

# EFFECT OF DISINFECTANTS BASED ON POTASSIUM PERSULFATE, HYDROGEN PEROXIDE, GLUTARALDEHYDE AND QUATERNARY AMMONIUM COMPOUNDS ON THE GENETIC MATERIAL OF THE PATHOGEN BACTERIA SPECIFIC TO MEAT PROCESSING INDUSTRY

## ВЛИЯНИЕ ДЕЗИНФИЦИРУЮЩИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ПЕРСУЛЬФАТА КАЛИЯ, ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА, ГЛУТАРАЛЬДЕГИДА И ЧЕТВЕРТИЧНЫХ АММОНИЙНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МАТЕРИАЛ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ПАТОГЕНОВ, СПЕЦИФИЧНЫХ ДЛЯ МЯСОПЕРЕРАБАТЫВАЮЩЕЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ

Afonyushkin V.N.,<sup>1,2</sup> Tabanyukhov K.A.,<sup>1,4</sup> Cherepushkina V.S.,<sup>1</sup> Khomenko Yu.S.,<sup>1</sup> Tatarchuk O.P.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>- The Institute of the Experimental veterinary of the Siberia and the Far East, Krasnoobsk, Novosibirsk region, Russia

<sup>2</sup>- The Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup>- KRKA PHARMA, Moscow, Russia

<sup>4</sup>- Novosibirsk State Agrarian University, Novosibirsk, Russia

**Ключевые слова:** персульфат калия, глутаральдегид, ЧАС, перекись водорода, дезинфекция, мясопереработка, антибиотикорезистентность, ДНК

**Keywords:** potassium persulfate, glutaraldehyde, quaternary ammonium compounds, hydrogen peroxide, disinfection, meat processing, antibiotic resistance

### Аннотация

Изучались изменения в генетическом материале бактерий, возникающие под действием дезинфицирующих средств различных химических классов. Методами молекулярной биологии и геной инженерии установлено, что дезинфицирующее средство Экоцид разрушает как изолированный генетический материал, так и находящиеся в составе бактериальных клеток хромосомную и плазмидную ДНК. Разрушение генетического материала бактерий при дезинфекции оборудования мясоперерабатывающих предприятий необходимо для предотвращения горизонтального переноса нежелательной генетической информации, например генов антибиотикоустойчивости или токсинообразования.

### Abstract

The changes in bacterial genetic material under the action of different biocidal products have been investigated. It was confirmed by PCR and genetic engineering that biocidal product Ecocid was able to remove both chromosomal and plasmid DNA, either isolated or contained within the bacterial cells. Using a disinfectant that destroys DNA on the surfaces of meat production equipment is a promising measure to prevent horizontal transfer of unwanted genetic material, such as bacterial genes associated with the resistance to antibiotics, or genes of toxin production.

### Введение

Общепринято, что биологическая безопасность пищевой продукции зависит в том числе от степени удаления загрязнений и бактериальных контаминантов с поверхностей технологического оборудования предприятий мясной отрасли. Тем не менее, с развитием знаний о механизмах обмена генетической информацией у бактерий стало очевидно, что биологическая безопасность продукции пищевой промышленности может быть нарушена в случае горизонтальной передачи нежелательной генетической информации — генов антибиотикоустойчивости, эндо- и экзотоксинообразования и т.д. (Verraes с соавт., 2013). Это особенно актуально для мясной промышленности: сложный состав биологической матрицы способен защитить ДНК от разрушения, а специфические для мясопереработки условия окружающей среды — низкая температура, гипертоническая среда, высокие концентрации солей, стрессовые воздействия и т.д., — могут привести к возникновению компетентных клеток бактерий, способных к поглощению и использованию экзогенной ДНК (Straub с соавт., 1999; Bauer с соавт., 2004). Учитывая этот факт, на предприятиях мясной промышленности целесообразно использовать

### Introduction

It is generally accepted that the biological safety of food products depends, among other things, on the degree of elimination of impurities and bacterial contaminants from surfaces of the technological equipment of meat sector enterprises. Nevertheless, with increasing knowledge of the mechanisms of the genetic information exchange in bacteria, it became obvious that the biological safety of food industry products can worsen in case of the horizontal transfer of the undesirable genetic information — antimicrobial resistance genes, genes for endo- and exotoxin production, etc. (Verraes с соавт., 2013). This is especially topical for the meat industry: the complex composition of the biological matrix is able to protect DNA from destruction, and the specific environmental conditions of meat processing (low temperature, hypertonic environment, high concentrations of salts, stress and so on) can lead to emergence of the competent bacterial cells capable of absorbing and using exogenous DNA (Straub et al., 1999; Bauer et al., 2004). Taking into consideration this fact, it is expedient to use in meat industry enterprises those disinfectants that not only reduce microbial contamination of surfaces being treated, but also lower a probability of the horizontal

дезинфицирующие средства, не только уменьшающие микробную обсемененность обрабатываемых поверхностей, но и снижающие вероятность горизонтального переноса нежелательной генетической информации путем разрушения или инактивации ДНК.

На основании изучения данных о физико-химических и биологических свойствах дезинфицирующих средств, наиболее часто используемых на агропромышленных предприятиях и в мясной промышленности, возникло предположение, что подавляющее большинство дезсредств не оказывает существенного воздействия на генетическую информацию, и не препятствует горизонтальному переносу генов. Целью данного исследования явилась экспериментальная проверка этой гипотезы, а также поиск перспективных дезинфицирующих средств, позволяющих предотвратить горизонтальный перенос нежелательной генетической информации при дезинфекции производственного оборудования на предприятиях мясной промышленности.

