

TESTOVÁNÍ BIOCIDNÍ ÚČINNOSTI PŘÍPRAVKU NA BÁZI ELEKTROCHEMICKY AKTIVOVANÝCH DESINFEKČNÍCH ROZTOKŮ

Hana Nejeschlebová¹, Jan Říha¹, Marcela Klimešová²,
Monika Morávková³, Ivana Kucharovičová⁴

¹ Bentley Czech s.r.o., Praha

² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

³ Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno

⁴ Státní veterinární ústav, Jihlava

Biocidal efficacy testing of a preparation based on electrochemically activated disinfectant solutions

Abstrakt

V rámci této práce byla stanovena biocidní účinnost desinfekčního přípravku na bázi elektrochemicky aktivovaných desinfekčních roztoků (ECA) s názvem neuthox vyrobeného generátorem desinfekce T-10 Agro (DCW, Dánsko). Stanovení účinnosti desinfekčního přípravku bylo provedeno kvantitativní suspenzní metodou. Byla prokázána biocidní účinnost pro koncentrace 80 %, 50 %, 30 % a 10 % přípravku neuthox na všechny testované kmeny mikroorganismů (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Candida krusei*) při kontaktních časech 10 minut a 60 minut. U *E. coli* a *C. krusei* byla prokázána rovněž biocidní účinnost koncentrace 5 % při obou kontaktních časech, u *E. coli* byl navíc prokázán baktericidní účinek 3% koncentrace při kontaktním čase 60 minut. Testování stability obsahu volného chloru poukazuje na vhodnost využití desinfekce neuthox zejména pro přímé dávkování z generátoru nebo pro rychlou spotřebu.

Klíčová slova: ECA, neuthox, biocidní účinek, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Candida krusei*

Abstract

In this study biocidal efficacy of electrochemically activated (ECA) disinfectant called neuthox was determined. Neuthox was produced by disinfection generator T-10 Agro (DCW, Denmark). The testing was done using quantitative suspension method. 80%, 50%, 30% and 10% neuthox showed biocidal effect against all tested microorganisms (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Candida krusei*) at both contact times (10 minutes,

60 minutes). Five percent neuthox showed biocidal effect against *E. coli* and *C. krusei* at both contact times, 3% neuthox was effective against *E. coli* at 60 minutes contact time. Free chlorine stability testing showed that neuthox is suitable for direct dosage from disinfectant generator or for quick use after production.

Key words: ECA, neuthox, biocidal efficacy, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis*, *Candida krusei*

Úvod

Chlor a jeho chemické sloučeniny jsou považovány za účinné desinfekční prostředky s celým spektrem využití. Se zvyšujícími se požadavky na šetrnost k životnímu prostředí a bezpečnost práce nacházejí stále širší uplatnění elektrochemicky aktivované desinfekční roztoky (ECA), jejichž výroba může za pomoci generátoru desinfekce probíhat přímo v místě použití. Na rozdíl od konvenčních chemikálií odpadá v případě ECA manipulace s nebezpečnými látkami a nutnost tyto látky skladovat (např. chlornan sodný)⁽¹⁾. Výroba ECA desinfekcí probíhá na principu elektrolýzy solanky a jako vstupní suroviny jsou tak potřeba pouze chlorid sodný a voda. Elektrolýza solanky je redoxní reakce, při které se na anodě tvoří kyselina chlorná a chlornanový anion a na katodě hydroxid sodný a peroxid vodíku⁽²⁾.

Hlavní složka ECA roztoků, kyselina chlorná, je nejsilnější oxidační agens ze všech chlorových sloučenin⁽³⁾. Již nízké koncentrace kyseliny chlorné mají biocidní účinek na široké spektrum mikroorganismů⁽⁴⁾. Desinfekce na bázi ECA roztoků nachází využití v řadě odvětví, včetně zemědělské prvovýroby (desinfekce napájecí vody, stájí, desinfekce paznehtů zvířat, predip, postdip)⁽⁵⁾ a potravinářského průmyslu (desinfekce provozní vody, odstranění biofilmu z potrubních systémů, oplach potravin)^(5, 6, 7). Bylo zjištěno, že použití kyselého a zásaditého ECA roztoku při centrálním proplachu dojíren je ekvivalentní aplikací konvenčních chemikálií⁽⁷⁾. Desinfekce napájecí vody ECA roztokem rovněž vedla k redukci průměru dojného skotu, snížení jejich celkové nemocnosti a tím zlepšení mléčné užitkovosti⁽⁵⁾.

