

**ISPITIVANJE MOGUĆNOSTI PRIMENE PREPARATA NA  
BAZI HLOR-DIOKSIDA ZA DEZINFEKCIJU U POGONIMA ZA  
PRERADU MLEKA\***

***EVALUATION OF POSSIBLE USE OF DISINFECTANT BASED ON  
CHLORINE DIOXIDE IN DAIRY PLANT***

**Mira Rakić-Martinez, Vera Katić\*\***

*Loša higijena površina koje dolaze u kontakt sa hranom ima za posledicu kontaminaciju hrane mikroorganizmima, kao što su: Listeria monocytogenes, Salmonella spp., Escherichia coli, Staphylococcus aureus i dr. koji izazivaju alimentarna oboljenja ljudi.*

*Cilj ovog ispitivanja je bio da se utvrdi efikasnost preparata na bazi hlor-dioksida (0,3 % hlor-dioksid) u laboratorijskim uslovima i u zatvorenom sistemu pogona za preradu mleka i proceni mogućnost njegove primene u dezinfekciji površina u pogonima za preradu mleka.*

*Germicidni efekat preparata TwinOxide ispitivan je kvantitativnim suspenzionim testom (BSEN 1276:1997) prema mikroorganizmima: Listeria monocytogenes, Proteus mirabilis, Escherichia coli, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus i klinički izolat Pseudomonas aeruginosa.*

*Korozivno dejstvo preparata je ispitivano primenom standarda IDF 077:1977. Efikasnost preparata je ispitivana i u zatvorenom sistemu u pogonu za preradu mleka.*

*Preparat na bazi hlor-dioksida pri kontaktnom vremenu od 1 minuta u koncentraciji od 100 ppm, u laboratorijskim uslovima, 100% redukuje  $>10^8$  cfu/ml L. monocytogenes, E. coli, Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, S. aureus, a u koncentraciji 400 ppm  $>10^8$  cfu/ml Bacillus cereus. U prisustvu 2 % i 4 % obranog mleka, pri kontaktnom vremenu od 1 minuta, preparat je efikasan u koncentraciji 200 ppm (2%) i 250 ppm (4%), za sve ispitivane mikroorganizme osim za Bacillus cereus, za koji je bila potrebna koncentracija 400 ppm (2 %) i 500 ppm (4 %). Korozivno dejstvo preparata nije utvrđeno. U uslovima pri-*

\* Rad primljen za štampu 12. 12. 2008. godine

\*\* Mira Rakić-Martinez, dr sci. med. vet., doktorant; dr sci. med. vet. Vera Katić, profesor, Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

*me u zatvorenim sistemima u pogonu za preradu mleka, posle kontakta od 15 minuta, preparat na bazi hlor-dioksida je redukovao broj mikroorganizama, u zavisnosti od mesta primene od 80 do 100%.*

*Ključne reči: hlor-dioksid, dezinfekcija, mleko, germicidni efekat, korozivnost*

## Uvod / Introduction

Incidencu oboljenja ljudi nastalih posle konzumiranja hrane kontaminirane patogenim mikroorganizmima teško je proceniti, jer mnogi slučajevi ostaju nezabeleženi. Prema podacima CDC (Center for disease control and prevention) u SAD kontaminirana hrana uzrok je 76 miliona oboljenja godišnje, od čega 325 hiljada slučajeva sa teškim kliničkim simptomima i 5,2 hiljade sa smrtnim ishodom (Ammon i sar., 2007). Od ovog broja 14 miliona nastaje kao posledica prisustva poznatih patogenih mikroorganizama, jasno identifikovanih kao uzrok oboljenja. U Francuskoj, prema podacima Instituta za javno zdravlje (Institut de Veille Sanitaire, 2000), u periodu od 1999. do 2000. godine registrovano je 1.267 slučajeva oboljenja nastalih posle konzumiranja hrane kontaminirane patogenim mikroorganizmima sa 17.378 obolelih, 1.383 slučaja sa teškim kliničkim simptomima i 10 sa smrtnim ishodom. U periodu 1978–2003. godine, na području Vojvodine, registrovan je 26.851 slučaj salmoneloza, sa prosečnom incidencijom 51,1/100 000 i prosečnim mortalitetom 0,9/100 000. Prosečan letalitet u posmatranom periodu iznosi 0,1% (Petrović i sar., 2005). Najčešći patogeni mikroorganizmi, dokazani u slučajevima oboljenja ljudi, a koji se prenose hranom su: *Salmonella* vrste, *Campylobacter jejuni/coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, patogene *Escherichia coli* (posebno *E. coli* O157:H7).

Bezbednost hrane se u velikoj meri obezbeđuje kontrolom prisustva i rasta patogenih mikroorganizama na hrani i u njoj. U upotrebi su brojna dezinfekciona sredstva za uništavanje bakterija na opremi i površinama u pogonima za preradu mleka. Efikasnost dezinfekcionih sredstava uslovljena je brojnim faktorima, kao što su vreme kontakta, temperatura, koncentracija, pH, predhodno pranje opreme, tvrdoća vode i sposobnost bakterija da se pričvrste za podlogu. Danas je u upotrebi veliki broj dezinfekcionih sredstava, koji sadrže hemijske komponente iz grupa: 1. hlor i jedinjenja koje oslobađaju hlor; 2. kvarterni amonijumovi jedinjenja; 3. amfoterna jedinjenja; 4. jedinjenja fenola; 5. preparati na bazi aktivnog kiseonika iz stabilizovane persirćetne kiseline i dr.

