

Изследване на действието на електрохимично активирани водни разтвори върху *Clostridium perfringens* след съхранение за различни периоди от време

Теодора П. Попова

Лесотехнически университет – София

E-mail: dr_tpopova@abv.bg

Резюме

Извършени са изследвания за определяне на чувствителността на два щама *Clostridium perfringens* – ATCC 13124 и теренен (Т), изолирани от фекалии на домашни кокошки, към електрохимично активирани водни разтвори (анолит и католит), получени с 0,5% NaCl и комбинация от 0,5% NaCl и 0,5% Na₂CO₃. За контрола е използван дезинфектантът Virkon^S, приложен в крайна концентрация от 0,5%.

Двата щама проявяват висока чувствителност към изпитаните анолити и в суспензиите с гъстота 10⁶ cells/ml загиват под тяхното въздействие за интервал от 5 min. Тяхната чувствителност е същата и към контролния дезинфектант Virkon^S. Само анолитът с NaCl инактивира *C. perfringens* Т за повече от 10 min. Изпитаните католити инактивират *C. perfringens* ATCC след повече от 1 час. Чувствителността на двата тествани щама към католита с NaCl е еднаква. *C. perfringens* Т се оказва по-чувствителен към католита, приготвен с NaCl и с Na₂CO₃ и загива в негово присъствие за 20 min. Тези антимикробни свойства на изпитаните ЕХАВР се запазват напълно за период от 2 седмици при съхранение на тъмно при стайна температура. Съхранението за интервал от 4 и 8 седмици не се отразява на антимикробните свойства на двата изпитани анолита, но за този период тези свойства при католитите отслабват и двата щама на *C. perfringens* издържат над 90 min под тяхното въздействие.

Ключови думи: активирана вода, анолит, католит, Virkon^S, *Clostridium perfringens*, антибактериална активност

Study of the effect of electrochemically activated aqueous solutions on *Clostridium perfringens* after storage for different time periods

Teodora. P. Popova

University of Forestry – Sofia

Citation: Popova, P. T. (2019). Study of the effect of electrochemically activated aqueous solutions on *Clostridium perfringens* after storage for different time periods, *Zhivotnovadni Nauki*, 56(3), 33-42 (Bg).

Abstract

Studies were carried out to determine the sensitivity of two strains of *Clostridium perfringens* – ATCC 13124 and terrain (T) isolated from domestic fowl feces to electrochemically activated aqueous solutions (EAAS) anolyte and catholyte obtained with 0.5% NaCl and a combination of 0.5% NaCl

and 0.5% Na₂CO₃. Virkon^S disinfectant, administered at a final concentration of 0.5%, was used as a control.

Both strains exhibited high sensitivity to the tested anolytes and in the suspensions with a density of 10⁶ cells/ml they died under their influence for a 5 min interval. Their sensitivity to the Virkon^S control disinfectant was the same. Only the anolyte of NaCl inactivated *C. perfringens* T for more than 10 min. The tested catholytes inactivated *C. perfringens* ATCC after more than 1 hour. The sensitivity of both strains tested to the catholyte of NaCl was the same. *C. perfringens* T appeared to be more sensitive to catholyte prepared with NaCl and Na₂CO₃ and died in his presence for 20 min. These antimicrobial properties of the tested EAAS were saved completely for a period of 2 weeks when stored in the dark at room temperature. Storage for a 4 and 8 week interval did not affect the antimicrobial properties of the two tested anolytes, but in the catholytes these properties weakened for this period and single cells of both strains of *C. perfringens* survived over 90 min under their influence.