Jedním z příkladů ECA desinfekce je biocidní přípravek neuthox vyráběný generátorem desinfekce od společnosti Danish Clean Water (Dánsko). Generátory řady T-10 Agro produkují neuthox o obsahu 200 mg/l ± 10 %. Výrobce doporučuje 3% dávkování neuthoxu pro aplikace v chovech hospodářských zvířat včetně skotu⁽⁸⁾.

Cílem této studie bylo ověřit biocidní účinnost ECA desinfekčního přípravku neuthox vyrobeného generátorem T-10 Agro a zjistit stabilitu obsahu volného chloru jako parametru definujícího účinnost této desinfekce. Pro testování byly vybrány mikroorganismy vyskytující se v prostředí chovů hospodářských zvířat s potenciálem kontaminovat napájecí vodu, způsobovat onemocnění zvířat (mastitid skotu) a kontaminovat potravinové řetězce.

Materiál a metodika

Stanovení účinku desinfekčního přípravku neuthox vycházelo z ČSN EN 1040⁽⁹⁾ a ČSN EN 1650⁽¹⁰⁾.

Testovaný produkt - neuthox

Biocidní přípravek neuthox byl vyroben generátorem desinfekce T-10 Agro (DCW, Dánsko) na pracovišti firmy Bentley Czech s.r.o. Obsah volného chloru (kyselina chlorná a chlornanový anion) přípravku neuthox činil v době testování biocidní účinnosti 176 mg/l ± 10 %, pH činilo 7,1.

Příprava koncentrací testovaného produktu

Ředěním sterilní destilovanou vodou byly připraveny koncentrace testovaného produktu tak, aby jeho konečná koncentrace v testu činila 80 %, 50 %, 30 %, 10 %, 5 %, 3 % a 1 %.

Testované mikroorganismy

S. aureus CCM 2022, *E. coli* CCM 4517, *E. faecalis* CCM 4224, *Str. agalactiae* CCM 6187 (Česká sbírka mikroorganismů, MU, Brno) a *C. krusei* 1-1 M2 (Sbírka mikroorganismů VÚM, Praha).

Příprava testovací suspenze

Z 24hodinových (bakterie) / 48hodinových (kvasinky) kultur testovaných mikroorganismů vykultivovaných na krevním agaru (bakterie) / GKCH (kvasinky) byly ve fyziologickém roztoku připraveny suspenze tak, aby jejich konečná koncentrace obsahovala 1,5-5 x 10⁸ KTJ/ml (bakterie) / 1,5-5 x 10⁷ KTJ/ml (kvasinky).

Stanovení bakteriální koncentrace v okamžiku přidání desinfekce

Z testovací suspenze bylo připraveno ředění 10⁻⁶ a 10⁻⁷ (bakterie) / 10⁻⁵ a 10⁻⁶ (kvasinky), následně byl vyočkován 1 ml z každého ředění na Petriho misku duplicitně a zalit TSA (bakterie) / GKCH (kvasinky) agarem o teplotě 45 °C. Následovala inkubace při 37 °C po dobu 24 hodin (bakteriální kmeny) / 30 °C, 48 hodin (*C. krusei*). Počty kolonií vydělené deseti představují koncentraci bakterií/kvasinek v okamžiku přidání desinfekce k suspenzi (K).

