

УДК 648.61

Свергун Ж. Г.

аспірантка кафедри ветеринарного акушерства,
внутрішньої патології та хірургії,
Заклад вищої освіти «Подільський державний університет»
Кам'янець-Подільський, Україна
E-mail: daniezana7@gmail.com
ORCID: 0009-0004-6378-2836

Кухтин М. Д.

доктор ветеринарних наук, професор,
завідувач кафедри харчової біотехнології і хімії,
Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя
Тернопіль, Україна
E-mail: kuchtynnic@gmail.com
ORCID: 0000-0002-0195-0767

ОЦІНЮВАННЯ БАКТЕРИЦИДНОЇ ДІЇ ВОДНОЇ ФОРМИ ОЗОНУ ДЛЯ ЗНЕЗАРАЖЕННЯ ПОВЕРХНІ ЯЄЦЬ

Анотація

Більшість забруднень яєчної шкаралупи відбувається одразу після відкладання яєць, й основним джерелом їх забруднення є контакт шкаралупи з брудними поверхнями. Тому застосування екологічних безпечних та ефективних способів знезараження поверхні шкаралупи курячих яєць у технології виробництва яєчних продуктів харчування є актуальним, а розробки мають інноваційний характер, є досить перспективними. Метою дослідження було визначити мінімальну бактерицидну концентрацію та білковий індекс водної форми озону стосовно музейних штабів мікроорганізмів.

Установлено, що найбільш стійкими до водної форми озону виявилися спороутворюючі бактерії *B. subtilis*, для яких МБК озону становили 1,53 мг/л, на другому місці були дріжджі *C. albicans* – МБК – 1,23 мг/л, середній показник МБК реєструвався до *S. aureus* – 1,0 мг/л, найменша МБК водного озону була до штабів *E. coli* й *P. aeruginosa* – 0,8 мг/л. Найнижча бактерицидна концентрація (0,8–1,0 мг/л) водної форми озону на штаби умовно-патогенних бактерій проявлялася протягом експозиції 12–15 хв. Для знищення клітин *E. coli* та *P. aeruginosa* протягом однієї хвилини необхідно, щоб концентрація озону становила 1,23 мг/л, а для *S. aureus* – 1,53 мг/л. Також бактерицидна концентрація водної форми озону на штаби *B. subtilis* і *C. albicans* протягом 12–15 хв експозиції становила 1,53 та 1,23 мг/л, відповідно. За органічного забруднення закономірно знижується бактерицидна концентрація водної форми озону, зокрема протягом трьох хвилин експозиції, у середньому в 1,6 раза, а за експозиції протягом шести хвилин – приблизно 1,2 раза. Тобто для підвищення ефективності водної форми озону у виробничих умовах необхідно збільшувати його концентрацію й час впливу. Водночас для оптимізації концентрації водної форми озону та часу контакту з мікроорганізмами необхідно ще проводити ґрунтовніші дослідження для встановлення всіх чинників, які можуть впливати на процес дезінфекції.

Ключові слова: водна форма озону, бактерицидна дія, дезінфекція яєць, штаби бактерій.

Вступ. Харчові яйця й напівфабрикати з них (меланж, яєчний порошок) належать до одних із найбільш споживаних продуктів у повсякденному житті завдяки їх високій поживній цінності й доступній ціні. Водночас ця категорія продуктів може бути джерелом харчових патогенів (*Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp. тощо), оскільки шкаралупа яєць є нестерильною і контамінована мікроорганізмами [11; 14; 27]. У технології виробництва яєчних продуктів яйце піддається санітарній обробці – миттю й дезінфекції, при цьому останню операцію зазвичай проводять хлорумісними засобами або хлорованою водою [15; 18]. Проте хлорована вода може спричинити потенційно несприятливий вплив на здоров'я людини й навколишнє середовище [19]. Крім того, сучасні споживачі негативно сприймають використання хімічних речовин у технологіях виробництва продуктів харчування [5; 13]. Тому в наш час все більшої глобальної занепокоєності щодо використання різних хімічних речовин у технології харчових продуктів необхідні пошуки стійких та екологічно чистих технологій, які володіють можливостями швидкої та ефективної дезінфекції. Одним із таких рішень є використання озону, а саме водної форми для знезараження поверхні курячих яєць.

Озон у водній формі може вбивати або інактивувати бактерії, гриби, найпростіші, віруси (включаючи віруси гепатиту А і В, вірус імунodefіциту людини та SARS-CoV-2) [1; 7; 24]. Повідомляється, що бактерицидний ефект водного озону в 600–3000 разів більший, ніж така сама концентрація хлору [2; 26]. Висококонцентрований водний озон, отриманий шляхом електролізу, не містить токсичних оксидів азоту й інших побічних продуктів. Управління з контролю за продуктами й ліками США (FDA) постановило, що озон можна безпечно використовувати як фунгіцид у виробництві харчових продуктів, а Агентство з охорони навколишнього середовища США

також погодилося на використання озону як дезінфікуючого засобу [22]. Нині озон вважається безпечним харчовим консервантом і широко використовується для оброблення овочів і фруктів для збільшення термінів реалізації [2] на фабриках для стерилізації заморожених морепродуктів перед пакуванням [9]. Озон також можна використовувати для стерилізації та дезінфекції холодильних складів, обладнання переробних заводів, повітря, побутових шаф [10], питної води та стічних вод, фруктів, соків [23; 25] та овочів [3; 16]. Стійкість мікроорганізмів до озону залежить від видового складу мікробіоти об'єкта, що піддається впливу, періоду їх фізіологічного росту й кількості бактерій [6; 14]. Також бактерицидний ефект озону залежить від його концентрації в середовищі впливу [21] та інших факторів, таких як рН, наявність органічних сполук тощо [8].

Повідомляється, що основний механізм впливу озону на мікробні клітини під час дезінфекції пов'язаний із пошкодженням цілісності мембран клітин із подальшим реагуванням із ферментами, ДНК і РНК і витіканням умісту через пошкоджені мембрани [4]. Отже, з огляду на наведені дані, науковий інтерес становлять дослідження з вивчення бактерицидної дії водного озону щодо мікробіоти курячих яєць для можливого його застосування в технології виробництва яєчних продуктів.