Key words: activated water, anolyte, catholyte, Virkon^S, *Clostridium perfringens*, antibacterial activity

Въведение

Clostridium perfringens е един от най-устойчивите микроорганизми. Това прави дезинфекцията на материали, в които той присъства, особено трудна. За унищожаването му в отпадни води например са правени експерименти с пероцетна киселина, UV, озон и др. (Gehr et al., 2003). Използвани са също различни съвременни оксидантни процедури на основата на озон, приложен самостоятелно, както и в комбинация с водороден пероксид или с титанов диоксид (Lanao et al., 2008). Дори и при високи концентрации на остатъчен хлор във вода *C. perfringens* се инактивира много трудно (Payment, 1999). При изпитване на антимикробната активност на други вещества, използвани като антибактериални агенти (разтвори на 10% калциев хидроксид, камфориран парамоноклорофенол – РМСС, 2% хлорхексидин диглюконат и 10% детергент за растително масло) също е установена значителна устойчивост на *C. perfringens* към всички агенти (Ferreira et al., 2002). Правени са и редица тестове при стандартизирани и хармонизирани условия с цел избор на най-ефективния антисептик, унищожавач *C. perfringens*. При продължително време на контакт най-ефикасни са полихексанид, октенидин и хлорхексидин, следвани от трик-

лозан и РVP-йод. При необходимост от бърз ефект най-ефикасни се оказват октенидин и РVP-йод he полихексанид, следвани от хлорхексидин и триклозан (Koburger et al., 2010).

Инактивирането на *C. perfringens* в биологични материали е особено трудно и свързано с приложение на силни дезинфектанти, много от които обаче са с висока токсичност и корозивност и не са съвсем екологично безопасни. Например за пълно и бързо обеззаразяване на компостирана прясна утайка от градска пречиствателна станция за отпадни води с формалдехид е необходимо използването му в крайна концентрация 1–2% и въздействие в продължение на 48 часа (Ророва and Вауков, 2014). При приложението на негасена вар (СаО) за обеззаразяване на такава утайка за такъв период е необходимо приложение в крайна концентрация над 20% (Ророва et al., 2014).

През последните години електрохимично активираните водни разтвори (ЕХАВР) намират приложение като средства за дезинфекция на кораби, вагони, самолети и др., а също в животновъдството, в хуманната и ветеринарномедицинската дейност, хранително-вкусовата промишленост и др. Анолитът притежава понижена електронна активност и има ярко изразени свойства на окислител (оксидант), а католитът – по-

вишена електронна активност и проявява свойства на възстановител (редуктор). Веществата, получени в резултат на електрохимичната обработка, съдържащи се в анолита и католита, се намират в метастабилно състояние за различен интервал от време, след изтичането на който те преминават отново в състояние на неактивиран воден електролит. Поради ниското си съдържание на оксиданти анолитите са с много малка химическа буферност, откъдето следва и тяхната екологична безвредност както при производството и употребата им, така и след завършване използването им по предназначение (Ashbakh, 2008).

Анолитът представлява светъл, прозрачен разтвор с миризма на хлор. Свойствата му зависят от редокспотенциала и съдържанието на хлор или йод в него. В резултат на електролиза на водния солеви разтвор в анодната зона се натрупват силни окислителни: хлорни радикали – хлорен диоксид, хипохлориста киселина (HClO); хипохлоридни йони (ClO⁻) и солна киселина (HCl); хлор (Cl₂) и кислородни радикали – атомен кислород, озон, а също и водороден прекис. Този състав, а също и високият редокспотенциал, обуславяват свойствата на анолита (Ashbakh, 2008; Benyaeva et al., 2009; Gluhchev et al., 2018). Католитът е разтвор с алкални свойства, който по вкус, мирис и цвят не се отличава от водата. С най-голямо значение за неговите лечебни свойства са показателите редокспотенциал, рН и наличието на активни микро- и макроелементи. Католитът притежава антиоксидантни и имуностимулиращи свойства и ускорява регенерацията на тъканите. Той се явява достъпно и просто средство за поддържане баланса между киселиннообразуващите и алкалообразуващите продукти, тъй като има рН от 7 до 12, в зависимост от активацията (Ashbakh, 2008; Gluhchev et al., 2015; Ignatov et al., 2015).

Тези данни ни дадоха основание да се насочим към извършване на предварителни изследвания за оценка на възможностите за приложение на анолити и католити като антимикробни средства срещу един от най-

устойчивите санитарно-показателни микроорганизми – *C. perfringens*, което е целта на настоящата работа.

Материали и методи

Анолити: Анолит 1 неутрален, приготвен с комбинация от 0,5% NaCl и 0,5% Na₂CO₃; Анолит 2, приготвен с 0,5% NaCl.