Mnogobrojni radovi u period od 2000. godine do danas ukazuju na efikasnost različitih dezinfekcionih sredstava (Aarnisalo i sar., 2000; Augustin i sar., 2004; Bagge Ravn i sar., 2003; Frank i sar., 2003; Sharma i sar., 2004). Uništavanje većine bakterija relativno je lako s obzirom na njihovu osetljivost na zagrevanje i hemijske komponente. Međutim, mnogi mikroorganizmi ekskretuju ekstracelularne polisaharide i formiraju biofilmove koji štite pojedinačne ćelije i teži su za uklanjanje. Neki mikroorganizmi, kao što su *Clostridium* spp. ili *Bacillus* spp. formi-

raju spore koje su otporne na visoke temperature, kiseline ili hemijske komponente. Bakterije mogu razviti rezistenciju prema sredstvima za dezinfekciju, kada se isto sredstvo koristi u dužem vremenskom periodu (Bloomfield, 2003; Russell, 1995). Kao preventivna mera preporučuje se naizmenična upotreba dezinfekcionih sredstava.

Preparat na bazi hlor-dioksida (TwinOxide®, proizvođača TwinOxide International, PZ Best, Netherlands) je dvokomponentni praškasti proizvod čijim se rastvaranjem u vodi dobija hlor-dioksid sa 99,9% čistoće. Karakteristika preparata na bazi hlor-dioksida je da ne stvara sporedne proizvode (hlorite, hlorate ili slobodni hlor) i da se u rastvoru ponaša kao gas. Zahvaljujući tome što se u rastvoru nalaze u obliku gasa, molekuli ClO<sub>2</sub> mogu dopreći unutar zaštitnog omotača bakterija i bakterija u biofilmu.

Cilj ovog ispitivanja je bio da se utvrdi efikasnost preparata na bazi hlor-dioksida u laboratorijskim uslovima i u zatvorenom sistemu u pogonu za prerađivanje mleka i proceni mogućnost njegove primene za dezinfekciju opreme i površina u pogonima za prerađivanje mleka.

#### **Materijal i metode rada / *Materials and methods***

##### ***Mikroorganizmi / Microorganisms***

Germicidni efekat (GE) preparata na bazi hlor dioksida je ispitivan prema sledećim test mikroorganizmima: *Listeria monocytogenes* 4b ATCC 19115, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Bacillus cereus* ATCC 10876, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Pseudomonas aeruginosa* klinički izolat.

Za aktiviranje referentnih sojeva i dobijanje radne kulture korišćen je TSA (Tryptic Soy Agar). Radne kulture test mikroorganizama dobijene su dvostrukim uzastopnim presejavanjima izraslih kolonija u intervalima od po 24 časa i inkubiranjem na 37°C.

##### ***Određivanje koncentracije preparata na bazi hlor-dioksida / Determination of concentration of preparation based on chlorine dioxide***

Na osnovu koncentracija dezinfekcionih sredstava na bazi hlor-dioksida korišćenih u prethodnim istraživanjima u pogonima prehrambene industrije (Guthrie, 1983; Marriott, 1989; 1997) za ispitivanje germicidnog efekta preparata na bazi hlor-dioksida odabrane su koncentracije od 50 ppm, 100 ppm i 150 ppm pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta u čistoj kulturi mikroorganizama. Na radnim površinama u pogonima za prerađivanje mleka očekivano je prisustvo organske materije, pa je u prisustvu organske materije (2% i 4% obranog mleka) ispitivan germicidni efekat na patogene mikroorganizme preparata na bazi hlor-dioksida u koncentraciji 150 ppm, 200 ppm i 250 ppm.

*Bacillus cereus* je sporulišući patogeni mikroorganizam, što ga čini otpornijim na dezinficijense u odnosu na ostale ispitivane mikroorganizme (Peta, 2003). Iz tog razloga je GE preparata na bazi hlor-dioksida u slučaju ovog mikroorganizma u čistoj kulturi i u prisustvu organske materije ispitivan u koncentracijama 50, 100, 200, 250, 300, 400 i 500 ppm.

Ispitivanja su rađena u tri ponavljanja.

***Ispitivanje germicidnog efekta preparata na bazi hlor dioksida /  
Examinations of germicidal effect of preparation based on chlorine dioxide***

Germicidni efekat preparata na bazi hlor dioksida je ispitivan Kvantitativnim suspenzionim testom BSEN 1276:1997 (Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas).

***Priprema suspenzije mikroorganizama***

Priprema suspenzije mikroorganizama: za svaki test mikroorganizam odpipetirano je u odvojene Erlenmajer boce po 10 ml bujona TSB (Tryptic Soy broth) i dodato po 5 gr sterilnih staklenih perlica, a zatim mešano 3 minuta na mehaničkoj mešalici. Iz radne kulture svakog od test mikroorganizama jedna eza materijala prenet je u pripremljeni rastvor koji je zatim mešan 3 minuta na mehaničkoj mešalici. Broj ćelija u suspenziji određen je zasejavanjem decimalnih razblaženja suspenzije svakog ispitujućeg mikroorganizma posebno, na podlogu TSA. Zasejana podloga je inkubirana 72 časa na 37°C.

Efikasnim dezinficijensom, kada se ispituje Kvantitativnim suspenzionim testom BSEN 1276:1997, smatra se preparat koji smanjuje broj test mikroorganizama najmanje za 5 log<sub>10</sub>.

