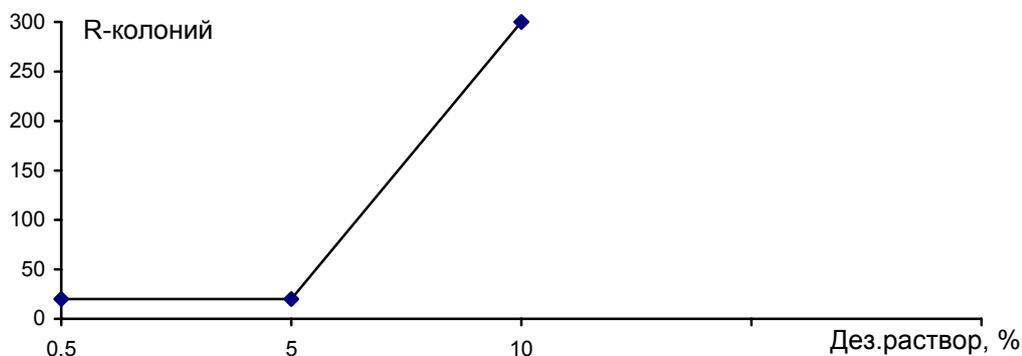
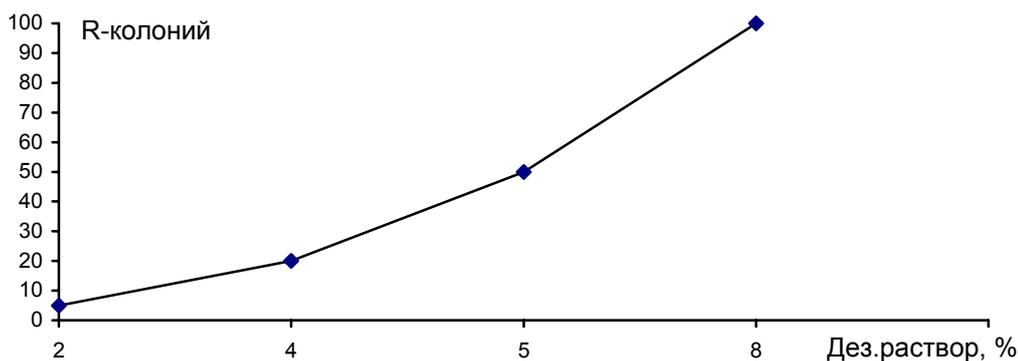


График 3

(*St.epidermidis*)



3.4. ИЗУЧЕНИЕ УРОВНЯ ЛАЗЕРНОГО ЛУЧА НА МИКРОФЛОРУ МЯСА БРОЙЛЕРА – ПТИЦЫ МЯСНОЙ ПОРОДЫ

На следующем этапе был изучен уровень воздействия лазерного луча на микрофлору мяса бройлеров – птицы мясной породы.

Для этой цели был использован гелио-неоновый лазерный луч – длина волны $\lambda=0,6$ микрон, мощностью 25–32 эр вт, 1 м², модифицированным устройством ЛГН–222 красного спектра.

Обрабатывалась поверхность кожи убойного бройлера, а также поверхность на рынке приобретенного окорока с разными экспозициями.

Из тушки бройлеров взяли по 40 контрольных и опытных проб, а у купленных окороков – по 10 проб контрольных и опытных.

Опытные пробы обработали лазерным лучом с разными экспозициями – 5, 10, 20 мин; контрольные пробы оставили без обработки. Затем изучили и первые и последние на микробную загрязненность.

В качестве питательных средств применяли среды, разработанные на кафедре и агар Эндо – для энтеробактерий (эшерихий, сальмонелл).

Пробы (кожа и подкожная ткань толщиной не более 2 мм), в размере 5×5 мм, срезали и с обработанной и облученной поверхностью прикладывали к вышеуказанным средам, разлитым в чашках Петри. Параллельно такие же пробы вносили в жидкие питательные среды для аэробов и анаэробов. Надо отметить, что срезы таких размеров прикладывали к предметным стеклам и оставляли отпечатки материала. Аналогично обрабатывали и контрольные пробы.

Исследуемый материал инкубировали в термостате (+37⁰С – 48–72–96 часов). Рост микроорганизмов в жидких и твердых питательных средах в контрольных наблюдался через 48 часов (в опытных – через 72–96 часов).