### Материалы и методы

Исследования проводились в секторе молекулярной биологии ФГБНУ «Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока» и лаборатории фармакогеномики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» (г. Новосибирск).

Для исследований использовались следующие дезинфицирующие средства: Вирошелд на основе глутаральдегид и композиции четвертичных аммонийных соединений (ЧАС), НРПИ на основе перекиси водорода, и Экоцид на основе персульфата калия, производства компании ООО «КРКА ФАРМА».

Использовались следующие референтные штаммы санитарно-показательных микроорганизмов: *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Salmonella enterica var typhimurium* TA100 (коллекция ИХБФМ СО РАН), *E. coli* XL Blue с плазмидой pBluescript, несущей ген устойчивости к ампициллину. Выделение ДНК бактерий проводилось стандартным силико-сорбционным методом; выделение плазмидной ДНК осуществлялось фенол-хлороформным методом (Маниатис и Фрич, 1984).

ПЦР в реальном времени проводилась на реалтайм-амплификаторах «MiniOpticon» (BioRad) и LightCycler (Roche) в конечном объеме 25 мкл, содержащем 67 мМ трис-НСl (рН 8,9), 16 мМ сульфат аммония; 2,4 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,01% Твин 20; 0,2 мМ дНТФ; 0,5 мкМ олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентного зонда, Taq-ДНК полимеразы 1-2 ед.

Для оценки влияния исследуемых дезинфицирующих средств на генетическую информацию бактериальных патогенов к образцам ДНК *Cl. perfringens* с концентрацией 4,9x10<sup>6</sup> GE/мл добавлялись исследуемые дезинфицирующие средства до концентрации 0,5% — в/об (Экоцид) или об/об (Вирошелд и НРПИ). К интактному контролю добавляли физиологический раствор в том же объеме. После инкубации в течение 10 минут реакционная смесь разбавлялась ТЕ-буфером в 10 раз, после чего использовалась для постановки ПЦР. Праймеры и флуоресцентный зонд для детектирования генетического материала (хромосомной ДНК)

transfer of the undesirable genetic information by destroying or inactivating DNA.

Based on the study of the data on physico-chemical and biological properties of the disinfectants that are more often used in the agro-industrial enterprises and in the meat industry, it was suggested that the overwhelming majority of disinfectants did not significantly affect the genetic information nor prevent the horizontal gene transfer. The aim of this work was an experimental verification of this hypothesis and search for prospective disinfectants that allow prevention of the horizontal transfer of undesirable genetic information upon disinfection of the industrial equipment in enterprises of the meat industry.

### Materials and methods

The research work was conducted in the Sector of Molecular Biology of FGBNU “The Institute of the Experimental Veterinary of the Siberia and the Far East” and the Laboratory of Pharmacogenomics of FGBNU “The Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine” of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (ICBFM SB RAS) (Novosibirsk).

The following disinfectants were used for the study: Viroshield on the basis of glutaraldehyde and quaternary ammonium compounds (QAC), HPPI on the basis of hydrogen peroxide and Ecocid on the basis of potassium persulfate, which is produced by the LLC KRKA PHARMA.

The following reference strains of the sanitary indicator microorganisms were used: *Clostridium perfringens* ATCC 13124, *Salmonella enterica var typhimurium* TA100 (collection of ICBFM SB RAS), *E. coli* XL Blue with the pBluescript plasmid carrying the ampicillin resistance gene. Isolation of the bacterial DNA was carried out by the standard silica adsorption method; isolation of the plasmid DNA by phenol-chloroform method (Maniatis and Fritch, 1984).

Real-time PCR was carried out on the Real-Time Thermal Cyclers «MiniOpticon» (BioRad) and LightCycler (Roche) in the final volume of 25 µl, containing 67 mM tris-HCl (pH 8.9), 16 mM ammonium sulfate; 2.4 mM MgCl<sub>2</sub>; 0.01% Twin 20; 0.2 mM dNTP; 0.5 µM oligonucleotide primers (pH 8.9) and fluorescent probe, Taq-DNA polymerase 1-2 units.

To assess the influence of the disinfectants under investigation on the genetic information of the bacterial pathogens, the disinfectants were added in the concentration up to 0.5% (w/vol. for Ecocid; vol./vol. for Viroshield and HPPI) to the samples of *Cl. perfringens* DNA (4.9x10<sup>6</sup> GE/ml). The physiological solution was added to the intact control in the same volume. After incubation for 10 min., the reaction mixture was diluted with TE buffer ten times, and then used for performing PCR. The primers and fluorescent probe for detecting the genetic material (chromosomal DNA) of *Clostridium perfringens* had the following structure:

- CPF1 5'-ACATGTTTCAGCTGACCGATACT-3';
- CPF2 5'-CACGTGCTCTACCGACTGA-3';
- Taqman probe FAM-CATCGGCTTCTAAAGGCTTAACCGTC-BHQ

To detect the concentration of the genetic material (chromosomal DNA) of *Salmonella enterica*, real-time

*Clostridium perfringens* имели следующую структуру:

- CPF1 5'-ACATGTTTCAGTGGACCGATACT-3',

- CPF2 5'-CACGTGCTCTACCGACTGA-3',

- зонд Taqman FAM-CATCGGCTTCTAAAGGCTTAACCGTC-BHQ

Для определения концентрации генетического материала (хромосомной ДНК) *Salmonella enterica* использовалась количественная ПЦР в реальном времени с зондом Taqman собственной разработки (Афонюшкин с соав., 2008):