***Kvantitativni suspenzioni test***

U epruvete je preneto pipetom po 8 ml test preparata različitih koncentracija (50, 100, 150 ppm za čistu kulturu i 150, 200 i 250 ppm u prisustvu organske materije) i dodat po 1 ml sterilne vode, a zatim 1 ml suspenzije svakog test mikroorganizma posebno. Za ispitivanje *Bacillus cereus* ATCC 10876 pored navedenih pripremljene su i koncentracije 300, 400 i 500 ppm test preparata. Kod ispitivanja u prisustvu organske materije u epruvete sa preparatom u navedenim koncentracijama dodato je 2 i 4% obranog mleka i ostatak do 10 ml dopunjen je vodom. Aktivnost preparata je ispitivana pri kontaktnom vremenu 1 i 5 min. Nakon isteka kontaktnog vremena iz svake epruvete je prenet po 1 ml ispitujućeg rastvora u odgovarajući broj epruveta u kojima je ranije pripremljeno po 8 ml rastvora za neutralizaciju (30 g/l Tween 80 u TSB) i 1 ml sterilne vode. Sadržaj u epruvetama je izmešan i ostavljen na sobnoj temperaturi 5 minuta. Posle neutralizacije po 1 ml rastvora iz svake epruvete je prenet na po dve odgovarajuće selektivne podloge za test mikroorganizme: *Listeria monocytogenes* na ALOA (Agar Listeria accord-

ing to Ottaviani and Agosti); *Proteus mirabilis* na BG (Brilliant Green Bile Agar); *Staphylococcus aureus* na BP (Baird-Parker Agar), *Pseudomonas aeruginosa* na TSA (Tryptic Soy Agar), *Escherichia coli* na VRB (Violet Red Bile Agar) i *Bacillus cereus* na TSA (Tryptic Soy Agar). Zasejane podloge su inkubirane 24 časa na 37°C. Po završenoj inkubaciji izbrojane su izrasle kolonije.

Redukcija rasta ispitujućih patogenih mikroorganizama je izračunata po formuli:

$$\text{Redukcija u rastu} = \frac{N \cdot 10^{-1}}{Na}$$

*Reduction in growth*

N – broj patogenih mikroorganizama u mililitru suspenzije (cfu/ml) /

*N* – number of pathogenic microorganisms in milliliter of suspension (cfu/ml)

Na – broj patogenih mikroorganizama posle isteka kontaktnog vremena (cfu/ml) /

*Na* – number of pathogenic microorganisms after end of contact time (cfu/ml)

***Ispitivanje korozivnog dejstva preparata na bazi hlor-dioksida na površinama od nerđajućeg čelika / Examinations of corrosive effect of preparation based on chlorine dioxide on stainless steel surfaces***

Korozivno dejstva preparata na bazi hlor-dioksida je ispitivano na pločicama od nerđajućeg čelika (tip 304 sa završnom obradom tipa 4, koji se koristi u prehrambenoj industriji) dimenzija 50x25x1 mm. Rezultati ispitivanja efikasnosti preparata na bazi hlor-dioksida dobijeni primenom Kvantitativnog suspenzionog testa pokazuju da koncentracija od 250 ppm potpuno uništava većinu test mikroorganizama (izuzetak je *Bacillus cereus* ATCC 10876) u prisustvu 4 % organske materije. Na osnovu toga je korozivno dejstvo preparata na bazi-hlor dioksida, ispitivano neprekidnim dejstvom preparata na bazi hlor-dioksida koncentracije 250 ppm na pločice od nerđajućeg čelika tokom deset dana.

Priprema i ispitivanje pločica rađeni su prema IDF 077:1977 - Standard procedure for testing the corrosiveness of detergents and/or sterilants on metals & alloys intended for use in contact with milk & milk products. Ispitivanje je ponovljeno šest puta.

***Efikasnost preparata na bazi hlor-dioksida u zatvorenom sistemu u pogonu za preradu mleka / Efficacy of preparation based on chlorine dioxide in closed system in milk processing plant***

U zatvorenom sistemu u pogonu za preradu mleka (paster aparat), urađeno je ispitivanje efikasnosti preparata na bazi hlor dioksida. Kroz paster aparat je nakon pranja kiselinom i bazom u trajanju od po 15 minuta, a zatim ispiranja vodom, propušten preparat za dezinfekciju na bazi hlor dioksida koncentracije 100 ppm u trajanju od 15 minuta i pri temperaturi od 40°C. Aparat je zatim ispran vodom. Za ispitivanje efikasnosti preparata za dezinfekciju uzorci su uzeti metodom brisa. Brisevi su uzeti sa unutrašnjih površina cevi paster aparata prvo posle

završenog pranja a pre dezinfekcije, a zatim i posle dezinfekcije ispitivanim preparatom. Svi brisevi su uzimani istim postupkom sa unutrašnjih površina cevi paster aparata promera  $\varnothing$  38 mm u dubini cevi 1 cm. Brisevi su uzeti sa: 1. ulaza sirovog mleka u pumpu paster aparata, 2. izlaza mleka iz sekcije za pasterizaciju, pre hlađenja, 3. izlaza iz pasterizatora posle rekuperacije hlađenja, 4. cevi za povrat pasterizovanog mleka, 5. izlaza pasterizovanog ohlađenog mleka iz cevovoda paster aparata do sirarske kade. Odmah posle uzimanja svaki bris je uronjen u 10 ml sterilnog fiziološkog rastvora posebno i do laboratorije transportovan u rashlađenom stanju. Iz svake epruvete fiziološkog rastvora u koju je uronjen bris zasejavan je po 1 ml u podlogu za određivanje ukupnog broja mikroorganizama i brilijant zeleni laktoza žučni bujon za određivanje koliformnih mikroorganizama. Efikasnost preparata je procenjivana na osnovu smanjenja broja mikroorganizama u mililitru uzetog brisa. Ispitivanje je rađeno u tri ponavljanja.