На чашках Петри разлитые твердые питательные среды разделили на две равные части: одна – контрольная, а вторая – опытная. Из опытных проб общее число колоний составляло (из 40 образцов) – 25, из контрольных – 180 (из 40 образцов). На основании идентификации выросших колоний получили следующую картину:

Из контрольных – белые и лимонные стафилококки – 64%, эшерихии – 17%, сальмонеллы – 5%, сенная палочка – 6%, картофельная палочка – 4% (эти две последние – гнилостные бактерии – энергично разрушают белки), клостридии – 3%, дрожжевые грибы – 1%, протеус – 1%.

Из опытных – белые и лимонные стафилококки – 64%, эшерихии – 8%, сальмонеллы – 4%, клостридии – 4%, протеус – 8%, сенная палочка – 12%.

Для культивирования клостридий применили твердую питательную среду Вильсона-Блери.

Весь спектр видового состава выделенных микроорганизмов смотрите в нижеприведенной таблице 3.

Таблица 3

Видовой состав микроорганизмов, выделенных из кожи и подкожной ткани убойной птицы, на твердых питательных средах

Виды выделенных микроорганизмов	Контрольный		Опытный	
	Кол-во микробов из 40 пробирок	%	Кол-во микробов из 40 пробирок	%
Стафилококки	115	63,88	16	64
Эшерихии	30	16,66	2	8
Сальмонеллы	9	5	1	4
Сенная палочка	10	15,59	3	12
Картофельная палочка	7	3,88	–	–
Клостридии	5	2,77	1	4
Дрожжевые грибы	2	1,11	–	–
Протеус	2	1,11	2	8
В с е г о	180	100	25	100

Видовой состав микрофлоры, изолированной из биологических тканей одинаков в твердых и жидких питательных средах.

В изготовленной на нашей кафедре жидкой питательной среде отмечался интенсивный рост выделенных микробных культур с довольно высоким уровнем биомассы: в среднем $4,5 \cdot 10^9$ микробных тел в 1 мл. Это касается культур выделенных из контрольных проб, а рост культур, изолированных из опытных образцов резко снижается и вегетация отмечается через 72–96 часов. Концентрация микробных клеток в 1 мл не превышала $5 \cdot 10^8$.

Надо отметить, что из контрольных проб в жидких анаэробных питательных сред был выделен *Cl.perfringens* и 5 культур факультативных аэробов, которые проверили на белых мышах. Культуры оказались атоксигенными, что помешало нам установить их типичность, но из-за совпадения других тестов, мы их причислили к упомянутому виду.

При микроскопировании отпечатков проб, окрашенных по Граму, встречаем клетки той же морфологии, что и в питательных средах обнаруженных культур. В облученных пробах количество микробов гораздо малое.

По сравнению с контрольными, в опытных мазках зафиксировали 31 микробную клетку, а в контрольных – 157.

Итого, ясно видно, что лазерные лучи губительно влияют на микробные клетки, но полная стерилизация субстрата не достигнута, но несмотря на это, значительно занижена энергия роста микроорганизмов, выделенных из опытных проб.

3.5. МУТАГЕННЫЙ ЭФФЕКТ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ И АНТИСЕПТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ

Эксперименты проводили на кафедре зоогигиены и экологии. Использовали жидкие и твердые питательные среды.

Жидкую питательную среду готовили из растительных субстратов, как указывали выше.

Твердую питательную среду использовали как среду Эндо для идентификации *E.coli*, а также агар 2%.

Проводили контроль тест-микробов, окрашивали по Граму и под иммерсионной системой убеждались в их идентичности.

Тест-микробы *E.coli*, *Ps.aeruginosa*, *Pr.vulgaris*, *Salmonella cholera suis* в течении 5 лет находились в пробирках с дезинфектантом. Они не утратили свою жизнедеятельность. Бактериальные клетки проявили устойчивость к дезинфектантам (таблица 4, 5).

Таблица 4

Вид микроорганизма	Водный раствор нашатыря	Аниосим
	4%	2%
<i>E.coli</i> 14.XI.00–25.X.05	Множественные колонии	R-формы ≈ 50
<i>Ps.aeruginosa</i> 1.IX.00–25.X.05	Множественные колонии	Множественные колонии
<i>Pr.vulgaris</i> 1.IX.00–25.X.05	Множественные колонии	Множественные колонии