Католити: Католит 1 неутрален, приготвен с комбинация от 0,5% NaCl и 0,5% Na₂CO₃. Католит 2, приготвен с 0,5% NaCl.

Физичните показатели: рН, окислително-редукционен потенциал (ОП) и температура на изследваните ЕХАВР са определени с помощта на Manual multi-parameter analyser Consort C1010 (Consort bvba, Belgium).

Контрола: Използван е дезинфектантът Virkon^S, приложен в крайна концентрация 0,5%.

Микроорганизми: В изследванията е използвана чиста култура на *Clostridium perfringens* ATCC 13124 (NBIMCC 8615), получен от българската Национална банка за промишлени микроорганизми и клетъчни култури (НБПМКК). Използван е също теренен шам на *C. perfringens* Т, изолиран от фекалии на домашни кокошки.

Хранителни среди. Използван е Perfringens TSC agar (MkV Test a. s., Slovak Republic), както и агар на Цайслер и Тароци бульон (Бул Био НЦЗПБ – София).

Опитна постановка.

- Изследване на антимикробната активност на анолитите и католитите. Към 9 ml от всеки от изследваните анолити и католити е прибавена суспензия на *C. perfringens* с концентрация 10⁷ cells/ml в количество по 1 ml, при което е постигната крайна концентрация 10⁶ cells/ml. Поставени са следните контроли – стерилна дестилирана вода (без анолит) със същото съдържание на всеки от изследваните бактериални шамове, както и 100% анолит без микроорганизми.

- Изследване на антимикробната активност на Virkon^S, използван като контрола за сравняване на ефекта на анолитите и като-

литите. Към 9 ml от 0,5% разтвор на Virkon^S в стерилна дестилирана вода е прибавена суспензия на *C. perfringens* с концентрация 10^7 cells/ml в количество по 1 ml, при което е постигната крайна концентрация 10^6 cells/ml. Поставени са следните контроли – стерилна дестилирана вода (без Virkon^S) със същото съдържание на всеки от изследваните бактериални щамове, както и 0,5% разтвор на Virkon^S в стерилна дестилирана вода без микроорганизми.

След хомогенизиране за 1 min на апарат Вортекс (Heidolph – Labimex, Bulgaria) и различни интервали от време за въздействие на анолита и Virkon^S (5 min, 10 min, 15 min, 20 min, 30 min, 60 min, 90 min и 120 min) са правени посявки от всяка от пробите върху Perfringens TSC agar, които са култивирани при 37°C за 24–48 h при анаеробни условия. За създаване на анаеробни условия е използвана системата Anaerob Pack with palladium catalyst – $H_2 + CO_2$ (Бул Био НЦЗПБ – София) в Jar. За доказване на анаеробиоза е използван индикатор Indic Strip (Бул Био НЦЗПБ – София). След култивирането е отчитан растежът на изследваните бактерии, третирани

с изпитваните дезинфектанти, както и на поставените контроли. Най-масовият растеж е отбелязан с четири знака плюс (++++), а отрицателната находка (100% инактивиране) – със знака минус (-).

Изследванията са извършени с прясно приготвени ЕХАВР, както и след съхранение за период от 2, 4 и 8 седмици.

Резултати

Физичните показатели – рН, окислително-редукционен потенциал (ОРП) и температура на изследваните ЕХАВР са представени на табл. 1 и 2.

От данните в таблицата се вижда, че през първата седмица след приготвянето на ЕХАВР техният ОРП намалява значително, но през следващите 7 седмици тази промяна е незначителна. Измененията в рН на изследваните разтвори през периода от 2 месеца също са много малки.

При изследванията на чувствителността на *C. perfringens* АТСС, извършени с прясно приготвени ЕХАВР, както и след съхране-

Таблица 1. Физични показатели на използваните електрохимично активирани водни разтвори, приготвени с комбинация от 0,5% NaCl и 0,5% Na_2CO_3 .

Table 1. Physical indicators of the studied electrochemically activated aqueous solutions, prepared with a combination of 0.5% NaCl and 0.5% Na_2CO_3 .