### Rezultati ispitivanja / Results

Prema preporuci proizvođača (koncentracija preparata za dezinfekciju radnih površina od 50 ppm) i podacima iz literature o koncentraciji dezinfekcionih sredstava koja se koriste u pogonima prehrambene industrije (Guthrie, 1983; Marriott, 1989; 1997) za ispitivanje germicidnog efekta preparata na bazi hlor dioksida odabrane su koncentracije od 50, 100 i 150 ppm pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta u čistoj kulturi. Mikroorganizam *Bacillus cereus* je sporulišući patogeni mikroorganizam, što ga čini otpornijim na dezinficijense u odnosu na ostale ispitivane mikroorganizme pa je za ispitivanje germicidnog efekata preparata na bazi hlor dioksida prema ovom mikroorganizmu upotrebljena veća koncentracija (300, 400 i 500 ppm) preparata (Peta, 2003). Rezultati ispitivanja germicidnog efekta preparata na bazi hlor-dioksida prikazani su u tabeli 1.

Rezultati prikazani u tabeli predstavljaju srednje vrednosti tri ponavljanja.

Preparat na bazi hlor dioksida u koncentraciji od 50 ppm pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta smanjuje broj kolonija: *Listeria monocytogenes* 4b, ATCC 19115, *Proteus mirabilis* ATCC 35659, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Pseudomonas aeruginosa* klinički izolat, za  $2 \log_{10}$ , a u koncentracijama od 100 i 150 ppm pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta potpuno uništava navedene mikroorganizme. Za potpuno uništavanje kolonija *Bacillus cereus* ATCC 10876, pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta potrebna je koncentraciji preparata na bazi hlor-dioksida od 400 ppm (tabela 1).

Na radnim površinama u pogonima za preradu mleka očekivano je prisustvo organske materije, pa je ispitivan germicidni efekat preparata na bazi hlor-dioksida u koncentraciji 150, 200 i 250 ppm na patogene mikroorganizme u prisustvu 2% obranog mleka i 4% obranog mleka, za sve test mikroorganizme osim *Bacillus cereus* za koji su pored navedenih ispitivane i koncentracija preparata od 300, 400 i 500 ppm. Rezultati tih ispitivanja prikazani su u tabeli 2.



Tabela 1. Rezultati ispitivanja germicidnog efekta preparata na bazi hlor-dioksida prema test mikroorganizmima u čistoj kulturi

Table 1. Results of examinations of germicidal effect of preparation based on chlorine dioxide according to microorganism test in pure culture

Test mikroorganizam / <i>Microorganism test</i>	Gustina suspenzije / <i>Density of suspension</i> (cfu/ml)	Temperatura ambijenta / <i>Ambient temperature</i> (°C)	Koncentracija dezinficijensa / <i>Disinfectant concentration</i>	GE* 1 min (cfu/ml)	GE 5 min (cfu/ml)
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	4,65 x 10 <sup>8</sup>	20 ± 1	50 ppm 100 ppm 150 ppm	10 <sup>6</sup> St. St.	10 <sup>6</sup> St. St.
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	4,23 x 10 <sup>8</sup>	20 ± 1	50 ppm 100ppm 150 ppm	10 <sup>6</sup> St. St.	10 <sup>6</sup> St. St.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,78 x 10 <sup>8</sup>	20 ± 1	50 ppm 100ppm 150 ppm	10 <sup>6</sup> St. St.	10 <sup>6</sup> St. St.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3,65 x 10 <sup>8</sup>	20 ± 1	50 ppm 100ppm 150 ppm	10 <sup>6</sup> St. St.	10 <sup>6</sup> St. St.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> kinički izolat / <i>clinical isolate</i>	4,32 x 10 <sup>8</sup>	20 ± 1	50 ppm 100ppm 150 ppm	10 <sup>6</sup> St. St.	10 <sup>6</sup> St. St.
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	5,28 x 10 <sup>8</sup>	20 ± 1	50 ppm 100 ppm 150 ppm 200 ppm 250 ppm 300ppm 400ppm 500ppm	10 <sup>8</sup> 10 <sup>8</sup> 10 <sup>8</sup> 10 <sup>8</sup> 10 <sup>5</sup> 10 <sup>3</sup> St. St.	10 <sup>8</sup> 10 <sup>8</sup> 10 <sup>8</sup> 10 <sup>8</sup> 10 <sup>5</sup> 10 <sup>3</sup> St. St.

\*Prikazani rezultati su srednja vrednost tri ponavljanja / *Shown results are mean value of three repetitions*  
St. – nalaz sterilan (nema rasta) / *finding sterile (no growth)*

Preparat na bazi hlor-dioksida u koncentraciji od 150 ppm, pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta u prisustvu 2% obranog mleka smanjio je broj kolonija svih ispitujućih mikroorganizama, osim *Bacillus cereus* ATCC 10876 za 4 log<sub>10</sub>. Koncentracije od 200 i 250 ppm u prisustvu 2% organske materije i pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta potpuno su uništile sve prisutne mikroorganizme, dok je za isti rezultat kod *Bacillus cereus* ATCC 10876 bila potrebna koncentracija preparata od 400ppm. U prisustvu 4% obranog mleka koncentracije ispitivanog preparata od 150 i 200 ppm, smanjuju broj kolonija svih test mikroorganizama, osim *Bacillus cereus* ATCC 10876 za 3 log<sub>10</sub>, odnosno 6 log<sub>10</sub>. Preparat potpuno uništava mikroorganizme u koncentraciji od 250 ppm pri kontaktnom vremenu od 1 i 5 minuta. U slučaju *Bacillus cereus* ATCC 10876 koncentracija od 500 ppm uništava sve kolonije (tabela 2).