- Sm1 5'-GAGCATATTCGTGGAGCAATG-3',

- Sm2 5'-AATAACATCCTCAACTTCAGCAG-3',

- зонд Taqman Sm3 FAM-TGCTCGTAATTCGCCGCCATTGG-BHQ

Для оценки действия исследуемых дезсредств на интенсивность разрушения плазмидной ДНК образцы ДНК плазмиды pBluescript 100 мкг/мл обрабатывали дезсредствами с длительностью экспозиции 1 час в следующих концентрациях: Вироселд и Экоцид 0,5%, HPPI 2%. Очистка реакционных смесей от остатков дезинфицирующих средств проводилась с помощью гель-фильтрации на микроколонках с BioGel P-6 (BioRad). Компетентные клетки *E.coli* трансформировали плазмидой по методике теплового шока: к 100 мкл бактериальной культуры добавляли по 10 мкл раствора плазмидной ДНК (положительный контроль) или реакционной смеси после обработки дезсредствами, инкубировали 40 мин при 0 °С, после чего распределяли на агаризованной среде с ампициллином (агар Лурия-Бертани), подогретой до 37 °С (Маниатис и Фрич, 1984).

Все эксперименты проводили в четырех повторностях.

### Результаты исследований

Оценка степени разрушения изолированной ДНК *Cl. perfringens* под действием исследуемых дезсредств осуществлялась по сдвигу порогового цикла  $C(t)$ , который наступает позже при снижении количества ДНК, пригодной для амплификации (Рис. 1-2, Табл. 1).

В результате эксперимента установлено, что все дезинфектанты в той или иной степени сдвигают наступление порогового цикла, то есть способны снизить концентрацию ДНК, пригодной для ПЦР, в 28-49 раз. Наибольшей активностью в этом отношении обладал Экоцид, вызывавший сдвиг порогового цикла  $C(t)$  в среднем на 2,7, что является наилучшим результатом среди исследованных дезсредств. Следует отметить, что

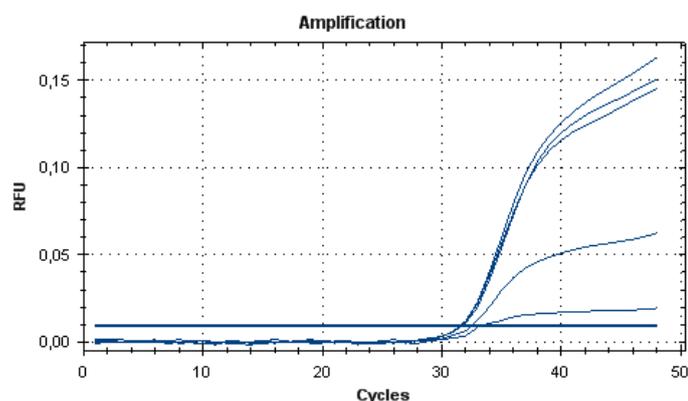


Рис. 1. Изменение порогового цикла  $C(t)$  после обработки генетического материала дезсредством Экоцид

Fig. 1. Change in the threshold cycle  $C(t)$  after treatment of the genetic material with Ecocid

quantitative PCR with in-house Taqman probe was used (Афонюшкин V.N. et al., 2008):

- Sm1 5'-GAGCATATTCGTGGAGCAATG-3',

- Sm2 5'-AATAACATCCTCAACTTCAGCAG-3',

- Taqman probe Sm3 FAM-TGCTCGTAATTCGCCGCCATTGG-BHQ

To assess the action of the disinfectants under investigation on the intensity of plasmid DNA destruction, the samples of the pBluescript plasmid DNA (100 µg/ml) were treated with the disinfectants for one hour in the following concentrations: 0.5% for Virosshield and Ecocid, 2% for HPPI.

Purification of the reaction mixtures from the residues of the disinfectants was carried out using gel-filtration on the micro columns with Bio-Gel P-6 (BioRad). The competent cells of *E.coli* were transformed with the plasmid using the method of heat shock: 10 µl of the solution of the plasmid DNA (positive control) or the reaction mixture after treatment with the disinfectants were added to 100 µl of the bacterial culture, incubated at 0 °C for 40 min., then spread on the agar medium with ampicillin (agar Luria-Bertani) heated to 37 °C (Maniatis and Fritch, 1984).

All experiments were carried out in four replications.

### Results of the experiments

The degree of destruction of the isolated of *Cl. perfringens* DNA under the influence of the tested disinfectants was assessed according to the change in the threshold cycle  $C(t)$ , which occurred later upon decreasing a quantity of DNA suitable for amplification (Fig. 1-2, Table 1).

As result of the experiment, it was found that all disinfectants, to one extent or another, change the beginning of the threshold cycle; that is, are able to significantly (28-49 times) reduce the concentration of DNA suitable for PCR. In this regard, the highest activity had Ecocid, which induced the change in the threshold cycle  $C(t)$  on average by 2.7, which was the best result among the studied disinfectants. It is necessary to note that in this experiment, it was impossible to achieve the full destruction of DNA as the experimental conditions envisage detection of a comparatively short DNA region with a length of only 200 b.p. On the other hand, the real amount of chromosomal DNA destruction after treatment with Ecocid would be proportional to the genome size; that is, 2000-4000 times more.