Вид на разтвора и период на съхранение / Type of solution and storage period	pH	ОРП, mV / ORP, mV	t °C
Анолит 1 – 1 ден / Anolyte 1 – first day	6,63	870 mV	19,8
след 1 седмица / after 1 week	6,59	23	18,6
след 2 седмици / after 2 weeks	6,81	12	20,5
след 4 седмици / after 4 weeks	7,03	0	19,7
след 8 седмици / after 8 weeks	7,16	-9	21,8
Католит 1 – 1 ден / Catholyte 1 – first day	11,58	-852 mV	19,5
след 1 седмица / after 1 week	11,47	-261	18,4
след 2 седмици / after 2 weeks	11,59	-275	20,2
след 4 седмици / after 4 weeks	11,59	-271	19,3
след 8 седмици / after 2 weeks	11,58	-273	21,5

ОРП – окислително-редукционен потенциал / ORP – oxidation-reduction potential

ние при стайна температура за период от 2 седмици, се получиха идентични резултати, представени в табл. 3.

Данните в таблицата показват, че *C. perfringens* ATCC проявява висока чувстви-

телност към двата изпитани анолита и загива под тяхното въздействие за интервал от 5 min. Неговата чувствителност е същата и към контролния дезинфектант Virkon^S, но не и към двата католита. Изпитаните ка-

Таблица 2. Физични показатели на използваните електрохимично активирани водни разтвори, приготвени с 0,5% NaCl

Table 2. Physical indicators of the studied electrochemically activated aqueous solutions, prepared with 0.5% NaCl

Вид на разтвора и период на съхранение / Type of solution and storage period	pH	ОРП, mV / ORP, mV	t °C
Анолит 2 – 1 ден / Anolyte 2 – first day	2,76	1200	19,7
след 1 седмица / after 1 week	2,74	250,3	18,7
след 2 седмици / after 2 weeks	2,80	247	20,6
след 4 седмици / after 4 weeks	2,81	246	19,8
след 8 седмици / after 8 weeks	2,81	249	21,6
Катодит 2 – 1 ден / Catholyte 2 – first day	11,59	-960	18,6
след 1 седмица / after 1 week	11,59	-276,7	18,5
след 2 седмици / after 2 weeks	11,64	-273	20,7
след 4 седмици / after 4 weeks	11,64	-273	19,7
след 8 седмици / after 8 weeks	11,64	-270	21,8

ОРП – окислително-редукционен потенциал / ORP – oxidation-reduction potential

Таблица 3. Растеж върху Perfringens TSC agar на *Clostridium perfringens* ATCC след различни интервали на въздействие на прясно приготвени ЕХАВР и след съхранението им за период от 2 седмици

Table 3. Growth of *Clostridium perfringens* ATCC on Perfringens TSC agar after different intervals of exposure of freshly prepared EAAS and after storage for 2 weeks

Проба № / Sample No	Вид на активирания разтвор / Type of activated solution	Растеж на <i>Clostridium perfringens</i> ATCC / Growth of <i>Clostridium perfringens</i> ATCC							
		Време на въздействие – min / Time of action – min							
		5	10	15	20	30	60	90	120
1	анолит с Na ₂ CO ₃ / anolyte of Na ₂ CO ₃	-	-	-	-	-	-	-	-
2	анолит с NaCl / anolyte of NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-
3	катодит с Na ₂ CO ₃ , catholyte of Na ₂ CO ₃	+++	++	++	+	+	+	-	-
4	катодит с NaCl / catholyte of NaCl	++	++	+	+	+	+	-	-
5	0,5% Virkon ^S	-	-	-	-	-	-	-	-
6	нетретирана контрола / untreated control	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Легенда: - = липса на растеж (100% инактивиране); + = наличие на растеж

Legend: - = absent of growth (100% inactivation); + = presence of growth

толети инактивират напълно *C. perfringens* ATCC след повече от 1 час. Основната част от клетките се инактивират за около 15 min, но единични клетки остават жизнеспособни до 60 min. Тези антиминобни свойства на изпитаните ЕХАВР се запазват напълно за период от 2 седмици при съхранение на тъмно при стайна температура.