Метою роботи є визначити мінімальну бактерицидну концентрацію та білковий індекс водної форми озону щодо музейних штамів мікроорганізмів.

Виклад основного матеріалу дослідження. Озон у водній формі генерував озоногенератор (Baerain, Китай) за температури навколишнього середовища від 15 до 20 °С. Концентрацію розчиненого водного озону вимірювали йодометричним методом, для цього в конічну колбу ємністю 250 мл додали 0,071 г KIO_3 і 1,5 г KI та 50 мл води. Після перемішування інгредієнтів додавали 10 мл оцтової кислоти. Титрування проводили 0,1 моль/л тіосульфату натрію до майже зникнення жовтого розчину [7; 20].

Для визначення мінімальної бактерицидної концентрації водного озону використовували музейні штами бактерій *S. aureus* (ATCC 25923), *P. aeruginosa* (27/99), *E. coli* (055K59 №3912/41), *Bacillus subtilis* (6633 ATCC), *Candida albicans* (ATCC 10231).

Мінімальну бактерицидну концентрацію водної форми озону визначали класичним суспензійним методом [17], для цього готували окремо кожну суспензію із 24-годинних мікроорганізмів у кількості 10^9 КУО/мл (оптичний стандарт каламутності МакФарланда – standard 2) і вносили 0,5 мл у 10 мл водного озону різної концентрації. Перемішували й витримували протягом 60 хв, нейтралізували дію озону шляхом додавання розчину тіосульфату натрію, після цього проводили відсів 1 мл у 5 мл м'ясопептонного бульйону (МПБ) та інкубували за температури $37 \pm 0,5$ °С протягом 24 год. У контролі маніпуляції були аналогічні, але, замість озону, використовували стерильну воду. Мінімальну бактерицидну концентрацію вважали ту найменшу, за якої в пробірці не спостерігався ріст мікроорганізмів (чистий, прозорий МПБ).

Мінімальну бактерицидну концентрацію водного озону залежно від часу експозиції проводили аналогічно, як вище описано, водночас відсів у МПБ проводили через 1, 3, 6, 9, 12 і 15 хв.

Білковий індекс водної форми озону визначали також класичним методом згідно з рекомендаціями [12], водночас, замість сироватки крові, додавали до озону 0,5% курячого білка.

Усі дослідження проводили в триразовій повторності, а статистичну обробку отриманих результатів дослідження – з використанням комп'ютерної програми Statistica 10. Вірогідними вважали дані за $p < 0,05$.

Для визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБК) водної форми озону використовували озон у максимальній концентрації (2,4 мг/л), яку продукує цей озоногенератор. Тому для визначення можливого його застосування в технології знезараження поверхні яєчної шкарлупи проводили визначення МБК генерованого озону та його нижчих концентрацій, при цьому кожне наступне розведення було нижчим на 20% від попереднього. Результати наведено в таблиці 1.

Таблиця 1. Мінімальна бактерицидна концентрація водної форми озону, визначена на музейних штамів мікроорганізмів у суспензійному методі

Концентрація, водного озону мг/л	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>
2,40	–	–	–	–	–
1,92	–	–	–	–	–
1,53	–	–	–	–	–
1,23	–	–	–	+	–
1,00	–	–	–	+	+
0,80	+	–	–	+	+
0,64	+	+	+	+	+
0,52	+	+	+	+	+
Контроль, вода стерильна	+	+	+	+	+

З досліджень таблиці 1 відмічаємо різну активність водної форми озону стосовно взятих у дослід музейних штамів мікроорганізмів. Зокрема, найнижча МБК озону реєструвалася стосовно грамнегативних бактерій *E. coli* й *P. aeruginosa*, яка становила для цих штамів 0,8 мг/л водної форми озону. Для грампозитивної мікрофлори МБК була вища, ніж для двох грамнегативних паличок, зокрема для штаму *S. aureus* МБК була на одне розведення

вища – 1,0 мг/л водного озону. Спорова бактерія *B. subtilis* проявляла найвищу стійкість до водної форми озону, оскільки МБК для цього штаму становила 1,53 мг/л, що в 1,9 раза вища МБК, порівнюючи зі штамми *E. coli* й *P. aeruginosa* та в 1,5 раза, ніж у *S. aureus*. Для знищення дріжджової мікрофлори – *C. albicans*, необхідно щоб концентрація водного озону була не нижча за 1,23 мг/л.

Отже, серед досліджених музейних штамів мікроорганізмів до водної форми озону найбільш стійкими виявилися спороутворюючі бактерії – *B. subtilis*, для яких МБК озону становили 1,53 мг/л, на другому місці були дріжджі *C. albicans* – МБК – 1,23 мг/л, середній показник МБК реєструвався до *S. aureus* – 1,0 мг/л, найменша МБК водного озону була до штамів *E. Coli* й *P. aeruginosa* – 0,8 мг/л.

У виробничих умовах застосування біоцидних засобів важливу роль відіграють дані щодо необхідного часу експозиції, за якого буде проявлятися найкращий знезаражувальний ефект. Водночас за умови недостатнього режиму експозиції на поверхні шкарлупи може виявлятися значна кількість вижливих мікроорганізмів, а за надто тривалої обробки збільшується тривалість технологічного часу виробництва продукту. Тому правильні підібрані режими знезараження яєчної шкарлупи мають поєднувати високу ефективність дезінфекції з раціональним часом експозиції. На рис. 1 наведено результати з визначення часу експозиції для бактерицидної дії водної форми озону, залежно від його концентрації на музейних штаммах грампозитивних і грамнегативних бактерій.