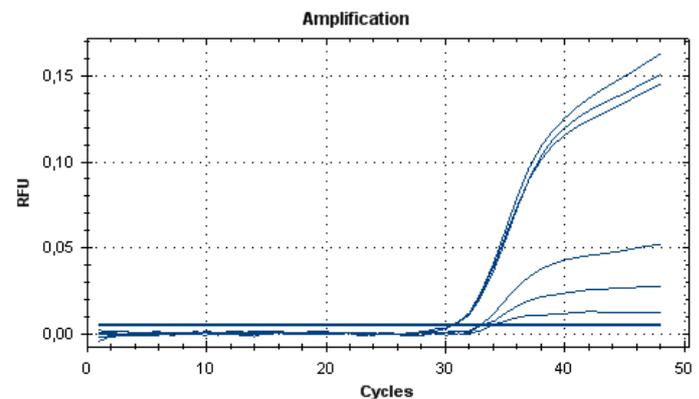


Рис. 2. Изменение порогового цикла  $C(t)$  после обработки генетического материала дезсредством HPPI

Fig. 2. Change in the threshold cycle  $C(t)$  after treatment of the genetic material with HPPI

**Table 1. Concentrations of the genomic DNA of *Cl. perfringens* and threshold cycles C(t)**  
 Табл. 1. Концентрации геномной ДНК *Cl. perfringens* и пороговые циклы C(t)

Sample   Наименование образца	DNA concentration, GE in 5 µl   Концентрация ДНК, ГЕ в 5 мкл	C(t)
DNA after treatment with Ecocid   ДНК после обработки дезинфектантом Экоцид	83.6	33.24
DNA after treatment with Virosshield   ДНК после обработки дезинфектантом Вироселд	72.8	32.86
DNA after treatment with HPPI   ДНК после обработки дезинфектантом HPPI	52.4	33.19
Native DNA of <i>Cl. perfringens</i>   Нативная ДНК <i>Cl. perfringens</i>	2460.0	30.49
Reference <i>Cl. perfringens</i> No. 1   Стандарт <i>Cl. perfringens</i> № 1	1000.0	28.61
Reference <i>Cl. perfringens</i> No. 2   Стандарт <i>Cl. perfringens</i> № 2	100.0	31.01
Reference <i>Cl. perfringens</i> No. 3   Стандарт <i>Cl. perfringens</i> № 3	10.0	36.46
Negative control (without DNA)   Отрицательный контроль (без ДНК)	0	0

полного разрушения ДНК в этом эксперименте достигнуть не возможно, так как условиями опыта предусмотрена детекция сравнительно короткого участка ДНК длиной всего 200 п.н. С другой стороны, реальное количество повреждений в хромосомной ДНК после обработки дезсредством Экоцид будет пропорционально размеру генома — то есть в 2000-4000 раз больше.

Для уточнения способности дезсредства Экоцид к повреждению молекул ДНК, находящихся в составе клеток *Salmonella enterica*, дезинфицирующим средством с экспозицией 30 минут были обработаны как образцы изолированной ДНК *Salmonella enterica*, так суспензия жизнеспособных бактериальных клеток, взятых в той же концентрации, которую использовали для выделения ДНК. После очистки гель-фильтрацией реакционная смесь использовалась для постановки ПЦР в реальном времени (Рис. 3).

Количественная ПЦР в реальном времени является достаточно удобной системой для оценки эффективности дезсредств в отношении генетического материала, позволяющая изучить механизм такого действия. Как свидетельствуют результаты ПЦР, после обработки дезсредством Экоцид образцы изолированной ДНК *Salmonella enterica* оказались полностью инактивированы. Степень инактивации генетического материала, находившегося в составе клеток сальмонелл при обработке Экоцидом, оценивали по сдвигу порогового цикла C(t) (Табл. 2).

Полученные данные о концентрациях ДНК *Salmonella enterica* после обработки живых бактерий дезсредством Экоцид свидетельствуют о статистически достоверном ( $P=0,0096$ ) уменьшении количества

To clarify the capacity of Ecocid to damage DNA molecules located in the cells of *Salmonella enterica*, the samples of the isolated DNA of *Salmonella enterica* and the suspension of viable bacterial cells, which were taken in the same concentration as for DNA isolation, were treated with the disinfectant for 30 min. After purification by gel filtration, the reaction mixture was used for real-time PCR (Fig. 3).

Real-time quantitative PCR is quite a convenient system for assessing effectiveness of disinfectants in regard to a genetic material allowing investigation of a mechanism of this action. As can be seen from the results of the PCR, the samples of the isolated *Salmonella enterica* DNA were completely inactivated after treatment with Ecocid. The degree of inactivation of the genetic material within the *Salmonella* cells upon treatment with Ecocid, was assessed by the change in the threshold cycle C(t) (Table 2).

The obtained data on the concentration of the *Salmonella enterica* DNA after treatment of live bacteria with disinfectant Ecocid suggest the statistically significant ( $P=0.0096$ ) decrease in the quantity of DNA suitable for amplification (more than 280 times, that is by 98.53%). Thus, the Ecocid action on the *Salmonella* culture was accompanied not only by death of bacteria but also by DNA destruction.