Stanovení bakteriální koncentrace po působení desinfekce

K 1 ml destilované vody (bakterie) / 10 % odstředěného mléka (Skim Milk Powder, HiMedia, Indie; kvasinky) byl přidán 1 ml bakteriální suspenze/suspenze kvasinek, po 2 minutách bylo přidáno 8 ml desinfekce a zkumavka s touto směsí byla vložena do vodní lázně o teplotě 20 °C na dobu 10 minut a 60 minut (kontaktní čas).

Po uplynutí kontaktního času byl odebrán 1 ml směsi a přidán do zkumavky s 1 ml destilované vody a 8 ml thiosíranu sodného (6 mg/l) pro zastavení působení desinfekce.

Po 5 minutách byl ze zneutralizované směsi odebrán 1 ml* a vyočkován duplicitně na Petriho misku a zalit TSA (bakterie) / GKCH (kvasinky) agarem o teplotě 45 °C. Následovala inkubace při 37 °C po dobu 24 hodin (baktericidní účinnost) / 30 °C, 48 hodin (levurocidní účinnost). Počty kolonií (KTJ/ml) získané tímto postupem se vynásobí deseti (P).

Hodnocení biocidní účinnosti

Pro stanovení redukce počtu kolonií (R) účinkem desinfekce při daném kontaktním čase byl odečten logaritmus počtu přeživších kolonií (P) od logaritmu koncentrace mikroorganismů v okamžiku přidání desinfekce (K).

$$\text{Log R} = \text{log K} - \text{log P}$$

Desinfekce má v testované koncentraci a při aplikaci daného kontaktního času baktericidní účinnost, jestliže dojde k poklesu KTJ alespoň o 5 log řádů.

Desinfekce má v testované koncentraci a při aplikaci daného kontaktního času levurocidní účinnost, jestliže dojde k poklesu KTJ alespoň o 4 log řády.

Validace

Testovací podmínky i neutralizátor byly validovány.

Stanovení volného chloru

Desinfekce byla napuštěna do 30litrového kanystru, přepravena do akreditované zkušební laboratoře (Moravská vodárenská, a.s., laboratoř Olomouc) a zde analyzována na obsah volného chloru kolorimetrickou metodou s N,N-dialkyl-1,4-fenyldiaminem (dle ČSN EN ISO 7393-2)⁽¹¹⁾. Stanovení proběhlo v den výroby neuthoxu a poté 7., 14., a 21. den od výroby. Desinfekce byla skladována při pokojové teplotě.

Výsledky a diskuze

Byla prokázána baktericidní a levurocidní účinnost pro koncentrace 80 %, 50 %, 30 % a 10 % biocidního přípravku neuthoxu pro všechny testované mikroorganismy a oba kontaktní časy (10 minut a 60 minut), neboť došlo k poklesu KTJ o více než 5 log řádů u všech bakteriálních kmenů a o více než 4 log řády v případě *C. krusei* (tabulka 1 a 2). U *E. coli* a *C. krusei* byla prokázána účinnost rovněž u koncentrace 5 % pro oba kontaktní časy a u *E. coli* koncentrace 3 % pro kontaktní čas 60 minut. Testovaný kmen bakterie *E. coli* tak vykázal nejvyšší citlivost vůči přípravku neuthox.

Ačkoliv u ostatních mikroorganismů není možné 5% a 3% koncentraci přípravku hodnotit jako účinnou (nedošlo k poklesu o 5 log, resp. 4 log KTJ/ml), lze zejména v případě 5% koncentrace při kontaktním čase 60 minut pozorovat pokles v počtu přeživších kolonií. V případě *S. aureus* došlo k redukcí o 2,46 log KTJ/ml,

* V případě 5% koncentrace testovaného produktu byla nad rámec požadavku normy kromě nultého ředění připravena také řada ředění 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³.