Tabela 2. Rezultati ispitivanja germicidnog efekta preparata na bazi hlor dioksida prema test mikroorganizmima u prisustvu organske materije /  
 Table 2. Results of examinations of germicidal effect of preparation based on chlorine dioxide according to microorganism test in presence of organic matter

Test mikroorganizam / Microorganism test	Gustina suspenzije / Density of suspension (cfu/ml)	Tem. ambijenta / Ambient temperature (°C)	Konc. dezinf. / Disinfectant concentration 2 % ob. mleka / milk with 2% milk fat	GE*		Konc. dezinf. / Disinfectant concentration 4 % ob. mleka		GE	
				1 min	5 min	1 min	5 min	1 min	5 min
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19115	4,65 x 10 <sup>8</sup>	20 ± 1	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 <sup>4</sup> St. St.	10 <sup>4</sup> St. St.	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 <sup>5</sup> 10 <sup>2</sup> St.	10 <sup>5</sup> 10 <sup>2</sup> St.	
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 35659	4,23 x 10 <sup>8</sup>	20 ± 1	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 <sup>4</sup> St. St.	10 <sup>4</sup> St. St.	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 <sup>5</sup> 10 <sup>2</sup> St.	10 <sup>5</sup> 10 <sup>2</sup> St.	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	2,78 x 10 <sup>8</sup>	20 ± 1	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 <sup>4</sup> St. St.	10 <sup>4</sup> St. St.	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 <sup>5</sup> 10 <sup>2</sup> St.	10 <sup>5</sup> 10 <sup>2</sup> St.	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	3,65 x 10 <sup>8</sup>	20 ± 1	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 <sup>4</sup> St. St.	10 <sup>4</sup> St. St.	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 <sup>5</sup> 10 <sup>2</sup> St.	10 <sup>5</sup> 10 <sup>2</sup> St.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> klinički izolat / clinical isolate	4,32 x 10 <sup>8</sup>	20 ± 1	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 <sup>4</sup> St. St.	10 <sup>4</sup> St. St.	150 ppm 200 ppm 250 ppm	10 <sup>5</sup> 10 <sup>2</sup> St.	10 <sup>5</sup> 10 <sup>2</sup> St.	
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10876	5,28 x 10 <sup>8</sup>	20 ± 1	150 ppm 200 ppm 250 ppm 300 ppm 400 ppm 500 ppm	10 <sup>8</sup> 10 <sup>8</sup> 10 <sup>5</sup> 10 <sup>3</sup> St. St.	10 <sup>8</sup> 10 <sup>8</sup> 10 <sup>5</sup> 10 <sup>3</sup> St. St.	150 ppm 200 ppm 250 ppm 300 ppm 400 ppm 500 ppm	10 <sup>8</sup> 10 <sup>8</sup> 10 <sup>5</sup> 10 <sup>3</sup> St. St.	10 <sup>8</sup> 10 <sup>8</sup> 10 <sup>5</sup> 10 <sup>3</sup> St. St.	

\* Prikazani rezultati su srednja vrednost tri ponavljanja / Shown results are mean value of three repetitions  
 St. – sterilan nalaz (nema rasta) / St. – finding sterile (no growth)



Oprema u objektima za preradu mleka izrađena je uglavnom od nerđajućeg čelika (tip 304 i 316). Korozivnost ovih površina razlog je ograničene primene mnogih sredstava za dezinfekciju. Rezultati ispitivanja korozivnog efekta preparata na bazi hlor-dioksida na površine od nerđajućeg čelika (304 sa stepenom obrade 4) koji se koristi za izradu opreme u pogonima za preradu mleka su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. Rezultati merenja mase pločica od nerđajućeg čelika pre i posle primene preparata na bazi hlor-dioksida

Table 3. Results of measurements of mass of stainless steel plates before and after application of preparation based on chlorine dioxide

Broj pločice / Plate number	Masa pločica pre dezinfekcije* / Plate mass before disinfection (gr)	Masa pločica posle dezinfekcije <sup>1</sup> / Plate mass after disinfection (gr)
1.	9,9903	9,9898
2.	9,9496	9,9489
3.	10,0376	10,0369

\*Prikazani rezultati su srednja vrednost šest ponavljanja / Shown results are mean value of six repetitions

<sup>1</sup>Masa pločica izmerena posle neprekidnog dejstva preparata na bazi hlor dioksida koncentracije 100 ppm tokom deset dana / Plate mass measured after constant effect of preparation based on chlorine dioxide in concentration of 100 ppm during ten day

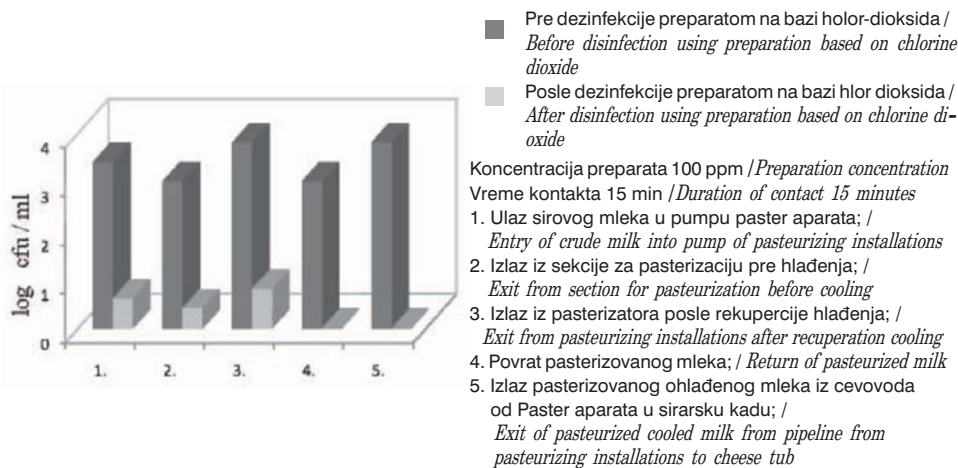
Na osnovu merenja i vizuelnog pregleda pločica od nerđajućeg čelika tipa 304, posle neprekidnog dejstva preparata na bazi hlor dioksida koncentracije 250 ppm tokom deset dana, utvrđeno je da je gubitak mase u nivou statističke greške i da nema vidljivih promena u boji i strukturi materijala.