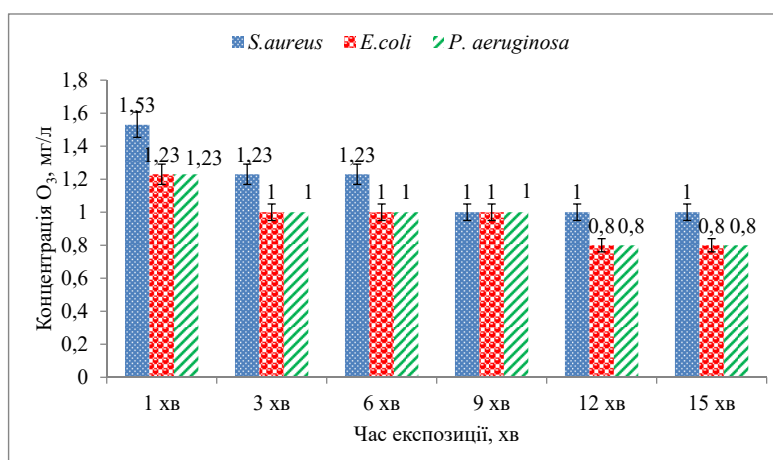


Рис. 1. Бактерицидна концентрація водного озону, залежно від часу експозиції на музейних штаммах *S. aureus*, *E. coli* й *P. aeruginosa*

Згідно з рис. 1, відмічаємо закономірний процес зниження бактерицидної концентрації водної форми озону стосовно музейних штамів бактерій зі збільшенням часу впливу на них. Зокрема, для інактивації клітин музейних штамів *S. aureus* протягом однієї хвилини необхідно, щоб концентрація водної форми озону становила не менше ніж 1,53 мг/л, а для штамів *E. coli* та *P. aeruginosa* – 1,23 мг/л. Зі збільшенням часу експозиції до трьох хвилин бактерицидна концентрація водної форми озону зменшується на одне розведення, до 1,23 мг/л для *S. aureus* і 1,0 мг/л для штамів грамнегативних бактерій. Збільшення експозиції водної форми озону до шести хвилин не зумовило зменшення бактерицидної концентрації біоциду, порівнюючи з дією протягом трьох хвилин. Водночас за контакту водної форми озону з музейними штамми протягом дев'яти хвилин відбулося зменшення бактерицидної концентрації для *S. aureus* до 1,0 мг/л, а для *E. coli* й *P. aeruginosa* бактерицидна концентрація не зазнавала змін і була як за дії протягом трьох і шести хвилин – 1,0 мг/л. Дія озону протягом 12 й 15 хв не змінювала бактерицидну концентрацію для штаму *S. aureus* (1,0 мг/л), водночас протягом цієї експозиції бактерицидна концентрація для штамів *E. coli* й *P. aeruginosa* була однаковою і становила 0,8 мг/л.

Отже, найнижча бактерицидна концентрація (0,8–1,0 мг/л) водної форми озону на штамів умовно-патогенних бактерій проявлялася протягом експозиції 12–15 хв. Для знищення клітин *E. Coli* й *P. aeruginosa* протягом однієї хвилини необхідно, щоб концентрація озону становила 1,23 мг/л, а для *S. aureus* – 1,53 мг/л.

Дослідження стосовно виявлення впливу тривалості експозиції штамів *B. subtilis* і *C. albicans* у водній формі озону на зміну бактерицидної концентрації наведено на рис. 2.

Згідно з рис. 2, для знищення клітин *B. subtilis* протягом однієї хвилини необхідно застосовувати максимальну концентрацію водної форми озону, яку продукував озоногенератор – 2,4 мг/л, а для штаму *C. albicans* протягом цього часу дії бактерицидна концентрація була на одне розведення нижча – 1,92 мг/л. Протягом трихвилинної експозиції концентрація озону для інактивування клітин *B. subtilis* зменшилася на одне розведення, водночас для знищення *C. albicans* бактерицидна концентрація не змінилася, порівняно з однохвилинною експозицією. За експозиції протягом шести хвилин бактерицидна концентрація озону на клітини *B. subtilis* не знизилася, порівняно з трьома хвилинами, і становила 1,92 мг/л, а для клітин *C. albicans* бактерицидна концентрація біоциду знизилася на одне розведення – до 1,53 мг/л. Збільшення часу експозиційного впливу водної форми озону до дев'яти хвилин не змінило бактерицидну концентрацію, порівняно із шістьма хвилинами дії. Водночас протягом

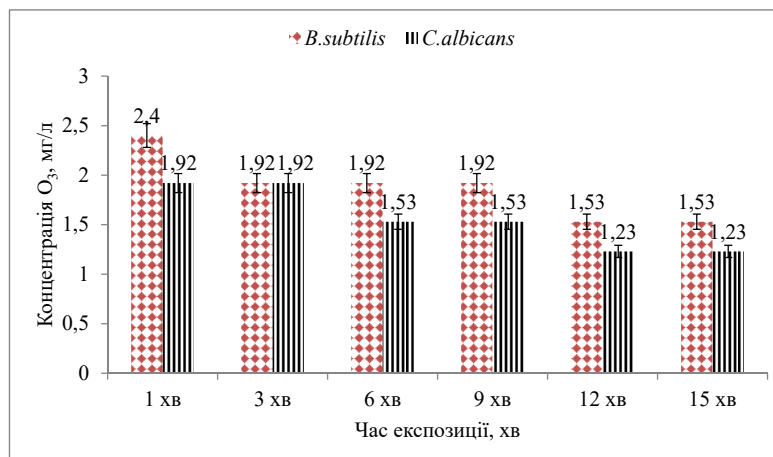


Рис. 2. Бактерицидна концентрація водного озону, залежно від часу експозиції на музейні штами *B. subtilis* і *C. albicans*

12 хв експозиції реєстрували зниження бактерицидної концентрації водної форми озону на одне розведення для *B. subtilis* і *C. albicans* до 1,53 та 1,23 мг/л, відповідно. Час дії водної форми озону на ці штами мікроорганізмів упродовж 15 хв не зменшив бактерицидну концентрацію, порівняно з 12 хв експозиції.