Tab. 1 Výchozí počty kolonií a počty přeživších kolonií po aplikaci různých koncentrací přípravku (log KTJ/ml)

	Kontaktní čas	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Str. agalactiae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. krusei</i>
Testovací směs v okamžiku přidání neuthoxu	0 min	7,36	7,49	7,41	7,18	6,18
Neuthox 80 %, 50 %, 30 %, 10 %	10 min	< 2,15	< 2,15	< 2,15	< 2,15	< 2,15
	60 min	< 2,15	< 2,15	< 2,15	< 2,15	< 2,15
Neuthox 5 %	10 min	> 3,52 (6,00)	< 2,15	> 3,52 (6,04)	> 3,52 (6,00)	< 2,16
	60 min	> 3,52 (4,90)	< 2,15	> 3,52 (4,78)	> 3,52 (4,95)	< 2,15
Neuthox 3 %	10 min	> 3,52	> 3,52	> 3,52	> 3,52	> 3,52
	60 min	> 3,52	< 2,15	> 3,52	> 3,52	> 3,52
Neuthox 1 %	10 min	> 3,52	> 3,52	> 3,52	> 3,52	> 3,52
	60 min	> 3,52	> 3,52	> 3,52	> 3,52	> 3,52

Pozn.: Údaje o počtu přeživších kolonií u 5% koncentrace neuthoxu v závorkách vyjadřují hodnotu zjištěnou provedením desetinasobným ředěním 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} nad rámec požadavku normy ČSN EN 1040.

Tab. 2 Redukce počtu kolonií (log KTJ/ml) po aplikaci různých koncentrací přípravku

	Kontaktní čas	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>Str. agalactiae</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>C. krusei</i>
Neuthox 80 %, 50 %, 30 %, 10 %	10 min	> 5,21	> 5,34	> 5,26	> 5,03	> 4,03
	60 min	> 5,21	> 5,34	> 5,26	> 5,03	> 4,03
Neuthox 5 %	10 min	< 3,84 (1,36)	> 5,34	< 3,89 (1,37)	< 3,66 (1,18)	> 4,03
	60 min	< 3,84 (2,46)	> 5,34	< 3,89 (2,63)	< 3,66 (2,23)	> 4,02
Neuthox 3 %	10 min	< 3,84	< 3,97	< 3,89	< 3,66	< 2,66
	60 min	< 3,84	> 5,34	< 3,89	< 3,66	< 2,66
Neuthox 1 %	10 min	< 3,84	< 3,97	< 3,89	< 3,66	< 2,66
	60 min	< 3,84	< 3,97	< 3,89	< 3,66	< 2,66

Tab. 3 Obsah volného chloru

Stáří desinfekce	Koncentrace volného chloru (mg/l \pm 10 %)
1. den (den výroby)	176
7. den	150
14. den	149
21. den	126

Str. agalactiae o 2,63 log KTJ/ml, *E. faecalis* o 2,23 log KTJ/ml.

Zjištěná biocidní účinnost ne zcela koresponduje s doporučeným 3% dávkováním neuthoxu. Příčinu je možné hledat v odlišnosti testovacích metod, různé citlivosti testovaných kmenů mikroorganismů, ale především skutečnosti, že v reálném prostředí se koncentrace mikroorganismů nenachází v řádech desítek milionů. Pro aplikaci za konkrétním účelem by bylo vhodné provést dodatečné testování s ohledem na podmínky daného prostředí (předpokládaná mikrobiální kontaminace, organické znečištění).

Testování stability obsahu volného chloru (tabulka 3) poukazuje na vhodnost využití desinfekce neuthox zejména pro přímé dávkování z generátoru nebo pro rychlou spotřebu, případně lze využít i desinfekci staršího data výroby, avšak s nutností použít vyšší koncentraci.

Závěr

Byla prokázána baktericidní a levurocidní účinnost pro koncentrace 80 %, 50 %, 30 % a 10 % přípravku neuthox pro všechny testované bakteriální kmeny a *C. krusei* při obou kontaktních časech (10 minut a 60 minut).