Pošto je utvrđena koncentracija preparata na bazi hlor dioksida, koja u laboratorijskim uslovima efikasno deluje na ispitivane patogene mikroorganizme, a nije zapaženo korozivno dejstvo preparata na površinama od nerđajućeg čelika tipa 304, ispitivana je efikasnosti preparata na bazi hlor dioksida u zatvorenom sistemu u pogonu za preradu mleka (aparatus za pasterizaciju mleka).

Budući da je suspenzionim testom utvrđen dobar germicidni efekat preparata na bazi hlor-dioksida u koncentraciji 100 ppm prema ispitujućim mikroorganizmima, a da dezinfekciji prethodi dobro pranje, za ispitivanje efikasnosti ovog dezinficijensa u zatvorenom sistemu odabrana je ista koncentracija.

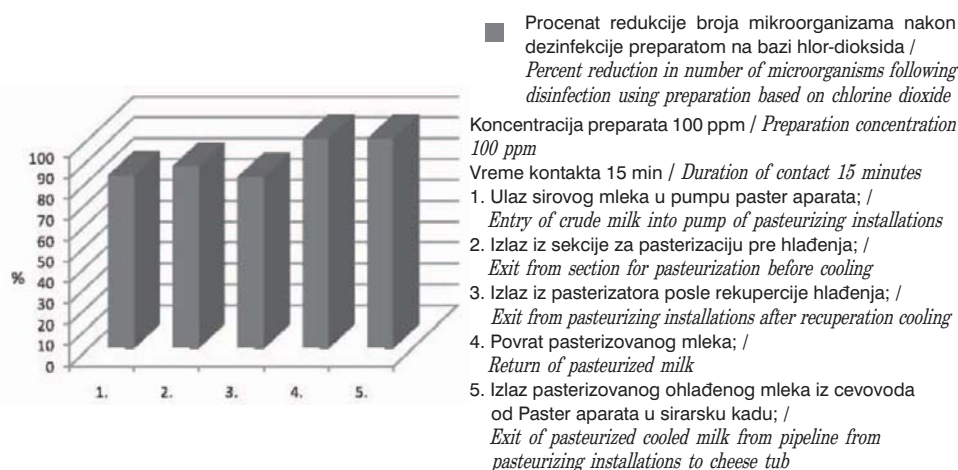
Rezultati ispitivanja efikasnosti preparata na bazi hlor-dioksida koncentracije 100 ppm u zatvorenom sistemu pogona za preradu mleka prikazani su na histogramima 1 i 2.

Analizom briseva uzetih sa površina posle pranja, a pre dezinfekcije preparatom na bazi hlor-dioksida nije dokazano prisustvo koliformnih mikroorganizama.



Histogram 1. Prikaz efikasnosti primene preparata na bazi hlor dioksida za dezinfekciju paster aparata /

*Histogram 1. Efficacy of application of preparation based on chlorine dioxide for disinfection of pasteurizing installations*



Histogram 2. Procenat redukcije broja mikroorganizama nakon dezinfekcije paster aparata preparatom na bazi hlor dioksida /

*Histogram 2. Percent reduction in number of microorganisms following disinfection of pasteurizing installations using preparation based on chlorine dioxide*

Rezultati prikazani na histogramu 2 pokazuju da preparat na bazi hlor dioksida u koncentraciji od 100 ppm redukuje broj mikroorganizama u zavisnosti od mesta primene za 80 do 100%.

## Diskusija / Discussion

Mleko se patogenim mikroorganizmima kontaminira primarno iz inficirane mlečne žlezde i sekundarno sa površina sa kojima dolazi u kontakt tokom muže, obrade i prerade. Mikroorganizmi u proizvode od mleka mogu dospeti kao rezultat rekontaminacije sa opreme koja se neadekvatno održava. Uslovi povećane vlažnosti u pogonima za preradu mleka, omogućavaju rast mikroorganizama (Wirtanen i sar., 1997).

Efikasnost dezinficijensa koji se koriste u pogonima za preradu mleka procenjuje se na osnovu njihovog dejstva na prisutne mikroorganizme. Suspenzionim testom BSEN 1276 utvrđen je dobar germicidni efekat preparata na bazi hlor dioksida u koncentraciji 100 ppm prema nesporogenim mikroorganizmima u čistoj kulturi bez organske materije, a za *Bacillus cereus* u čistoj kulturi bez organske materije koncentracija od 400 ppm.

Prisustvo organske materije u pogonima za preradu mleka utiče na smanjenje efikasnosti sredstava za dezinfekciju (Gram i sar., 2007). U našim ispitivanjima dodavanje organske materije je uticalo na smanjenje efikasnosti preparata na bazi hlor-dioksida prema ispitujućim mikroorganizmima. Za postizanje potpunog germicidnog efekta prema ispitujućim nesporogenim mikroorganizmima u prisustvu 2% obranog mleka bila je potrebna koncentracija od 200 ppm, a za postizanje germicidnog efekta prema *Bacillus cereus* bila je potrebna koncentracija od 400 ppm. Povećana koncentracije obranog mleka (4%) u medijumu za ispitivanje germicidnog efekta preparata na bazi hlor-dioksida smanjila je njegovu efikasnost prema ispitujućim mikroorganizmima. Za postizanje dobrog germicidnog efekta prema nesporogenim mikroorganizmima bilo je potrebno da se koncentracija preparata na bazi hlor-dioksida poveća na 250 ppm, a za postizanje istog rezultata za *Bacillus cereus* bilo je potrebno da se koncentracija preparata poveća na 500 ppm. Rezultati ispitivanja više autora (Augustin i sar., 2004; Bagge i sar., 2003; Frank i sar., 2003; Sharma i sar., 2004) ukazuju na efikasnost različitih preparata za dezinfekciju u prehrambenoj industriji. Brojna ispitivanja preparata na bazi hlor-dioksida (Guthrie, 1983; Lindsay, 2002; Marriott, 1989; 1997; Yuk i sar., 2006), pokazuju visok stepen njihove efikasnosti u delovanju na mikroorganizme, kao što su: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* vrste, što daje veliku mogućnost njihove primene u industriji mleka.