Отже, бактерицидна концентрація водної форми озону на штами *B. subtilis* і *C. albicans* протягом 12–15 хв експозиції становила 1,53 та 1,23 мг/л відповідно. Для швидшого прояву бактерицидної дії необхідно підвищувати концентрацію озону у воді.

У реальних виробничих умовах шкаралупа курячих яєць не є ідеально чистою, на ній зазвичай можуть бути сліди органічного забруднення, які перешкоджають знезаражувальній дії будь-якого біоцидного засобу. Тому для вірогіднішого оцінювання ефективності розроблюваних дезінфікувальних засобів та апробації режимів експозиції в лабораторних умовах визначають бактерицидну дію біоцидів за «білкового навантаження». Для цього зазвичай у різні концентрації біоциду додають органічні речовини (сироватка крові, знежирене молоко, білок курячого яйця) і визначають, у скільки разів змінюється бактерицидна дія деззасобу. Ми також визначили вплив додавання в різні концентрації водної форми озону курячого білка на його бактерицидний ефект. Результати досліджень подано в таблиці 2.

Таблиця 2. Білковий індекс водного озону стосовно музейних штамів мікроорганізмів

Мікроорганізми	Бактерицидна концентрація озону (мг/л) протягом 3 хв експозиції	Бактерицидна концентрація озону (мг/л) з 5% білку протягом 3 хв експозиції	Бактерицидна концентрація озону (мг/л) протягом 6 хв експозиції	Бактерицидна концентрація озону (мг/л) з 5% білку протягом 6 хв експозиції
<i>S. aureus</i>	1,23	1,92	1,23	1,92
<i>E. coli</i>	1,0	1,53	1,0	1,23
<i>P. aeruginosa</i>	1,0	1,53	1,0	1,23
<i>B. subtilis</i>	1,92	2,40	1,92	2,40
<i>C. albicans</i>	1,92	2,40	1,53	1,92

З таблиці 2 випливає, що у випадку забруднення водного середовища 5% білка бактерицидна концентрація розчину озону протягом трьох хвилин експозиції підвищувалася в середньому в 1,5–1,6 раза щодо штамів *S. aureus*, *E. coli* й *P. aeruginosa*. Тобто для *S. aureus* з 1,23 до 1,92 мг/л озону та з 1,0 до 1,53 для *E. coli* та *P. aeruginosa* відповідно. Для штамів *B. subtilis* і *C. albicans* протягом цього часу експозиції бактерицидна концентрація озону за присутності білка збільшилася в 1,25 раза (з 1,92 до 2,40 мг/л).

Збільшення часу впливу озону до шести хвилин на штами мікроорганізмів із білковим навантаженням не спричиняло зміни бактерицидної концентрації щодо клітин *S. aureus*. Водночас стосовно штамів *E. coli* й *P. aeruginosa* протягом цього часу впливу бактерицидна концентрація озону зросла в 1,2 раза – з 1,0 до 1,23 мг/л. Аналогічне збільшення концентрації озону (1,2 раза) відмічали й у *B. subtilis* і *C. albicans* за цієї експозиції.

Отже, органічне – білкове – забруднення об'єктів знезараження буде знижувати бактерицидний ефект водної форми озону протягом трьох хвилин експозиції в середньому в 1,6 раза, а за експозиції протягом шести хвилин – приблизно 1,2 раза. Тобто для підвищення ефективності водної форми озону у виробничих умовах необхідно збільшувати його концентрацію та час впливу.

Більшість забруднень яєчної шкаралупи відбувається одразу після відкладання яєць, основним джерелом їх забруднення є контакт шкаралупи з брудними поверхнями. Тому застосування екологічних безпечних та ефектив-

них способів знезараження поверхні шкарлупи курячих яєць у технології виробництва яєчних продуктів питання є актуальним, а розробки мають інноваційний характер і є досить перспективними. На ринку є значна кількість хімічних біоцидних засобів, які використовуються в технології дезінфекції інкубаційних яєць [28], водночас вони не можуть бути використані у виробництві яєчних продуктів через можливість потрапляння хімічних складників у харчовий продукт. Метою дослідження було визначити мінімальну бактерицидну концентрацію та білковий індекс водної форми озону стосовно музейних штамів мікроорганізмів, адже водна форма озону, на відміну від газоподібної, є не токсична, може генеруватися портативним озонатором і застосовуватися в технології знезараження багатьох харчових продуктів [2; 3; 16] як рослинного [23; 25], так і тваринного походження [9].

Наші дослідження встановили, що серед досліджених музейних штамів мікроорганізмів до водної форми озону, який генерує портативний озонатор (Baergain, Китай), найбільш стійкими виявилися спороутворюючі бактерії – *B. subtilis*, для яких МБК озону становили 1,53 мг/л, на другому місці були дріжджі *C. albicans* – МБК – 1,23 мг/л, середній показник МБК реєструвався до *S. aureus* – 1,0 мг/л, найменша МБК водного озону була до штамів *E. coli* й *P. aeruginosa* – 0,8 мг/л. У дослідженнях [6] показано, що стійкість досліджених мікроорганізмів до озонної води знаходилася в порядку *A. fumigatus* > *C. albicans* > *E. coli* > *S. aureus*. Зменшення бактерій кишкової палички на 7 log (100% видалення з текстильної тканини) спостерігалось у воді після обробки озоном за концентрації 3 мг/л протягом п'яти хвилин експозиції. Для порівняння: з такої концентрації озону *C. albicans* повністю інактивувалася протягом 11 хвилин експозиції. Також дослідники [1] продемонстрували, що водний озон у концентрації 0,75 мг/л є високоефективним для інактивації вірусу SARS-CoV-2 після 5 хвилин інкубації, при цьому концентрація 0,375 мг/л забезпечує 82–91,5% інактивації за цей час. Водночас така концентрація водного озону не була токсичною та не впливала на виживання двох експериментальних моделей комах.