Таблица 5

Вид микроорганизма	Nargosept		Gelisept	
	2%	3%	2%	3%
<i>E.coli</i> 3.X.99–15.1.99	Множественные колонии 100	R-формы колонии 50	Стерильны	Стерильны
<i>St.epidermidis</i> 9.XI.98–15.1.99	R-формы множест. колонии	Обильный рост	Стерильны	Стерильны
<i>Pr.vulgaris</i> 14.X.98–15.1.99	Обильный рост	Обильный рост	Стерильны	Стерильны
<i>Pr.vulgaris</i> 23.IX.98–15.1.99	Обильный рост		Стерильны	Стерильны

Приобретаемая лекарственная устойчивость возникает у отдельных представителей данного вида бактерий только в результате изменения их генотипа. Возможны два варианта генетических изменений. Один из них связан с мутациями в тех или иных генах бактериальной хромосомы, вследствие которых атакуемого гена перестает быть мишенью для данного дезинфектанта. Это происходит либо вследствие изменения структуры белка, либо потому, что он становится недоступным для дезинфектанта.

В другом случае бактерии становятся устойчивыми к дезинфектантам или даже сразу к нескольким дезинфектантам благодаря приобретенной лекарственной устойчивости не существует. Однако приобретая устойчивость к дезинфектанту, а тем более сразу к нескольким дезинфектантам, такие бактерии получают наивыгоднейшие преимущества: благодаря селективному давлению дез.растворов происходит вытеснение чувствительных к ним штаммов данного вида, а дезинфектантоустойчивые варианты выживают и начинают играть главную роль в эпидемиологии данного заболевания. Именно они и становятся источниками формирования тех типов бактерий, которые обеспечивают устойчивость.

На каждый новый дезинфицирующий раствор они давали адекватный ответ: появлялись резистентные к нему штаммы, которые и сводили на нет биологическую активность этих препаратов. Так было и так будет всегда. С этим нельзя не считаться и этого нельзя не учитывать. Поэтому следует постоянно искать пути преодоления этого препятствия, ибо пока существуют инфекционные болезни, их надо уметь эффективно устранять.

Эксперименты показывают, что раньше всего гены дезинфицирующей устойчивости к каждому новому дезинфектанту появляются у клинических штаммов, а затем начинается их дальнейшая циркуляция в природе.

Биохимические изменения у тест-микробов, вызванные после контакта с дезинфектантами, сравнивали с биохимическими показателями исходных культур. До начала эксперимента культуры *E.coli*, *St.epidermidis*, *Pr.vulgaris*, *Ps.aeruginosa*, *Salmonella cholera suis* ферментировали ряд сахаров:

E.coli ферментировал: мальтозу, арабинозу, глюкозу, сахарозу, маннит, ксилозу, сорбит, лактозу, галактозу, рамнозу, разжижают желатин, салицин.

St.epidermidis ферментировал: мальтозу, арабинозу, глюкозу, глицерин, сахарозу, ксилозу, сорбит, лактозу, галактозу, рамнозу.

Pr.vulgaris ферментировал: глюкозу, мальтозу, сахарозу, ксилозу, сорбит, лактозу, галактозу, рамнозу, уреазу, разжижает желатин.

Ps.aeruginosa ферментировал: глюкозу, галактозу, арабинозу, ксилозу, индол не образует, желатин разжижает, рамнозу, сорбит.

Salmonella cholera suis ферментировал: лактозу, салицин, желатин разжижает, малонат, арабинозу, глюкозу, манит, рамнозу.

Изучили тест-микробы, которые были в контакте с дезинфектантом "Наргосепт" 2–3%, а "Джелисепт" 2–3%, где времени 2 месяца от контакта с препаратом.

Также изучили тест-факторы на биохимические свойства, которые были в контакте с дезинфектантом 5 лет.

E.coli + водный раствор нашатыря, 3%

E.coli + "Аниосим" – 2%

Pr.vulgaris + водный раствор нашатыря, 3%

Pr.vulgaris + "Аниосим" – 2%

Ps.aeruginosa + водный раствор нашатыря, 3%

Ps.aeruginosa + "Аниосим" – 2%

E.coli потерял свойства ферментации лактозы, сахарозы, глюкозы, мальтозы.

Pr.vulgaris потерял свойства ферментации лактозы, сахарозы, глюкозы, мальтозы, дульцита, сорбита, манита, салицина.

Salmonella cholera suis потерял свойства ферментации лактозы, сахарозы, глюкозы, мальтозы.

Ps.aeruginosa потерял свойства ферментации лактозы, сахарозы, ксилозы, глюкозы, мальтозы, сорбит, салицин, не разжижает желатин; ферментирует дульцит, манит.