U *E. coli* a *C. krusei* byla prokázána účinnost rovněž u koncentrace 5 % při obou kontaktních časech, u *E. coli* byl navíc prokázán baktericidní účinek 3% koncentrace při kontaktním čase 60 minut. Pro aplikaci za konkrétním účelem je nutné provést dodatečné testování s ohledem na podmínky daného prostředí (předpokládaná mikrobiální kontaminace, organické znečištění). V rámci zemědělské prvovýroby připadá v úvahu využití přípravku neuthox např. k desinfekci napájecí vody, stájí, desinfekci struků a paznehtů a v potravinářském průmyslu potom k desinfekci provozní vody či povrchů přicházejících do styku s potravinami. Testování stability obsahu volného chloru poukazuje na vhodnost využití desinfekce neuthox zejména pro přímé dávkování z generátoru nebo pro rychlou spotřebu.

Poděkování:

Příspěvek vznikl za podpory projektů MZe NAZV QK1910092 a MZe RO1420.

Literatura

- (1) Block, M. S. & Rowan, B. G. (2020). Hypochlorous Acid: A Review. *J Oral Maxillofac Surg*, 78(9), 1461–1466. doi: 10.1016/j.joms.2020.06.029
- (2) Jeong, J., Kim, C. & Yoon, J. (2009). The effect of electrode material on the generation of oxidants and microbial inactivation in the electrochemical disinfection processes. *Water Res.* 43(4), 895–901. DOI <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.11.033>.
- (3) Culp, Wesner, Culp. (1986). Handbook of Public Water Systems. Van Nostrand Reinhold Company, New York, NY. ISBN-13: 978-0442215972.
- (4) Wang, L., Bassiri, M., Najafi, R., et al. (2007). Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part I. Stabilized hypochlorous acid: a component of the inorganic armamentarium of innate immunity. *J Burns Wounds*. 6:e5. Published 2007 Apr 11.

- ⁽⁵⁾ Danish Clean Water A/S. *Diary farmer - Perfectly clean water* [online]. [Cit. 5.11.2020]. Dostupné z: <<https://danishcleanwater.com/wp-content/uploads/2020/05/SAL-LS-CS-0002-Env2-Diary-farmer-Perfectly-clean-water.pdf>>
- ⁽⁶⁾ Rahman, S. M., E., Khan, I. & Oh, D.H. (2016). Electrolyzed water as a novel sanitizer in the food industry: Current trends and future perspectives. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15(3), 471–490. DOI doi: 10.1111/1541-4337.12200
- ⁽⁷⁾ Wang, X., Dev, S.R.S., Demirci, A., Graves, R. E. & Puri, V. M. (2013). Electrolyzed Oxidizing Water for Cleaning-In-Place of Milking Systems on Dairy Farms – Performance Evaluation and Assessment. *Appl. Eng. Agric.* 29(5), 717–726. doi 10.13031/aea.29.10099 717
- ⁽⁸⁾ Danish Clean Water A/S (2008). The T-10 Agro series - data sheet.
- ⁽⁹⁾ ČSN EN 1040. Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení základního baktericidního účinku chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik - Metoda zkoušení a požadavky (fáze 1). Praha: Český normalizační institut, 2006. 44 s.
- ⁽¹⁰⁾ ČSN EN 1650. Chemické dezinfekční přípravky a antiseptika - Kvantitativní zkouška s použitím suspenze ke stanovení fungicidního účinku nebo účinku proti kvasinkám chemických dezinfekčních přípravků a antiseptik používaných v potravinářství, průmyslu, domácnostech a veřejných zařízeních - Metoda zkoušení a požadavky (fáze 2 / stupeň 1). Česká agentura pro standardizaci, 2020. 52 s.
- ⁽¹¹⁾ ČSN EN ISO 7393-2. Kvalita vod - Stanovení volného a celkového chloru - Část 2: Kolorimetrická metoda s N,N-dialkyl-1,4-fenylenidiaminem pro běžnou kontrolu. Česká agentura pro standardizaci, 2018. 24 s.