Під час визначення часу впливу (експозиції) на бактерицидну дію водної форми озону встановлено, що найнижча бактерицидна концентрація (0,8–1,0 мг/л) водної форми озону на штами умовно-патогенних бактерій проявлялася протягом експозиції 12–15 хв. Для знищення клітин *E. coli* й *P. aeruginosa* протягом однієї хвилини необхідно, щоб концентрація озону становила 1,23 мг/л, а для *S. aureus* – 1,53 мг/л. Також бактерицидна концентрація водної форми озону на штами *B. subtilis* і *C. albicans* протягом 12–15 хв експозиції становила 1,53 й 1,23 мг/л відповідно. Для швидшого прояву бактерицидної дії необхідно підвищувати концентрацію озону у воді. Подібні результати отримали інші дослідники [8], які показали ефективність озонування щодо впливу в концентрації 1 мг/л протягом 30 с, 1 хв, 5 хв, 10 хв, 20 хв на штами *E. coli* й *E. faecalis*. Виявлено, що клітини *E. faecalis* інактивовані через 30 с після обробки 1 мг/л озону, тоді як клітини *E. coli* інактивувалися повільно, для повного їх знищення треба було 20 хв. У дослідженнях [28] бактерицидна концентрація стабілізованого водного озону на музейних штамів бактерій *S. aureus* і *P. aeruginosa*, які контамінували різні тест-платини (метал, кераміка, пластик), була 1,71 мг/л. Для музейного штаму *E. coli* бактерицидна концентрація була нижча – 1,22 мг/л з експозицією упродовж 2 хв.

Загалом більшість даних щодо бактерицидної концентрації озону на музейних штамів мікроорганізмів узгоджується між собою. На нашу думку, деяка різниця в результатах дослідження між бактерицидною концентрацією і часом впливу на мікроорганізми пов'язана з використанням різних штамів бактерій, умов експерименту, контролю концентрації озону в субстраті. Водночас зазвичай дані засвідчують високу ефективність водної форми озону за концентрації від 1 мг/л та експозиції до 20 хв.

Під час визначення бактерицидної концентрації водної форми озону за білкового навантаження ми виявили, що органічне – білкове – забруднення об'єктів знезараження буде знижувати бактерицидний ефект водної форми озону протягом трьох хвилин експозиції в середньому в 1,6 раза, а за експозиції протягом шість хвилин – приблизно 1,2 раза. Тобто для підвищення ефективності водної форми озону у виробничих умовах необхідно збільшувати його концентрацію і час впливу. Добру ефективність дії водної форми озону у виробничих умовах за миття салату показали дослідження [8], за їхніми даними, після п'яти хвилин миття салату в озонній воді за концентрації 5 мг/л зниження загального мікробного забруднення було в 1,8 log КУО/мл змиву. За іншими даними [2], дія водної форми озону в концентрації від 0,12 до 3,8 мг/л спричиняла зменшення грампозитивної мікрофлори в 1–7 log КУО/мл змиву. Вплив на грамнегативну мікрофлору був майже аналогічний, зокрема за обробки озоном від 0,4 до 6,5 мг/л загальне мікробне забруднення зменшувалося на 0,5–6,5 log КУО/мл змиву.

Таким чином, наші дослідження виявили досить високу антимікробну активність водної форми озону стосовно музейних штамів мікроорганізмів як у суспензійному методі, так і за білкового навантаження. Водночас для оптимізації доз (концентрації) водної форми озону й часу контакту з мікроорганізмами необхідно ще проводити ґрунтовніші дослідження для встановлення всіх чинників, які можуть впливати на процес дезінфекції.

Висновки. Отже, на основі викладеного вище можемо підсумувати таке:

1. Найбільш стійкими до водної форми озону виявилися спороутворюючі бактерії *B. subtilis*, для яких МБК озону становили 1,53 мг/л, на другому місці були дріжджі *C. albicans* – МБК – 1,23 мг/л, середній показник МБК реєструвався до *S. aureus* – 1,0 мг/л, найменша МБК водного озону була до штамів *E. coli* й *P. aeruginosa* – 0,8 мг/л.

2. Найнижча бактерицидна концентрація (0,8–1,0 мг/л) водної форми озону на штами умовно-патогенних бактерій проявлялася протягом експозиції 12–15 хв. Для знищення клітин *E. coli* й *P. aeruginosa* протягом однієї хвилини необхідно, щоб концентрація озону становила 1,23 мг/л, а для *S. aureus* – 1,53 мг/л. Також бактерицидна

концентрація водної форми озону на штами *B. subtilis* і *C. albicans* протягом 12–15 хв експозиції становила 1,53 та 1,23 мг/л відповідно.

3. За органічного забруднення закономірно знижується бактерицидна концентрація водної форми озону, зокрема, протягом трьох хвилин експозиції в середньому в 1,6 раза, а за експозиції протягом шести хвилин приблизно 1,2 раза. Тобто для підвищення ефективності водної форми озону у виробничих умовах необхідно збільшувати його концентрацію і час впливу.

Перспективи подальших досліджень полягають у визначенні знезаражувального ефекту водної форми озону на різних тест-об'єктах (скло, сталь, шкарлупа яєць) та ефективних режимів застосування цього біоциду для деконтамінації поверхні курячих яєць у технології виробництва яєчних продуктів.