As the system of DNA reparation in live *Salmonella* was active, the degree of the destruction of the genetic material within the bacterial cells was less than that upon the action of Ecocid on the isolated DNA. Nevertheless, use of DNA as a matrix for PCR is possible only in the absence of two-stranded disruptions inside a target. In this experiment the amplicon size was 150 b.p.; thus, to

**Fig. 3. Amplification curves of the intact (1) and treated with Ecocid genetic material of *Salmonella enterica* within the bacterial cells (2) and isolated genetic material of *Salmonella enterica* (3).**

Рис. 3. Кривые амплификации интактного (1) и обработанного Экоцидом генетического материала *Salmonella enterica*, находившегося в составе бактериальных клеток (2), и изолированного генетического материала *Salmonella enterica* (3).

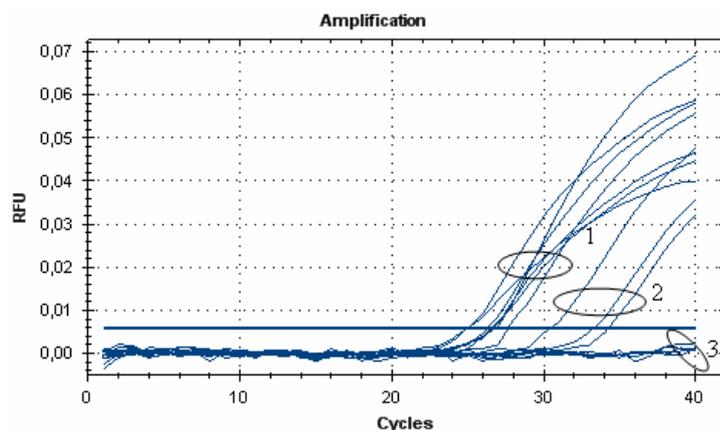


Table 2. Concentrations of the genetic material of *Salmonella enterica* after treatment with EcocidТаблица 2. Концентрация генетического материала *Salmonella enterica* после обработки дезсредством Экоцид

Sample   Наименование образца	C(t)	DNA concentration, GE in 5 µl   Концентрация ДНК, ГЕ в 5 мкл	
		Absolute   Абсолютная	Logarithmic   Логарифмическая
Isolated <i>Salmonella</i> DNA treated with Ecocid   Изолированная ДНК сальмонелл, обработанная Экоцидом	> 40	0	0
DNA from <i>Salmonella</i> cells treated with Ecocid   ДНК из клеток сальмонелл, обработанных Экоцидом	32.61±0.81	68.03±45.23	1.27±0.84
Intact <i>Salmonella</i> DNA   Интактная ДНК сальмонелл	26.97±0.42	3667.25±1730.06	3.35±0.21
DNA from the intact culture of <i>Salmonella</i>   ДНК из интактной культуры сальмонелл	26.14±0.36	4628.75±1346.85	3.42±3.60
References ( <i>Salmonella</i> DNA in different concentrations)   Стандарты (ДНК сальмонелл в разных концентрациях)	17.80±0.26	1 000 000.00	6.00
	21.94±0.12	100 000.00	5.00
	24.44±0.06	10 000.00	4.00
	28.27±0.35	1 000.00	3.00
	31.80±0.02	100.00	2.00
	34.75±0.07	10.00	1.00
Negative control   Отрицательный контроль	> 40	0	0

пригодной к амплификации ДНК в более чем 280 раз, то есть на 98,53%. Таким образом, действие дезсредства Экоцид на культуру сальмонелл сопровождалось не только гибелью бактерий, но и разрушением ДНК.

Так как система репарации ДНК в живых сальмонеллах оставалась активной, степень разрушения генетического материала, находившегося в составе бактериальных клеток, была меньше, чем при воздействии дезсредства Экоцид на изолированную ДНК. Тем не менее, использование ДНК в качестве матрицы для ПЦР возможно только при отсутствии двухцепочечных разрывов внутри мишени, а данном эксперименте размер ампликона составлял 150 п.н., поэтому для снижения концентрации ДНК сальмонелл, детектируемым ПЦР, необходимо в среднем одно повреждение молекулы ДНК на каждые 150 нуклеотидов. Учитывая, что размер генома сальмонелл составляет ок. 4,8 млн. п.н., совершенно очевидно, что после обработки дезсредством Экоцид живых клеток бактерий вероятность сохранения неповрежденной хромосомной ДНК стремится к нулю.

Помимо хромосомной ДНК, у бактерий имеются внехромосомные носители генетической информации — плазмиды. Они представляют собой короткие двухцепочечные, чаще кольцевые, молекулы ДНК, и обычно содержат гены, повышающие устойчивость бактерий к неблагоприятным внешним факторам — например, к антибиотикам, к УФ-излучению, к некоторым дезинфицирующим средствам, гены токсинобразования и других детерминант вирулентности. Плазмиды являются мобильными генетическими элементами, они реплицируются автономно и независимо от хромосомной ДНК, и бактериальная клетка может содержать до нескольких сотен копий плазмиды. Бактерии могут обмениваться плазмидами при конъюгации, либо, приобретая так называемую компетентность, способны поглощать плазмиды непосредственно из окружающей среды. Будучи кольцевой молекулой ДНК, плазмиды отличаются высокой устойчивостью во внешней среде, поэтому именно с

reduce the concentration of *Salmonella* DNA detectable by PCR, on average one damage of DNA molecule per each 150 nucleotides is necessary. Taking into account that the *Salmonella* genome size is about 4.8 mln b.p, it is perfectly evident that after treatment of live bacterial cells with disinfectant Ecocid, the probability of preserving intact chromosomal DNA tends to zero.