Korespondující autor: Mgr. Hana Nejeschlebová,
Bentley Czech s.r.o., Počernická 96, 108 00 Praha 10,
e-mail: hana.nejeschlebova@seznam.cz

Přijato do tisku: 19. 11. 2020

Lektorováno: 27. 1. 2021

“GO JE ZAJÍMAVÉHO VE VĚDECKÉ LITERATUŘE”

Mléko a mléčné výrobky jsou neustále centrem pozornosti výzkumu. Výběr z vědecké literatury pro toto číslo zahrnuje následující publikace:

JÓD V MLÉČE

Vliv použití jodidu draselného jako krmného doplňku a dezinfekce struků na stav zásobení dojníc jódem a na hladinu jódu v mléce

Ahvanooei M.R.R. et al. (2021): Effect of potassium iodide supplementation and teat-dipping on iodine status in dairy cows and milk iodine levels. *Domestic Animal Endocrinology*, 74, 106504.

Za účelem vyhodnocení vlivu jódu v krmné dávce a jódu z dezinfekce (dippingu) struků na celkové množství jódu u dojníc a v jejich mléce byly navrženy dva experimenty. Celkem bylo sledováno osm dojníc holštýnského plemene ve střední části laktace (145±21 dní), s počáteční tělesnou hmotností 642±62 kg a průměrnou denní užitkovostí 31,7±2,0 kg mléka, a to ve dvou obdobích po dobu více než 44 dní. V prvním období, trvajícím 8 dní, byly všechny dojnice krmeny základní krmnou dávkou doplněnou jodidem draselným (KI) v množství 10 mg I/kg sušiny krmiva a ošetření struků dippingem nebylo prováděno. Ve druhém období byly nejprve po dobu 10 dní struky ošetřovány dezinfekčním prostředkem před dojením a poté následovalo období bez predippingu (resp. vemeno bylo umýváno přípravkem bez jódu) a následovalo 5 dní s používáním postdippingu. Přídavek KI v krmivu vedl ke zvýšení koncentrace jódu v séru, moči a mléku ($P<0,05$). Přejít z doplňování KI na jeho vyřazení z krmné dávky vedl k okamžitému poklesu obsahu jódu v séru, moči a mléce ($P<0,05$). Následný dipping měl za následek opětovné zvýšení hladin jódu v séru, moči a mléce ($P<0,05$). V porovnání s postdippingem nebylo ovlivnění koncentrací jódu predippingem významné. Množství 250 ml mléka od kontrolní skupiny a od skupiny s KI suplementací by poskytlo 29,4 %, resp. 68,4 % doporučené denní dávky jódu pro dospělé osoby. Závěrem lze říci, že množství jódu v mléce by mohlo být efektivně zvyšováno doplňováním KI a dippingem struků.

„Tichá“ jódová profylaxe jódem napravuje jódový deficit pouze částečně: maďarský příběh (1970-2020)

Ferenc P. (2020): “Silent” iodine prophylaxis only partly corrects iodine deficiency: the Hungarian story (1970-2020). *Orvosi Hetilap*, 161(50): 2107–2116.

V úvodu autor připomíná čtenářům svou publikaci prezentovanou před více než 50 lety ve stejném časopise („Údaje o současné situaci strumy v Maďarsku“, 1968) a následně ukončení vývoje jódové prevalence v 70. letech minulého století. V další části pak přezkoumává hlavní výsledky související s doplňováním jódu za posledních 50 let. Výsledky řady screeningových studií prováděných u školáků, těhotných žen, starších lidí a novorozenců a rovněž stanovením jódu v mateřském mléce, ukazují na mírný nebo středně závažný nedostatek jódu před koncem tisíciletí. U stejných kategorií pak údaje naznačují, že v posledních 20 letech je úroveň zásobení jódem čím dál adekvátnější. Zásobení lidí jódem se výrazně zlepšilo, a to i přes neregulovaný obchod s jodizovanými solemi, pravděpodobně díky úspěšně vedeným veřejným informačním kampaním. Tato situace se označuje jako „tichá“ profylaxe. Úplné odstranění nedostatku jódu není u této metody možné. Nejvyšším rizikem je nedostatečný přísun jódu těhotným ženám z důvodu ohrožení vývoje mozku potomků. V závěru autor přezkoumává povinnosti, týkající se jódu, uvedené v deklaraci