Список використаних джерел

1. Albert S., Amarilla A. A., Trollope B., Sng J. D., Setoh Y. X., Deering N., Khromykh A. A. Assessing the potential of unmanned aerial vehicle spraying of aqueous ozone as an outdoor disinfectant for SARS-CoV-2. *Environmental Research*. 2021. Vol. 196. P. 110944. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110944>
2. Aslam R., Alam M. S., Saeed P. A. Sanitization Potential of Ozone and Its Role in Postharvest Quality Management of Fruits and Vegetables. *Food Engineering Reviews*. 2019. Vol. 12, no. 1. P. 48–67. <https://doi.org/10.1007/s12393-019-09204-0>
3. Chandran S., Baker C. A., Hamilton A. N., Dhulappanavar G. R., Jones S. L., Gibson K. E. Aqueous Ozone Efficacy for Inactivation of Foodborne Pathogens on Vegetables used in Raw Meat-Based Diets for Companion Animals. *Journal of Food Protection*. 2023. P. 100175. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100175>
4. Czekalski N., Imminger S., Salhi E., Veljkovic M., Kleffel K., Drissner, D., Von Gunten U. Inactivation of Antibiotic Resistant Bacteria and Resistance Genes by Ozone: From Laboratory Experiments to Full-Scale Wastewater Treatment. *Environmental Science & Technology*. 2016. Vol. 50, no. 21. P. 11862–11871. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02640>
5. El Alami El Hassani N., Baraket A., Alem C. Recent advances in natural food preservatives: a sustainable solution for food safety and shelf life extension. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2024. Vol. 19. P. 293–315. <https://doi.org/10.1007/s11694-024-02969-x>
6. Epelle E. I., Macfarlane A., Cusack M., Burns A., Amaeze N., Richardson K., Yaseen M. Stabilisation of Ozone in Water for Microbial Disinfection. *Environments*. 2022. Vol. 9, no. 4. P. 45. <https://doi.org/10.3390/environments9040045>
7. Feng L., Zhang K., Gao M., Shi C., Ge C., Qu D., Han J. Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* by Aqueous Ozone. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2018. Vol. 28, no. 8. P. 1233–1246. <https://doi.org/10.4014/jmb.1801.01056>
8. Girgin Ersoy Z., Barisci S., Dinc O. Mechanisms of the *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* inactivation by ozone. *LWT*. 2019. Vol. 100. P. 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.095>
9. Glowacz M., Colgan R., Rees D. The use of ozone to extend the shelf-life and maintain quality of fresh produce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014. Vol. 95, no. 4. P. 662–671. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6776>
10. Hamid Z., Meyrick B. K., Macleod J., Heath E. A., Blaxland J. The application ozone within the food industry, mode of action, current and future applications, and regulatory compliance. *Letters in Applied Microbiology*. 2024. Vol. 77, no. 11. P. 101. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovae101>
11. Kouam M. K., Biekop M. H., Katte B., Teguia A. Salmonella status of table eggs in commercial layer farms in Menoua Division, West region of Cameroon. *Food Control*. 2018. Vol. 85. P. 345–349. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.037>
12. Kozlovska I. M., Romanjuk N. Y., Romanjuk L. M., Kukhtyn M. D., Horiuk Y. V., Karpuk G. V. The effect of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of bacteria that are isolated from chronic anal fissures. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*. 2017. Vol. 8, no. 4. P. 577–582. <https://doi.org/10.15421/021789>
13. Kukhtyn M., Horiuk Y., Yaroshenko T., Laiter-Moskaliuk S., Levytska V., Reshetnyk A. Effect of lactic acid microorganisms on the content of nitrates in tomato in the process of pickling. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. 2018. Vol. 1, no. 11 (91). P. 69–75. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2018.120548>
14. Kukhtyn M., Sverhun Z., Horiuk Y., Salata V., Laiter-Moskaliuk S., Mocherniuk M., Horiuk V. The influence of different methods of decontamination of microbial biofilms formed on eggshells. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*. 2024. Vol. 18. P. 666–682. <https://doi.org/10.5219/1981>
15. Lin C. M., Chen S. Y., Lin Y. T., Hsiao C. P., Liu C. T., Hazeena S. H., Hou C. Y. Inactivating *Salmonella Enteritidis* on shell eggs by using ozone microbubble water. *International Journal of Food Microbiology*. 2023. P. 110213. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110213>
16. Miller F. A., Silva C. L. M., Brandão T. R. S. A Review on Ozone-Based Treatments for Fruit and Vegetables Preservation. *Food Engineering Reviews*. 2013. Vol. 5, no. 2. P. 77–106. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9064-5>
17. Mocherniuk M. M., Kukhtyn M. D., Horiuk Y. V., Danilov S. O. Effectiveness of using stabilized aqueous ozone for bioaerosol and surface sanitation in veterinary clinics. *Podilian Bulletin Agriculture Engineering Economics*. 2023. Vol. 38. C. 203–209. <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2023-1.30>
18. Mohammadi-Aragh M. K., Linhoss J. E., Evans J. D. Effects of various disinfectants on the bacterial load and microbiome of broiler hatching eggs using electrostatic spray. *Journal of Applied Poultry Research*. 2022. P. 100278. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2022.100278>
19. Ölmez H., Kretschmar U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT – Food Science and Technology*. 2009. Vol. 42, no. 3. P. 686–693. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001>
20. Patil S., Cullen P. J., Kelly B., Frias J. M., Bourke P. Extrinsic control parameters for ozone inactivation of *Escherichia coli* using a bubble column. *Journal of Applied Microbiology*. 2009. Vol. 107, no. 3. P. 830–837. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04255.x>