Besides the chromosomal DNA, bacteria have non-chromosomal carriers of the genetic information – plasmids. They present two-stranded, more frequently circular DNA molecules and usually contain genes that increase resistance of bacteria to unfavorable external factors, for example, antibiotics, UV radiation and several disinfectants, as well as genes of toxin production and other determinants of virulence. Plasmids are mobile genetic elements, they are replicated autonomously and independently of the chromosomal DNA and a bacterial cell can contain up to several hundreds of plasmid copies. Bacteria can exchange plasmids in conjugation, or acquiring so called competence can absorb plasmids from an environment. Being a circular DNA molecule, plasmids are distinguished by their high resistance in an environment; thus, the highest risk of transfer of undesirable genetic information is associated precisely with plasmids.

To assess the impact of disinfectants on the plasmid DNA, the methods of the genetic engineering were used; namely, transformation of the competent *E. coli* cells by the pBluescript plasmid. The pBluescript plasmid contains the ampicillin resistance gene and the gene of β-galactosidase in the Lac-operon; therefore, the transformed bacteria on the medium with ampicillin in presence of the chromogenic substrate form blue color colonies (Fig 4).

The intensity of plasmid DNA destruction by the tested disinfectants was determined by the number of the stained *E. coli* XL Blue colonies after transformation of bacteria both by the isolated plasmids treated with the disinfectants, and by the plasmids within the bacterial cells during the disinfectant exposure. The results of the bacteria transformation by the pBluescript plasmid are presented in Fig. 5 and in Table 3.

плазмидами связан наибольший риск передачи нежелательной генетической информации.

Для оценки воздействия дезсредств на плазмидную ДНК использовались методы генетической инженерии, а именно трансформация плазмидой pBluescript компетентных клеток *E.coli*. Плазмида pBluescript содержит ген устойчивости к ампициллину и ген  $\beta$ -галактозидазы, входящей в состав Lac-оперона, поэтому колонии трансформированных бактерий на среде с ампициллином в присутствии хромогенного субстрата приобретают синюю окраску (Рис. 4).

Интенсивность разрушения плазмидной ДНК исследуемыми дезсредствами определялась по количеству окрашенных колоний *E.coli* XL Blue после трансформации бактерий как обработанными дезсредствами изолированными плазмидами, так и плазмидами, находившимися в составе бактериальных клеток во время воздействия дезсредств. Результаты трансформации бактерий плазмидой pBluescript представлены на рис. 5. и в табл. 3.

Как видно из таблицы, исследованные дезсредства в различной степени разрушают плазмиду pBluescript

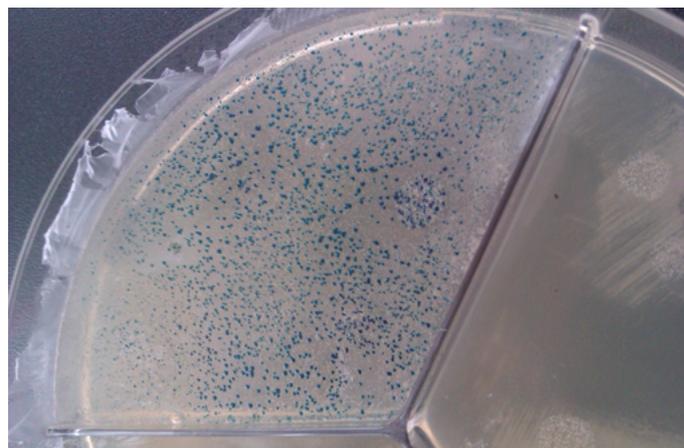


Fig. 4. Positive control: *E.coli* XL Blue colonies after transformation with pBluescript without treatment with disinfectants.

Рис. 4. Положительный контроль: колонии *E.coli* XL Blue после трансформации плазмидой pBluescript без обработки дезсредствами.

**Table 3. Influence of the disinfectants on the suitability of the pBluescript plasmid for transformation of the competent cells of the bacterium *E.coli* XL Blue**

Таблица 3. Влияние дезсредств на пригодность ДНК плазмиды pBluescript к трансформации компетентных клеток бактерий *E.coli* XL Blue

Indicators   Показатели	Tested disinfectants   Исследуемые дезсредства			
	Ecocid   Экоцид	HPPI	Viroshield   Вирошелд	Without disinfectants (control)   Без дезсредств (контроль)
Number of the transformed bacteria colonies after treatment of the plasmid DNA located within the bacterial cells with the disinfectants   Количество колоний трансформированных бактерий после обработки дезсредствами плазмидной ДНК, находившейся в составе бактериальных клеток	3	—	28	112
Number of the transformed bacteria colonies after treatment of the isolated plasmid DNA with the disinfectants   Количество колоний трансформированных бактерий после обработки дезсредствами изолированной плазмидной ДНК	0	2	165	387
The degree of a decrease in the number of the transformed bacteria, %   Степень уменьшения количества трансформированных бактерий, %	100	99,994	57,39	0

с геном устойчивости к ампициллину, тем самым в различной степени препятствуя росту трансформированных бактерий на среде с этим антибиотиком. Дезсредство Вирошелд на основе глутарового альдегида и ЧАС проявило крайне малую эффективность в отношении плазмидной ДНК: в образце было отмечено большое количество колоний трансформированных бактерий. Дезсредство HPPI на основе перекиси водорода в ходе эксперимента инактивировало плазмиды в большей степени, поэтому наблюдались единичные колонии трансформированных бактерий. Вероятней всего, недостаточная эффективность этого дезсредства связана со спецификой действия каталаз