Pored germicidnog efekta, preparati koji se koriste za dezinfekciju u objektima za preradu mleka moraju da zadovolje i određene tehnološke, toksikološke, ekološke i ekonomske zahteve. Jedan od zahteva je i da ne deluju korozivno na površine opreme koja se koristi u prehrambenoj industriji. U našim ispitivanjima na osnovu merenja i vizuelnog pregleda pločica od nerđajućeg čelika tipa 304, posle neprekidnog dejstva preparata na bazi hlor-dioksida koncentracije 250 ppm tokom deset dana gubitak mase pločice je bio u nivou statističke greške i nisu uočene vidljive promene u boji i strukturi materijala.

Evropska direktiva za biocidne preparate (European biocidal product directive 98/8/EC) koja je od 2000. godine postala obavezujući deo zakonske regulative svih zemalja članica EU predviđa standarde za dezinfekciona sredstva koja se upotrebljavaju u pogonima za prerađu mleka.

Rezultati ispitivanja efikasnosti hlor dioksida i drugih preparata koji se koriste za dezinfekciju u prehrambenoj industriji (Kreske, 2006), kao i rezultati dobijeni ovim ispitivanjem upućuju na mogućnost njegove primene u pogonima za prerađu mleka.

### **Zaključak / Conclusion**

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da ispitivani preparat na bazi hlor dioksida pri kontaktnom vremenu od 1 minuta u koncentraciji od 100 ppm, u laboratorijskim uslovima, 100% redukuje  $>10^8$  cfu/ml u monokulturi: *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, a u koncentraciji od 400ppm  $>10^8$  cfu/ml *Bacillus cereus*.

U prisustvu organske materije 2% i 4% obranog mleka, pri kontaktnom vremenu od 1 minuta, preparat je potpuno efikasan u koncentraciji 200 ppm (2%) i 250 ppm (4%), za sve ispitivane mikroorganizme osim za *Bacillus cereus* za koji je potrebna koncentracija 400 ppm (2%) i 500 ppm (4 %).

Na osnovu merenja i vizuelnog pregleda pločica od nerđajućeg čelika tipa 304, koji se koristi u pogonima za prerađu mleka, a koje su izlagane neprekidnom dejstvu preparata na bazi hlor-dioksida koncentracije 250 ppm u trajanju od deset dana može se zaključiti da je gubitak mase u nivou statističke greške i da nema vidljivih promena u boji i strukturi materijala.

U uslovima primene u zatvorenim sistemima pogona za prerađu mleka (paster aparat) preparat na bazi hlor-dioksida u koncentraciji od 100 ppm efikasno je redukovao broj prisutnih mikroorganizama za 80 do 100%.

Dobijeni rezultati i karakteristike ispitivanog preparata na bazi hlor-dioksida ukazuju na to da se ovaj preparat može koristiti za dezinfekciju opreme i površina u pogonima za prerađu mleka.

### **Literatura / References**

1. Aarnisalo K, Salo S, Miettinen H, Suihko ML, Wirtanen G, Autio T, Lunden J, Korkeala H, Sjoberg AM. Bactericidal efficiencies of commercial disinfectants against *Listeria monocytogenes* on surfaces. J Food Safety 2000; 20: 237-50.
2. Ammon A, Tauxe RV. Investigation of multi-national foodborne outbreaks in Europe: some challenges remain. Epidemiol Infect 2007; 135: 887-9.
3. Augustin M, Ali-Vehmas T, Atroshi F. Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. J Pharm Pharmaceut Sci 2004; 7: 55-64.
4. Bagge Ravn D, Gardshodn K, Gram L, Vogel BF. Comparison of sodium hypochlorite-based foam and peroxyacetic acid-based fog sanitizing procedures in a salmon smokehouse: survival of the general microflora and *Listeria monocytogenes*. J Food Prot 2003; 66: 592-8.

5. Bloomfield SF. Resistance of bacterial spores to chemical agents. In AD Russell, WB Hugo, and GAJ Ayliffe (ed.), Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization, 3rd ed., in press. Blackwell Science, Oxford, England, 2002.
6. Bower CK, McGuire J, Daeschel MA. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food contact surfaces. Trends Food Sci Technol 1996; 7: 152-7.
7. BSEN 1276. 1997 (Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas).
8. DIRECTIVE 98/8/EC OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market, Official Journal of the European Communities, 1998
9. Elliott RP. Cleaning and Sanitizing. In: AM Katsuyama, and JP Strachas editors. Principles of food processing Sanitation. Food Processors Inst., Washington 1980; 76.
10. Frank JF, Ehlers J, Wicker L. Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. Food Prot Trends 2003; 23: 654-63.
11. Gram L *et al.* Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. Food Control 2007; 18: 1165-71.
12. Guthrie RK. Food Sanitation. 2nd Edition. AVI Publishing Company, Inc., Westport, Connecticut, 1983.
13. IDF 077:1977 - Standard procedure for testing the corrosiveness of detergents and/or sterilants on metals & alloys intended for use in contact with milk & milk products.
14. Kreske CA, Ryu JH, Beuchat RL. Evaluation of Chlorine, Chlorine dioxide, and Peroxyacetic Acid-Based Sanitizer for Effectiveness in Killing *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Spores in Suspension, on the Surface of Stainless Steel, and on Apples, J Food Protection 2006; 69(8): 1892-903.
15. Lindsay D, Brözel BS, Mostert JF, von Holy A. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate, J Appl Microbiology 2002; 92(2): 352-61.
16. Marriott NG. Principles of Food Sanitation. 2nd Edition. New York, NY: Van Reinhold, 1989.
17. Marriott NG. Essentials of Food Sanitation. New York, NY: Chapman & Hall, International Thomson Publishing, 1997.
18. Peta ME, Lindsay D, Brözel VS, von Holy A. Susceptibility of food spoilage *Bacillus* species to chlorine dioxide and other sanitizers, South African J Sci 2003; 99(7/8): 375-80.
19. Petrović V, Stefanović S, Đurić P. Epidemiološke karakteristike salmoneloza u Vojvodini, Medicinski pregled 2005; 58(3-4): 136-41.
20. Russell AD. Mechanisms of bacterial resistance to biocides. Int Biodeterior Biodegrad 1995; 36: 247-65.
21. Sharma M, Beuchat LR. Sensitivity of *Escherichia coli* O157:H7 to commercially available alkaline cleaners and subsequent resistance to heat and sanitizers. Appl Environ Microbiol 2004; 70: 1795-803.