Исходя из выводов наших опытов тест-микробы продолжают свою жизнедеятельность. Мы изучили биохимические свойства и сравнили с исходными. Тест-микробы теряли способности ферментации, что говорит о мутационных изменениях микробных клеток.

Полученные данные заслуживают внимания ветеринаров и медиков, учесть результаты опытов, где даны резистентность микробов.

ВЫВОДЫ

1. Бактерицидная эффективность препаратов "Наргосепт", "Джелисепт", раствора едкого натрия и водного раствора йода в разных концентрациях и времени экспозиции против санитарно-показательных микроорганизмов группы эшерихий, стафилококков, протеус и синегнойной сальмонеллы палочки как на референтных штаммах, так и выделенных из объектов внешней среды лучшими бактерицидным эффектом обладали водный раствор йода (2%-ный, экспозиция 1 час), сравнительно меньше – "Джелисепт" (3%-ный, экспозиция 1 час).
2. Бактерицидный эффект против использованных тест-микробов оказались смесь дезинфектантов NaOH и формалина в дистиллированной воде и антисептик "Аниосим".
3. Бактерицидный эффект был получен на тест-микробы антисептиком "Триклозан" 1%, после 1 часа действия.
4. При применении смеси – тройной раствор NaOH 3% и формалина 3% в дистиллированной воде давали бактерицидный эффект при экспозиции 30 минут как на референтных штаммах, так и изоляты.

5. Бактерицидный эффект дезинфектантов – перекиси водорода, формалина, едкого калия и карболовой кислоты отмечен при контакте с тест-микробами – E.coli, St.epidermidis, Ps.aeruginosa, Pr.vulgaris, Salmonella cholera suis при концентрациях и времени действия – формалина 1%, перекиси водорода и едкого калия – 3% – 1 час, карболовой кислоты 2% – 1 час.
6. Отдельные тест-микробы, которые хранились дезинфектантом, а также контактировали с ним продолжали свою жизнедеятельность. Однако они теряли биохимические свойства в сравнении с исходными, что говорит о мутационных изменениях микробных клеток.
7. Поперечнополосатая мышца убойной птицы значительно загрязнена стафилококками, энтеробактериями, клостридиями, бактериями гниения – сенной палочкой, картофельной палочкой и дрожжевыми грибами.
8. Количество микроорганизмов, выделенных из поперечно-полосатой мышцы убойной птицы, обработанной лазерным лучом, гораздо меньше, чем микрофлора контрольных проб. Это подтверждает факт, что лазер разрушающе действует на клетки микроорганизмов.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Нами проведенные исследования дают основания утверждать, что микроорганизмы более устойчивы к дезинфектантам в сравнении с литературными данными.
2. Мутагенные изменения, происходящие в бактериальной клетке, являются следствием действия дезинфектанта на пороге их жизнедеятельности. Микроорганизмы находятся в "дремлющем состоянии", при благоприятных условиях они опять таки могут вызвать патогенные процессы.

СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ, ОПУБЛИКОВАННЫЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мамулашвили И., Сихарулидзе Ц., Начкебия Дж., Джикия Л. "Изучение видовой принадлежности микроорганизмов выделенных из кожи и подкожной клетчатки тушек птиц обработанными лазерными лучами". Сборник научных трудов ГГЗВА. Т.IV. Тбилиси, 1999, с.283–288 (на груз. языке).
2. Сихарулидзе Ц., Начкебия Дж., Берая Д., Бакурадзе М. "Изучение бактериоцидной эффективности некоторых антистатических и дезинфицирующих средств". Проблемы аграрной науки. Сборник научных трудов. т. XIII. Тбилиси, 2001, с.338–341 (на груз. языке).
3. Сихарулидзе Ц., Начкебия Дж., Шаматава Т. "Изучение бактериоцидной и бактериостатической эффективности формалина, перекиси водорода, едкого калия и карболовой кислоты на санитарных тест-микробах". Сборник научных трудов, посвященных 70-летию академии и 100-летию со дня рождения профессора Д. Агладзе. т.IX, ч.II, Тбилиси, 2002, с.190–194 (на груз. языке).
4. Сихарулидзе Ц., Начкебия Дж. "Изучение бактериоцидного действия дезинфицирующих и антисептических средств против санитарно-показателей тест-микробов". Грузинский государственный зоотехническо-ветеринарный университет. Сборник научных трудов, посвященных 90-летию со дня рождения проф. Н. Гоциридзе, т.LXI. Тбилиси, 2003, с.242–245.