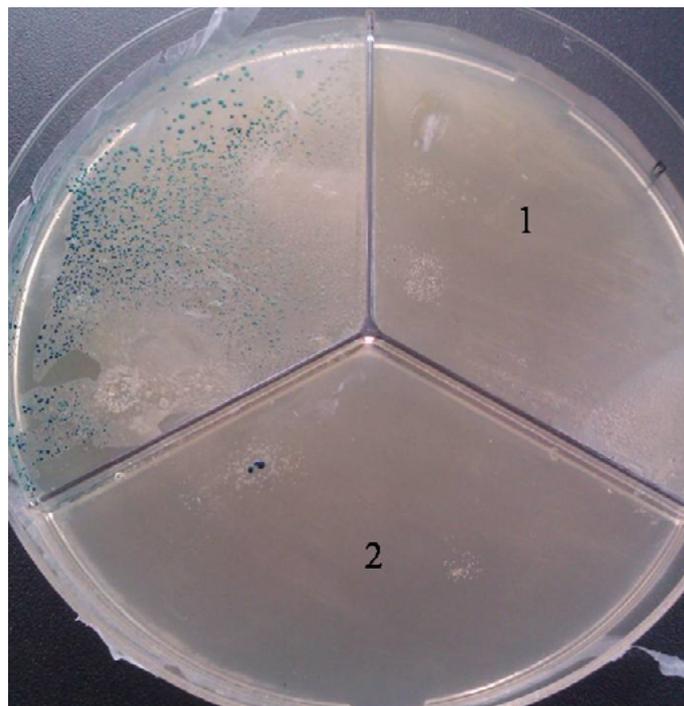


Fig. 5. The results of *E.coli* XL Blue transformation by the pBluescript plasmid, submitted to the exposure of Ecocid (sector 1), HPPI (sector 2) and Viroshield (sector without number).

Рис. 5. Результаты трансформации *E.coli* XL Blue плазмидой pBluescript, подвергнутой воздействию дезсредств Экоцид (сектор 1), HPPI (сектор 2) и Вирошелд (сектор без номера).

— ферментов, защищающих бактериальные клетки от перекиси водорода. Каталазы менее приспособлены к инактивации неорганических перекисей, таких как персульфат калия, входящий в состав дезсредства Экоцид. В образцах, обработанных дезсредством Экоцид, не было выявлено ни одной колонии трансформированных бактерий, и таким образом, дезсредство Экоцид продемонстрировало 100%-ную эффективность в уничтожении плазмидной ДНК бактерий.

К сожалению, критерии воздействия дезсредств на генетический материал бактериальных или вирусных патогенов, специфичных для мясной промышленности, до настоящего времени законодательно не регламентируются. Тем не менее, для обеспечения высокого уровня биологической безопасности продукции мясопереработки при дезинфекции производственного оборудования на предприятиях мясной промышленности целесообразно использование дезинфицирующих средств, позволяющих предотвратить горизонтальный перенос нежелательной генетической информации.

### Выводы

Исследованные дезсредства на основе персульфата калия, перекиси водорода, глутаральдегида и ЧАС способны снижать концентрацию хромосомной ДНК *Cl. perfringens* в 28-49 раз.

Дезсредство Экоцид разрушает изолированный генетический материал *Salmonella enterica* и, с меньшей интенсивностью, хромосомную ДНК, находящуюся при обработке внутри бактериальной клетки.

Дезсредство Экоцид эффективно уничтожает плазмидную ДНК — как изолированную, так и находящуюся во время обработки внутри бактериальной клетки.

Применение дезсредства Экоцид для санитарной обработки оборудования на предприятиях мясной промышленности снижает риск горизонтального переноса генов, тем самым уменьшая распространение нежелательной генетической информации, такой как гены антибиотикоустойчивости, и токсинообразования бактерий.

As can be seen from the table, the tested disinfectants destroy to a variable degree the pBluscript plasmid with the ampicillin resistance gene; thereby, preventing to a variable degree the growth of the transformed bacteria on the medium with this antibiotic. Disinfectant Veroshield on the basis of glutaraldehyde and quaternary ammonium compounds (QAC) showed extremely low effectiveness regarding the plasmid DNA: high numbers of colonies of the transformed bacteria were recorded in the sample. Disinfectant HPPI on the basis of hydrogen peroxide inactivated the plasmids to a greater degree in this experiment; thus, the individual colonies of the transformed bacteria were found. Most probably, insufficient effectiveness of this disinfectant is associated with the special characteristics of action of catalases – the enzymes, which protect bacterial cells from hydrogen peroxide. Catalases are less fitted to inactivation of inorganic peroxides, such as potassium persulfate, which is a constituent of the disinfectant Ecocid. In the samples processed with the disinfectant Ecocid, no colonies of the transformed bacteria were found; therefore, the disinfectant Ecocid demonstrated 100% effectiveness in destruction of the bacterial plasmid DNA.

Unfortunately, the criteria of an impact of disinfectants on the genetic material of the bacterial and viral pathogens specific for the meat industry have not been regulated by law up to the present day. Nevertheless, it is expedient to use disinfectants that allow prevention of the horizontal transfer of undesired genetic information to ensure high level of biological safety of meat products upon disinfection of industrial equipment in enterprises of the meat industry.