22. Summary Statistics for Foodborne Outbreaks, Number of Foodborne Disease Outbreaks by Etiology ([http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/guide\\_fd.htm](http://www.cdc.gov/foodborneoutbreaks/guide_fd.htm)), 2006.
23. The French National Institute for Public Health Surveillance (Institut de Veille Sanitaire) publishes a weekly electronic epidemiological bulletin (B.E.H) that can be found at: <http://www.invs.sante.fr/> , 2000.
24. Yuk HG, Bartz JA, Schneider KR. The Effectiveness of Sanitizer Treatments in Inactivation of *Salmonella* spp. from Bell Pepper, Cucumber, and Strawberry, J Food Sci 2006; 71(3): 95-9.
25. Wirtanen G, Satu Salo, Maukonen J, Bredholt S, Mattila-Sandholm S: NORDFOOD, Sanitation in dairys, 1997.

ENGLISH

**EVALUATION OF POSSIBLE USE OF DISINFECTANT BASED ON CHLORINE DIOXIDE IN DAIRY PLANT**

**Mira Rakić-Martinez, Vera Katić**

Poor sanitation of food contact surfaces has been a contributing factor in food borne disease outbreaks, especially those involving *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* etc.

The objectives of this study were therefore to: 1. Determine the efficiency of a disinfectant based on chlorine dioxide in suspension in a closed system in a dairy plant. 2. Evaluate the possibility of disinfection of working surfaces with a disinfectant based on chlorine dioxide.

In order to determine the germicidal effect of the disinfectant based on chlorine dioxide by suspension test (BSEN 1276:1997); the following test organisms were used: *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. The corrosive properties of the disinfectant based on chlorine dioxide were tested by IDF 077:1977 standard. The efficacy of this disinfectant was investigated in a closed system in a dairy plant.

Results indicated a 100% reduction of  $> 10^8$  cfu/ml *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, viable count after 1 minute of exposure to 100 ppm of the disinfectant based on chlorine dioxide and 400 ppm for *Bacillus cereus*. In the presence of 2% skim milk and 4 % skim milk concentrations of 200 and 250 ppm resulted in 100% reduction in numbers of the five of six test microorganisms, respectively. The spore former, *Bacillus cereus* is less susceptible to the disinfectant. Therefore, the efficient concentration for 100% reduction in viable count after 1 minute exposure was 500 ppm. The corrosive properties of the disinfectant were not determined. In the case of closed system disinfection in a dairy plant, reduction in viable count after 15 minute exposure to 100 ppm of disinfectant based on chlorine dioxide ranged from 80 to 100%.

Key words: chlorine dioxide, disinfection, milk, germicidal effect, corrosiveness

## ИСПЫТАНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВАНИИ ХЛОРА ДИОКСИДЬ ДЛЯ ДЕЗИНФЕКЦИИ В ЦЕХАХ ДЛЯ ПЕРЕРАБОТКИ МОЛОКА

Мира Ракич-Мартинез, Вера Катич

Плохая гигиена поверхностей, приходящие в контакт с пищей имеет для последствия контаминацию корма микроорганизмами, как суть: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* и пр. вызывающие алиментарные заболевания людей.

Цель этого испытания была утвердить эффективность препарата на основании хлора диоксидь (0,3% хлора диоксидь) в лабораторных условиях и в закрытой системе цеха для переработки молока, и оценить возможность его применения в дезинфекции поверхностей в цехах для переработки молока.

Гермицидный эффект препарата *TwinOxide* испытан количественным суспензионным тестом (БСЕН 1276:1997) к микроорганизмам: *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* и клинический изолят *Pseudomonas aeruginosa*.

Корозивное действие препарата испытано применением стандарта ИДФ 077: 1977. Эффективность препарата испытана и в закрытой системе в цехе для переработки молока.

Препарат на основании хлора диоксидь при контактном времени от 1 минуты в концентрации от 100 ппм, в лабораторных условиях, 100% редуцирует  $10^8$  цфу/мл *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, а в концентрации 400 ппм  $>10^8$  цфу/мл *Bacillus cereus*. В присутствии 2% и 4% снятого молока, при контактном времени от 1 минуты, препарат эффективный в концентрации 200 ппм (2%) и 250 ппм (4%), для всех испытанных микроорганизмов кроме для *Bacillus cereus* для которого была нужна концентрация 400 ппм (2%) и 500 ппм (4%). Корозивное действие препарата не утверждено. В условиях применения в закрытых системах в цехе для переработки молока, после контакта от 15 минут, препарат на основании хлора диоксидь редуцировал число микроорганизмов, в зависимости от места применения от 80 до 100%.

Ключевые слова: хлора диоксидь, дезинфекция, молоко, гермицидный эффект, корозивность