Съхранението при тези условия за интервал от 4 и 8 седмици не се отразява на антиминобните свойства на двата изпитани анолита (табл. 4), но при католитите се наблюдава отслабване на тази активност. *C. perfringens* ATCC издържа над 90 min под тяхното въздействие, както се вижда на табл. 4.

При изследванията на чувствителността на теренния щам *C. perfringens* T, извършени с прясно приготвени ЕХАВР, както и след съхранение за период от 2 седмици, също се получиха идентични резултати, представени на табл. 5.

От данните в таблицата се вижда, че теренният щам показва висока чувствителност към анолита, приготвен с NaCl и Na₂CO₃, който го инактивира за 5 min. Неговата

чувствителност е същата и към контролния дезинфектант Virkon[®]. Анолитът с NaCl обаче инактивира този щам за повече от 10 min. Теренният щам се оказва по-чувствителен към католита, приготвен с комбинация от NaCl и Na₂CO₃ и загива в негово присъствие за 20 min, за разлика от *C. perfringens* ATCC, който издържа над 60 min. Чувствителността на двата изпитани щамма към католита с NaCl е еднаква.

При изследванията на чувствителността на *C. perfringens* T, извършени с ЕХАВР, съхранявани на тъмно при стайна температура за период от 4 и 8 седмици, също се получиха идентични резултати, представени на табл. 6.

Данните в таблицата потвърждават резултатите, получени с *C. perfringens* ATCC и показват, че съхранението при стайна температура за интервал от 4 и 8 седмици не се отразява на антиминобните свойства на двата изпитани анолита, но за този период тези свойства при католитите отслабват. Единични клетки на *C. perfringens* T издържа над 90 min под тяхното въздействие.

Таблица 4. Растеж върху Perfringens TSC agar на *Clostridium perfringens* ATCC след различни интервали на въздействие на ЕХАВР, съхранявани 4 и 8 седмици

Table 4. Growth of *Clostridium perfringens* ATCC on Perfringens TSC agar after various intervals of exposure to EAAS stored for 4 and 8 weeks

Проба № / Sample №	Вид на активирания разтвор / Type of activated solution	Растеж на <i>Clostridium perfringens</i> ATCC / Growth of <i>Clostridium perfringens</i> ATCC							
		Време на въздействие – min / Time of action – min							
		5	10	15	20	30	60	90	120
1	анолит с Na ₂ CO ₃ / anolyte of Na ₂ CO ₃	-	-	-	-	-	-	-	-
2	анолит с NaCl / anolyte of NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-
3	католит с Na ₂ CO ₃ / catholyte of Na ₂ CO ₃	+++	+++	++	++	+	+	+	-
4	католит с NaCl / catholyte of NaCl	+++	+++	++	+	+	+	+	-
5	0,5% Virkon [®]	-	-	-	-	-	-	-	-
6	нетретирана контрола untreated control	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Легенда: - = липса на растеж (100% инактивиране); + = наличие на растеж

Legend: - = absent of growth (100% inactivation); + = presence of growth

Таблица 5. Растеж върху Perfringens TSC agar на *Clostridium perfringens* T след различни интервали на въздействие на прясно приготвени ЕХАВР и след съхранението им за период от 2 седмици

Table 5. Growth of *Clostridium perfringens* T on Perfringens TSC agar after different intervals of impact of freshly prepared EAAS and after storage for 2 weeks

Проба № / Sample No	Вид на активирания разтвор / Т Type of activated solution	Растеж на <i>Clostridium perfringens</i> T / Growth of <i>Clostridium perfringens</i> T							
		Време на въздействие – min - Time of action - min							
		5	10	15	20	30	60	90	120
1	анолит с Na ₂ CO ₃ / anolyte of Na ₂ CO ₃	-	-	-	-	-	-	-	-
2	анолит с NaCl / anolyte of NaCl	+	+	-	-	-	-	-	-
3	катодит с Na ₂ CO ₃ / catholyte of Na ₂ CO ₃	+	+	+	-	-	-	-	-
4	катодит с NaCl / catholyte of NaCl	++	++	+	+	+	+	-	-
5	0,5% Virkon ^s	-	-	-	-	-	-	-	-
6	нетретирана контрола / untreated control	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Легенда: - = липса на растеж (100% инактивиране); + = наличие на растеж