21. Pavlovich M. J., Chang H. W., Sakiyama Y., Clark D. S., Graves D. B. Ozone correlates with antibacterial effects from indirect air dielectric barrier discharge treatment of water. *Journal of Physics D: Applied Physics*. 2013. Vol. 46, no. 14. P. 145202. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/14/145202>
22. Perry J. J., Yousef A. E. Decontamination of Raw Foods Using Ozone-Based Sanitization Techniques. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2011. Vol. 2, no. 1. P. 281–298. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133637>
23. Sarron E., Gadonna-Widehem P., Aussenac T. Ozone Treatments for Preserving Fresh Vegetables Quality, A Critical Review. *Foods*. 2021. Vol. 10, no. 3. P. 605. <https://doi.org/10.3390/foods10030605>
24. Savitri D., Shetty S., Chandra S. S., Jayalakshmi K. B., Gowda M., Rai N., Reddy S. Efficacy of ozonated water, 2% chlorhexidine and 5.25% sodium hypochlorite on five microorganisms of endodontic infection: In vitro study. *Advances in Human Biology*. 2018. Vol. 8, no. 1. P. 19. https://doi.org/10.4103/aihb.aihb_45_16
25. Song W. J., Shin J. Y., Ryu S., Kang D. H. Inactivation of Escherichia coli O157:H7, Salmonella Typhimurium and Listeria monocytogenes in apple juice at different pH levels by gaseous ozone treatment. *Journal of Applied Microbiology*. 2015. Vol. 119, no. 2. P. 465–474. <https://doi.org/10.1111/jam.12861>
26. Tizaoui C. Ozone: A Potential Oxidant for COVID-19 Virus (SARS-CoV-2). *Ozone: Science & Engineering*. 2020. Vol. 42, no. 5. P. 378–385. <https://doi.org/10.1080/01919512.2020.1795614>
27. Wan Z., Chen Y., Pankaj S. K., Keener K. M. High voltage atmospheric cold plasma treatment of refrigerated chicken eggs for control of Salmonella Enteritidis contamination on egg shell. *LWT – Food Science and Technology*. 2017. Vol. 76. P. 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.051>
28. Zeweil H. S., Rizk R. E., Bekhet G. M., Ahmed M. R. Comparing the effectiveness of egg disinfectants against bacteria and mitotic indices of developing chick embryos. *The Journal of Basic & Applied Zoology*. 2015. Vol. 70. P. 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2014.12.005>

Sverhun Zh. G.

Postgraduate Student at the Department of Veterinary Obstetrics, Internal Pathology and Surgery,
Higher educational institution “Podillia State University”

Kamianets-Podilskyi, Ukraine

E-mail: daniezana7@gmail.com

ORCID: 0009-0004-6378-2836

Kukhtyn M. D.

Doctor of Veterinary Sciences, Professor,
Head of the Department of Food Biotechnology and Chemistry,
Ternopil Ivan Pului National Technical University

Ternopil, Ukraine

E-mail: kuchtynnic@gmail.com

ORCID: 0000-0002-0195-0767

ASSESSMENT OF BACTERICIDAL ACTION OF AQUEOUS OZONE TO DISINFECTED THE SURFACE OF EGGS

Abstract

Most egg shell contaminants occur immediately after the eggs are laid, and the main source of contamination is the contact of the shell with dirty surfaces. Therefore, the use of ecological safe and effective ways of decontamination of the surface of chicken eggs in the technology of egg production technology, the question is relevant, and the development is innovative and are quite promising. The purpose of this study was to determine the minimal bactericidal concentration and the protein index of aqueous ozone relative to museum strains of microorganisms.

It was established that the most resistant to the aqueous form of ozone were spore-forming bacteria *B. subtilis*, for which minimal bactericidal concentration ozone was 1.53 mg/l, in the second place were yeast *C. albicans* – minimal bactericidal concentration – 1.23 mg/l, the average minimal bactericidal concentration was registered to *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* – 0.8 mg/l. The lowest bactericidal concentration (0.8–1.0 mg/l) of aqueous ozone on strains of conditionally pathogenic bacteria was manifested during an exposure of 12–15 min. For the destruction of *E. coli* and *P. aeruginosa* cells within one minute, it is necessary that the ozone concentration is 1.23 mg/l, and for *S. aureus* – 1.53 mg/l. Also, the bactericidal concentration of ozone on strains *B. subtilis* and *C. albicans* within 12–15 min of the exposure was 1.53 and 1.23 mg/l, respectively. Organic contamination naturally reduces the bactericidal concentration of ozone, in particular within three minutes of the exposure, on average 1.6 times, and for exposures for six minutes about 1.2 times. That is, to increase the efficiency of the water form of ozone in production conditions it is necessary to increase its concentration and time of influence. At the same time, in order to optimize the concentration of the water form of ozone and contact with microorganisms, it is necessary to carry out more thorough studies to establish all factors that can affect the disinfection process.

Key words: water form of ozone, bactericidal action, egg disinfection, bacteria strains.

References

1. Albert, S., Amarilla, A.A., Trollope, B., Sng, J.D., Setoh, Y.X., Deering, N., ... & Khromykh, A.A. (2021). Assessing the potential of unmanned aerial vehicle spraying of aqueous ozone as an outdoor disinfectant for SARS-CoV-2. *Environmental Research*, 196, 110944. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110944> [in English].