### Conclusion

The tested disinfectants on the basis of potassium persulfate, hydrogen peroxide, glutaraldehyde and quaternary ammonium compounds (QAC) can reduce the concentration of the chromosomal DNA of *Cl. perfringens* 28-49 times.

The disinfectant Ecocid destroys the isolated genetic material of *Salmonella enterica* and with less intensity the chromosomal DNA located within a bacterial cell during treatment.

The disinfectant Ecocid effectively destroys plasmid DNA, both isolated and located within a bacterial cell during treatment.

Use of the disinfectant Ecocid for sanitary treatment of equipment on enterprises of the meat industry reduces the risk of the horizontal gene transfer, thereby, reducing the distribution of the undesirable genetic information such as bacterial antimicrobial resistance genes.

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Афонюшкин В.Н., Дударева Е.В., Малахеева Л.И., Фролова О.В., Шкред О.В., Филиппенко М.Л. Современные методы контроля сальмонеллеза. // Птицеводство №9, сентябрь 2008, - С. 43-44
2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. - 479 с.
3. Bauer, T.; Hammes, W.P.; Haase, N.U.; Hertel, C. Effect of food components and processing parameters on DNA degradation in food. *Environ. Biosaf. Res.* 2004, 3, 215–223.
4. Straub, J.A.; Hertel, C.; Hammes, W.P. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J. Food Protect.* 1999, 62, 1150–1156.
5. Verraes, C.; Van Boxtael, S.; Van Meervenne, E.; Van Coillie, E.; Butaye, P.; Catry, B.; de Schaetzen, M.-A.; Van Huffel, X.; Imberechts, H.; Dierick, K.; Daube, G.; Saegerman, C.; De Block, J.; Dewulf, J.; Herman, L. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2013, 10, 2643-2669.

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

## Принадлежность к организации

**Афонюшкин Василий Николаевич**, кандидат биологических наук, заведующий сектором молекулярной биологии, Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 630501, Новосибирская область, пос. Краснообск, Тел.: 89231176461. e-mail: lisocim@mail.ru

**Табанюхов Кирилл Александрович**, Новосибирский государственный аграрный университет, 630039, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 160, Тел.: 89139560236

**Черепушкина Виктория Сергеевна**, лаборант-исследователь, Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 630501, Новосибирская область, пос. Краснообск, Тел.: 89529042922, e-mail: lisocim@mail.ru

**Хоменко Юлия Сергеевна**, аспирант, Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, 630501, Новосибирская область, пос. Краснообск, Тел.: 89529042922 e-mail: lisocim@mail.ru

**Татарчук Олег Петрович**, руководитель отдела ветеринарных препаратов ООО «КРКА ФАРМА», 125212, г. Москва, Головинское шоссе, дом 5, корпус 1, Тел.: +7 495 981-10-95; e-mail: info.ru@krka.biz

## Критерии авторства

Ответственность за работу и предоставленные сведения несут все авторы.

Все авторы в равной степени участвовали в этой работе.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Поступила 17.12.2015

## REFERENCES

1. Afonyushkin V.N., Dudareva E.V., Malakheeva L.I., Frolova O.V., Shkred O.V., Filippenko M.L. Modern methods of *Salmonella* control. // *Ptitsevodstvo*, No 9, September 2008, - pp. 43-44
2. Maniatis, T., Fritch, E., Sambrook, J. *Molecular cloning*. M.: Mir, 1984, 479 pages.
3. Bauer, T.; Hammes, W.P.; Haase, N.U.; Hertel, C. Effect of food components and processing parameters on DNA degradation in food. *Environ. Biosaf. Res.* 2004, 3, 215–223.
4. Straub, J.A.; Hertel, C.; Hammes, W.P. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction-based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *J. Food Protect.* 1999, 62, 1150–1156.
5. Verraes, C.; Van Boxtael, S.; Van Meervenne, E.; Van Coillie, E.; Butaye, P.; Catry, B.; de Schaetzen, M.-A.; Van Huffel, X.; Imberechts, H.; Dierick, K.; Daube, G.; Saegerman, C.; De Block, J.; Dewulf, J.; Herman, L. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2013, 10, 2643-2669.

## INFORMATION ABOUT AUTHORS

## Affiliation

**Afonyushkin Vasily Nikolaevich**, candidat of Biology sciences, Head of the department of molecular biology, The Institute of the Experimental veterinary of the Siberia and the Far East, 630501, Novosibirsk region, Krasnoobsk, Ph.: 89231176461. e-mail: lisocim@mail.ru

**Tabanyukhov Kirill Alexandrovich**, Novosibirsk State Agrarian University, 630039, Novosibirsk, Dobrolubova str.160, Ph.: 89139560236

**Cherepushkina Viktoriya Sergeevna**, assistant researcher, The Institute of the Experimental veterinary of the Siberia and the Far East, 630501, Novosibirsk region, Krasnoobsk, Ph.: 89529042922, e-mail: lisocim@mail.ru

**Khomenko Yulia Sergeevna**, graduate student, The Institute of the Experimental veterinary of the Siberia and the Far East, 630501, Novosibirsk region, Krasnoobsk, Ph.: 89529042922; e-mail: lisocim@mail.ru

**Tatarchuk Oleg Petrovich**, Head of veterinary drugs, LLC KRKA PHARMA, 125212, Moscow, Golovinskaya, 5/1, Ph.: +7 495 981-10-95, e-mail: info.ru@krka.biz

## Contribution

All authors are responsible for the work and given information. All authors were equally involved in this work.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Received 17.12.2015