Legend: - = absent of growth (100% inactivation); + = presence of growth

Таблица 6. Растеж върху Perfringens TSC agar на *Clostridium perfringens* T след различни интервали на въздействие на ЕХАВР, съхранявани 4 и 8 седмици

Table 6. Growth of *Clostridium perfringens* T on Perfringens TSC agar after various intervals of exposure to EAAS stored 4 and 8 weeks

Проба № / Sample No	Вид на активирания разтвор / Type of activated solution	Растеж на <i>Clostridium perfringens</i> T / Growth of <i>Clostridium perfringens</i> T							
		Време на въздействие – min / Time of action – min							
		5	10	15	20	30	60	90	120
1	анолит с Na ₂ CO ₃ / anolyte of Na ₂ CO ₃	-	-	-	-	-	-	-	-
2	анолит с NaCl / anolyte of NaCl	+	+	-	-	-	-	-	-
3	катодит с Na ₂ CO ₃ / catholyte of Na ₂ CO ₃	+++	+++	++	++	+	+	+	-
4	катодит с NaCl / catholyte of NaCl	+++	+++	++	+	+	+	+	-
5	0,5% Virkon ^s	-	-	-	-	-	-	-	-
6	нетретирана контрола / untreated control	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Легенда: - = липса на растеж (100% инактивиране); + = наличие на растеж

Legend: - = absent of growth (100% inactivation); + = presence of growth

Обсъждане

Резултатите от настоящите проучвания категорично показват, че двата изпитани

анолита проявяват значителна антибактериална активност по отношение на двата щам на *C. perfringens*. Лабораторният щам *C. perfringens* ATCC се оказва по-чувствителен

в сравнение с теренния към анолита, приготвен с NaCl. Неутралният анолит, получен с комбинация от 0,5% NaCl и 0,5% Na₂CO₃, превъзхожда по антимикробна активност този, получен само с NaCl и инактивира двата изпитани щамове в рамките на 5 min. Очевидно различните щамове на *C. perfringens* показват различна чувствителност към анолити, приготвени с различни соли. Изглежда, че в лабораторни условия щамовете постепенно губят устойчивостта си към антимикробни средства. По-високата устойчивост на теренните щамове е наблюдавана и в предишни наши проучвания (Petrova and Popova, 2018), когато установихме, че анолит, получен чрез електрохимична активация на стерилна дестилирана вода с 3% NaCl, прибавен в равно количество към суспензия на теренен щам *C. perfringens* с гъстота 2×10^6 CFU/1 ml, след 10 минутно въздействие причинява трикратно намаление на количеството на жизнеспособните клетки.

Настоящите проучвания показват, че католитите нямат достатъчно добре изразени антимикробни свойства по отношение на двата щамове на *C. perfringens* и използването им като дезинфектанти или антисептици не би било надеждно поради оцеляването на единични клетки за над 60 min.

Двата изпитани от нас анолита напълно запазват антимикробната си активност за период от два месеца при съхранение на тъмно при стайна температура. Това не може да се каже за изпитаните католити. Настоящите резултати показват, че те запазват свойствата си за период от 2 седмици, но след по-дълго съхранение тези свойства отслабват. ОРП на изследваните ЕХАВР намалява, но рН се запазва в голяма степен през 8 седмичния период, което показва, че двата показателя в комбинация имат значение за антимикробния им ефект. Първичен инактивиращ агент в анолита е хипохлористата киселина (HOCl), която е силен дезинфектант при неутрална или леко кисела реакция на средата (оптимум рН 5). Очевидно нейната концентрация и подходящата стойност на рН са от основно значение за антимикробното действие на

анолитите. Тези резултати са в съответствие с данните от предишни наши проучвания (Popova et al., 2016). Според Ashbakh (2008) за разлика от католита анолитът достатъчно дълго запазва своите свойства. Може да се съхранява в затворени стъклени съдове в продължение на месеци, което се потвърждава при настоящите изследвания.