2. Aslam, R., Alam, M.S., & Saeed, P.A. (2019). Sanitization potential of ozone and its role in postharvest quality management of fruits and vegetables. *Food Engineering Reviews*, 12(1), 48–67. <https://doi.org/10.1007/s12393-019-09204-0> [in English].
3. Chandran, S., Baker, C.A., Hamilton, A.N., Dhulappanavar, G.R., Jones, S.L., & Gibson, K.E. (2023). Aqueous ozone efficacy for inactivation of foodborne pathogens on vegetables used in raw meat-based diets for companion animals. *Journal of Food Protection*, 100175. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100175> [in English].
4. Czekalski, N., Imminger, S., Salhi, E., Veljkovic, M., Kleffel, K., Drissner, D., ... & Von Gunten, U. (2016). Inactivation of antibiotic resistant bacteria and resistance genes by ozone: From laboratory experiments to full-scale wastewater treatment. *Environmental Science & Technology*, 50(21), 11862–11871. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02640> [in English].
5. El Hassani, N.E.A., Baraket, A., & Alem, C. (2024). Recent advances in natural food preservatives: A sustainable solution for food safety and shelf life extension. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 19, 293–315. <https://doi.org/10.1007/s11694-024-02969-x> [in English].
6. Epelle, E.I., Macfarlane, A., Cusack, M., Burns, A., Amaeze, N., Richardson, K., ... & Yaseen, M. (2022). Stabilisation of ozone in water for microbial disinfection. *Environments*, 9 (4), 45. <https://doi.org/10.3390/environments9040045> [in English].
7. Feng, L., Zhang, K., Gao, M., Shi, C., Ge, C., Qu, D., ... & Han, J. (2018). Inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* by aqueous ozone. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28 (8), 1233–1246. <https://doi.org/10.4014/jmb.1801.01056> [in English].
8. Girgin Ersoy, Z., Barisci, S., & Dinc, O. (2019). Mechanisms of the *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* inactivation by ozone. *LWT*, 100, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.095> [in English].
9. Glowacz, M., Colgan, R., & Rees, D. (2014). The use of ozone to extend the shelf-life and maintain quality of fresh produce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95 (4), 662–671. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6776> [in English].
10. Hamid, Z., Meyrick, B. K., Macleod, J., Heath, E. A., & Blaxland, J. (2024). The application of ozone within the food industry, mode of action, current and future applications, and regulatory compliance. *Letters in Applied Microbiology*, 77(11), 101. <https://doi.org/10.1093/lambio/ovae101> [in English].
11. Kouam, M.K., Biekop, M.H., Katte, B., & Teguaia, A. (2018). Salmonella status of table eggs in commercial layer farms in Menoua Division, West region of Cameroon. *Food Control*, 85, 345–349. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.037> [in English].
12. Kozlovskaya, I.M., Romanjuk, N.Y., Romanjuk, L.M., Kukhtyn, M.D., Horiuk, Y.V., & Karpuk, G.V. (2017). The effect of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms of bacteria that are isolated from chronic anal fissures. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 8 (4), 577–582. <https://doi.org/10.15421/021789> [in English].
13. Kukhtyn, M., Horiuk, Y., Yaroshenko, T., Laiter-Moskaliuk, S., Levytska, V., Reshetnyk A. (2018). Effect of lactic acid microorganisms on the content of nitrates in tomato in the process of pickling. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 1 (11), 69–75. <https://doi.org/10.15587/1729-4061.2018.120548> [in English].
14. Kukhtyn, M., Sverhun, Z., Horiuk, Y., Salata, V., Laiter-Moskaliuk, S., Mocherniuk, M., ... & Horiuk, V. (2024). The influence of different methods of decontamination of microbial biofilms formed on eggshells. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 18, 666–682. <https://doi.org/10.5219/1981> [in English].
15. Lin, C.M., Chen, S.Y., Lin, Y.T., Hsiao, C.P., Liu, C.T., Hazeena, S.H., ... & Hou, C.Y. (2023). Inactivating *Salmonella* Enteritidis on shell eggs by using ozone microbubble water. *International Journal of Food Microbiology*, 110213. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110213> [in English].
16. Miller, F.A., Silva, C.L. M., & Brandão, T.R.S. (2013). A review on ozone-based treatments for fruit and vegetables preservation. *Food Engineering Reviews*, 5(2), 77–106. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9064-5> [in English].
17. Mocherniuk, M.M., Kukhtyn, M.D., Horiuk, Y.V., & Danilov, S.O. (2023). Effectiveness of using stabilized aqueous ozone for bioaerosol and surface sanitation in veterinary clinics. *Podilian Bulletin Agriculture Engineering Economics*, 38, 203–209. <https://doi.org/10.37406/2706-9052-2023-1.30> [in English].
18. Mohammadi-Aragh, M.K., Linhoss, J.E., & Evans, J.D. (2022). Effects of various disinfectants on the bacterial load and microbiome of broiler hatching eggs using electrostatic spray. *Journal of Applied Poultry Research*, 100278. <https://doi.org/10.1016/j.japr.2022.100278> [in English].
19. Ölmez, H., & Kretschmar, U. (2009). Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT-Food Science and Technology*, 42 (3), 686–693. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.08.001> [in English].
20. Patil, S., Cullen, P. J., Kelly, B., Frias, J. M., & Bourke, P. (2009). Extrinsic control parameters for ozone inactivation of *Escherichia coli* using a bubble column. *Journal of Applied Microbiology*, 107 (3), 830–837. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04255.x>.
21. Pavlovich, M.J., Chang, H.W., Sakiyama, Y., Clark, D.S., & Graves, D.B. (2013). Ozone correlates with antibacterial effects from indirect air dielectric barrier discharge treatment of water. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 46 (14), 145202. <https://doi.org/10.1088/0022-3727/46/14/145202> [in English].
22. Perry, J.J., & Yousef, A.E. (2011). Decontamination of raw foods using ozone-based sanitization techniques. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2 (1), 281–298. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133637> [in English].
23. Sarron, E., Gadonna-Widehem, P., & Aussenac, T. (2021). Ozone treatments for preserving fresh vegetables quality: A critical review. *Foods*, 10 (3), 605. <https://doi.org/10.3390/foods10030605> [in English].
24. Savitri, D., Shetty, S., Chandra, S.S., Jayalakshmi, K.B., Gowda, M., Rai, N., ... & Reddy, S. (2018). Efficacy of ozonated water, 2% chlorhexidine and 5.25% sodium hypochlorite on five microorganisms of endodontic infection: In vitro study. *Advances in Human Biology*, 8 (1), 19. https://doi.org/10.4103/aihb.aihb_45_16 [in English].
25. Song, W.J., Shin, J.Y., Ryu, S., & Kang, D.H. (2015). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in apple juice at different pH levels by gaseous ozone treatment. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 465–474. <https://doi.org/10.1111/jam.12861> [in English].
26. Tizaoui, C. (2020). Ozone: A potential oxidant for COVID-19 virus (SARS-CoV-2). *Ozone: Science & Engineering*, 42(5), 378–385. <https://doi.org/10.1080/01919512.2020.1795614> [in English].

27. Wan, Z., Chen, Y., Pankaj, S.K., & Keener, K.M. (2017). High voltage atmospheric cold plasma treatment of refrigerated chicken eggs for control of *Salmonella Enteritidis* contamination on egg shell. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.10.051> [in English].

28. Zeweil, H.S., Rizk, R.E., Bekhet, G.M., & Ahmed, M.R. (2015). Comparing the effectiveness of egg disinfectants against bacteria and mitotic indices of developing chick embryos. *The Journal of Basic & Applied Zoology*, 70, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.jobaz.2014.12.005> [in English].