Нашите резултати са в съответствие с тези на Kerwick et al. (2005), според които електрохимичната дезинфекция днес се очертава и като една от най-осъществимите алтернативи на хлорирането на питейната вода, при което във водата остават вредни странични продукти и поради появата на устойчиви патогени. Len et al. (2000) установяват, че електролизирана оксидирана вода, получена с посилен ток, съдържа по-висока концентрация на хлор. Те отчитат максимална концентрация на HOCl около рН 4, при което се наблюдава максимална редукция на вегетативни клетки на *Bacillus cereus* F4431/73.

Антимикробни свойства на анолита по отношение на други спорообразуващи бактерии са установени от Gurgulova et al. (2010), които докладват за пълно биоцидно и спороцидно действие на анолити с изходен състав комбинация от натриев карбонат и натриев хлорид и само натриев хлорид с ОБП 800 – 1200 mV при експозиция 15 min върху причинителя на американски гнилец *Paenibacillus larvae* и причинители на европейски гнилец по пчелното пило *P. alvei* и *Melissococcus pluton*. При сравнително изследване на дезинфекционния ефект на анолити с изходен състав комбинация от натриев карбонат и натриев хлорид и само натриев хлорид с ОРП 800–1200 mV и най-често използваните антимикробни средства в пчеларството, Gurgulova et al. (2011) отчитат спороцидно и бактерицидно действие спрямо *M. pluton* при 15 min експозиционно време, а спрямо спорите на *Bacillus cereus* – по-дългата експозиция – 15–60 min има спороциден ефект. Нашите изследвания показват по-висока чувствителност към анолити на *C. perfringens* в сравнение с тези спорообразуващи видове, което потвърждава пер-

спективността на използването им като сигурни дезинфектанти в различни аспекти на човешката дейност.

Изводи

Clostridium perfringens ATCC 13124 и теренен щам на *C. perfringens* T проявяват висока чувствителност към изпитаните анолити и в суспензии с гъстота 10^6 cells/ml загиват под тяхното въздействие за интервал от 5 min. Тяхната чувствителност е същата и към контролния дезинфектант Virkon^S. Само анолитът с NaCl инактивира *C. perfringens* T за повече от 10 min.

Изследваните католити инактивират *C. perfringens* ATCC след повече от 1 час. Чувствителността на двата изпитани щама към католита с 0,5% NaCl е еднаква. *C. perfringens* T се оказва по-чувствителен към католита, приготвен с комбинация от 0,5% NaCl и 0,5% Na₂CO₃ и загива в негово присъствие за 20 min.

Антимикробните свойства на изпитаните ЕХАВР се запазват напълно за период от 2 седмици при съхранение на тъмно при стайна температура. Съхранението за интервал от 4 и 8 седмици не се отразява на антимикробните свойства на двата изпитани анолита, но за този период тези свойства при католитите отслабват и двата щама на *C. perfringens* издържат над 90 min под тяхното въздействие.

Изпитаните католити проявяват сравнително слаби антимикробни свойства, докато анолитите са перспективно антибактериално средство с много силно изразена активност спрямо високо устойчив микроорганизъм като *C. perfringens*.

Благодарности

Настоящата разработка е финансирана от ЛТУ със средства, отпуснати целево от Държавния бюджет в резултат на изпълнение на Договор № Б25/07.03.2018 г. за научен проект на тема „Изпитване антимикробната актив-

ност на електрохимично активиран воден разтвор анолит”.

Литература

Ashbakh, D.S. (2008). Live and dead water – the newest medicine of our time, Peter, St. Petersburg, ISBN: 978-5-388-00190-0 (Ru).

Benyaeva N. N., Nosik A.S., Tsarev V.N. & Cherkhestov Yu.I. (2009). Comparative evaluation of the antimicrobial effect of Anolyte ANK on anaerobic and aerobic microflora *in vitro* when treated with a highly dispersed US aerosol. *Kafedra*; 30-31, 26-28 (Ru).

Ferreira, C. M., da Silva Rosa O. P., Torres S. A., de Andrade Ferreira F. B., & Bernardinelli N. (2002). Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz. Dent. J.*, 13, 2. Ribeirão Preto 2002, <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-64402002000200008>.

Gehr, R., Wagner, M., Veerasubramanian, P., & Payment, P. (2003). Disinfection efficiency of peracetic acid, UV and ozone after enhanced primary treatment of municipal wastewater. *Water research*, 37(19), 4573-4586.

Gluhchev, G., Ignatov, I., Karadzhov S., Miloshev G., Ivanov N., & Mosin O. (2015). Electrochemically activated water. Biophysical and biological effects of anolyte and catholyte as types of water, *Journal of Medicine, Physiology and Biophysics.*, 10, 1-18, ISSN 2422-8427 (Online) www.iiste.org

Gluhchev, G., Mehandjiev, D., Ignatov, I., Karadzhov, S., Pesheva, Y., & Atanasov, A. (2018). Water electrolysis - processes in catholyte and anolyte results with differential non – equilibrium water spectrum. *European Journal of Medicine*, 6, 1, 3 – 12. ISSN: 2310-3434. DOI: 10.13187/ejm.2018.1.3.

Gurgulova, K., Georgieva, T., Karadzhov, S., Yordanov, I., & Atanasov, G. (2010). Biocidal action of electrochemically activated solutions (anolytes) against microorganisms responsible for rotten diseases in bee brood. NVS, *Contract № 6/07.07.2010* (Bg).

Gurgulova, K., Karadzhov, S., Gogov, Y., Georgieva, T., & Yordanov, I. (2011). Application in veterinary medicine of anolytes obtained by electrochemical activation of aqueous solutions of alkali and alkaline earth salts. Agricultural Academy, *Animal Breeding Sciences*, XLVIII, 1/2011 (Bg).

Ignatov, I., Gluhchev, G., Karadzhov, S., Miloshev, G., Ivanov N., & Mosin, O. (2015). Preparation of Electrochemically Activated Water Solutions (Catholyte/Anolyte) and Studying Their Physical-Chemical Properties. *Journal of Medicine, Physiology and Biophysics*, 11, 1-21, www.iiste.org, ISSN 2422-8427 (Online).

Kerwick, M. I., Reddy, S. M., Chamberlain, A. H. L., & Holt, D. M. (2005). Electrochemical disinfection, an environmentally acceptable method of drinking water disinfection?. *Electrochimica Acta*, 50(25-26), 5270-5277.

Koburger, T., Hübner, N. O., Braun, M., Siebert, J., & Kramer, A. (2010). Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), 1712-1719. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq212>.

Lanao, M., Ormad, M. P., Ibarz, C., Miguel, N., & Ovelleiro, J.L. (2008). Bactericidal Effectiveness of O₃, O₃/H₂O₂ and O₃/TiO₂ on Clostridium perfringens. Ozone: Science & Engineering. *The Journal of the International Ozone Association*, 30, (6), 431-438.

Len, S. V., Hung, Y. C., Erickson, M., & Kim, C. (2000). Ultraviolet spectrophotometric characterization and bactericidal properties of electrolyzed oxidizing water as influenced by amperage and pH. *Journal of food protection*, 63(11), 1534-1537.

Payment, P. (1999). Poor efficacy of residual chlorine disinfectant in drinking water to inactivate waterborne

pathogens in distribution systems. *Canadian journal of microbiology*, 45(8), 709-715. <https://doi.org/10.1139/w99-063>

Petrova, T. E., & Popova, T. P. (2018). Electrochemically activated aqueous solutions – essence, action and some aspects of application. *Traditions and modernity in veterinary medicine*, 3, 2 (5), 34-42. ISSN 2534-9333, e-ISSN 2534-9341.

Popova, T. P., & Baykov, B. D. (2014). Decontamination of sewage sludge by treatment with formaldehyde *in vitro*. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 3, 10, 982-989. ISSN: 2319-7692, 2319-7706.

Popova, T. P., Marinova-Garvanska, S. M., Kaleva, M. D., Zaharinov, B. S., Gencheva, A. B., & Baykov, B. D. (2014). Decontamination of sewage sludge by treatment with calcium oxide. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 3, (9), 184-192. ISSN: 2319-7692, 2319-7706.

Popova, T. P., Petrova, T., & Karadzhov, S. (2016). Investigation of the Action of the Anolyte after Different Storage Times on the Gram-negative Bacteria. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 5, (9), 530-539, doi: <http://dx.doi.org/10.20546/ijcmas.2016.509.059>.