УДК 637.12:637.065

ВПЛИВ pH СЕРЕДОВИЩА НА ЗДАТНІСТЬ ФОРМУВАТИ МІКРОБНІ БІОПЛІВКИ МІКРООРГАНІЗМАМИ, ЯКІ ВИДІЛЕНІ З ДОЇЛЬНОГО УСТАКУВАННЯ ТА МОЛОКА СИРОГО

Н. В. Крушельницька[1]

Державний науково-дослідний контрольний інститут кормових добавок
та ветеринарних препаратів

У статті наведені результати досліджень щодо впливу водневого показника (pH) середовища на здатність формування мікробних біоплівок та їх щільність мікроорганізмами, виділеними із доїльного устаткування та молока сирого. Встановлено, що збільшення або зменшення pH середовища беззаперечно впливає на процес формування біоплівок бактеріями. Мікрофлора доїльного устаткування та молочного інвентарю під час проведення санітарної обробки мийно-дезінфікуючими засобами зазнає впливу лужного та кислого середовища. При цьому формування біоплівок бактеріями в кислому середовищі є слабшим, ніж у лужному. Це свідчення того, що застосування для санітарної обробки розчинів з певним pH є ефективним способом запобігання формуванню мікробних біоплівок.

Однією з основних операцій в системі виробництва безпечного молока сирого є проведення ефективної санітарної обробки доїльного устаткування і молочного інвентарю. Санітарну обробку технологічного устаткування здійснюють до такого рівня, при якому все, що залишається на його внутрішній поверхні (залишки молочно-білкові, мікроорганізми), не створювало б загрози для безпечності і якості молока. За даними ВООЗ мікробіологічний чинник є одним із основних, який впливає на безпеку харчових продуктів [1]. Понад 40 % харчових отруєнь людей у світі спричиняються мікроорганізмами, які надходять у сировину та готові продукти з технологічного устаткування, яке є найбільш суттєвим джерелом мікробного обсіменіння харчових продуктів під час виробництва [2].

Результати останніх наукових досліджень вказують, що мікроорганізми виживають на технологічному устаткуванні завдяки специфічній властивості — здатності формувати біоплівки [3, 4].

Біоплівка — це жива сукупність одного або декількох видів чи родів бактерій, прикріплена до біогенної чи абіогенної поверхні, яка постійно оновлюється та оточена полісахаридним матриксом [5]. Матрикс — це суміш екзополісахаридів, білків, нуклеїнових кислот та інших неорганічних речовин, яка захищає бактерії від факторів навколишнього середовища [6].

Таким чином, здатність бактерій до формування біоплівки на поверхні доїльного устаткування є важливою умовою їх виживання і, відповідно, джерелом надходження у молоко.

Дослідниками встановлено, що водневий показник навколишнього середовища є важливим фактором, який впливає на зниження мікробної адгезії до поверхні об'єкту та формування біоплівки [7]. В основному мікрофлора доїльного устаткування та молочного інвентаря під час проведення санітарної обробки мийно-дезінфікуючими засобами зазнає впливу лужного та кислого середовища.

Мета роботи — вивчити вплив pH середовища на формування мікробних біоплівок і їх щільність мікроорганізмами, виділеними з доїльного устаткування та молока сирого.

[1] Науковий керівник — доктор ветеринарних наук, с. н. с. М. Д. Кухтин

Матеріали і методи. Перевірку на здатність утворювати мікробні біоплівки за різного pH середовища проводили на виділених з доїльного устаткування і молока сирого мікроорганізмах родів і видів *Streptococcus uberis, Streptococcus agalactiae, Micrococcus spp., Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Enterococcus faecalis, Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas aeruginosa, Alcaligenes spp.* та неідентифіковані грампозитивні палички.

Вивчення впливу водневого показника середовища на процес формування мікробних біоплівок проводили на м'ясопептонному бульйоні (МПБ) з підкоректованим pH до 4,0, 7,0 і 9,0 од., тобто використовували pH середовища, яке відповідає лужним і кислотним мийно-дезінфікуючим засобам. Контролем були біоплівки, вирощені за нейтрального pH 7,0.

Для визначення здатності мікроорганізмів формувати біоплівки, у стерильні одноразові пластикові чашки Петрі вносили 5 $см^3$ МПБ та 1 $см^3$ однодобової тест-культури мікроорганізмів у концентрації 10^5 КУО/$см^3$ та інкубували за температури 30 ºС протягом 24–48 год. — для мезофільних, і за температури 15–20 ^{0}С протягом 24–48 год. — для психротрофних мікроорганізмів. Після інкубації, чашки триразово відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів фосфатним буфером, висушували та фіксували утворені біоплівки 96º етиловим спиртом протягом 10 хв. Потім фарбували 0,1 % розчином кристалічного фіолетового протягом 10 хв., знову промивали фосфатним буфером і висушували. Оцінювали утворені біоплівки візуально та під мікроскопом [8].

Для визначення щільності утворених біоплівок, після їх вирощування і фарбування кристалічним фіолетовим, у чашки Петрі додавали 2,5 $см^3$ 96º етилового спирту і залишали на 20–30 хв., періодично струшуючи. Вимірювали оптичну густину промивного розчину спирту спектрофотометрично за довжини хвилі 570 нМ [8]. За оптичної густини промивного розчину до 0,5 од. щільність сформованих біоплівок вважали низькою, від 0,5 до 1,0 од. — середньою та при густині розчину більше 1,0 од. щільність сформованої біоплівки вважали високою.

Результати й обговорення. Згідно з проведеними дослідженнями встановлено, що водневий показник різних величин неоднозначно впливає на здатність мікроорганізмів формувати біоплівки та їх щільність на абіогенних поверхнях, які виділені з доїльного устаткування та молока сирого (табл.).

З усіх мікроорганізмів, які виділені з доїльного устаткування та молока сирого, лише бактерії роду *Enterococcus* формували біоплівки високої щільності, незалежно від величини pH середовища.

При кислому pH середовища всі мезофільні мікроорганізми формували біоплівки низької щільності. Так, за pH середовища 4,0 формування біоплівок високої щільності бактеріями родів *Streptococcus, Micrococcus, Staphylococcus* і *E. coli* знижувалося від 1,3 до 3,0 разів, порівняно до pH середовища 7,0. Грампозитивні палички за кислого pH середовища біоплівок високої щільності взагалі не формували.

Таблиця

Вплив pH середовища на здатність формувати біоплівки на абіогенних поверхнях мікроорганізмами, які виділенні з доїльного устаткування та молока сирого, %, M±m, n=81

Рід, вид бактерій	Щільність біоплівок	Кількість мікроорганізмів, які формували біоплівки за різної величини pH		
		4,0	7,0	9,0
Streptococcus uberis, S. agalactiae	низька	25,0±1,31	–	–
	середня	–	–	–
	висока	75,0±3,17*	100	100
Micrococcus spp.	низька	8,3±0,43	–	–
	середня	58,3±2,80***	11,8±0,51	25,0±1,28***
	висока	33,4±1,74***	88,2±4,22	75,0±3,24
Staphylococcus aureus	низька	–	–	–
	середня	66,7±3,32	–	–
	висока	33,3±2,06***	100	100
Escherichia coli	низька	8,3±0,32	–	–
	середня	66,7±2,90***	28,6±1,46	33,3±1,95
	висока	25,0±1,54***	71,4±2,08	66,7±2,18
Неідентифіковані грампозитивні палички	низька	83,3±2,75***	33,3±1,57	41,7±1,76*
	середня	16,7±0,93**	33,3±1,11	58,3±2,97**
	висока	–	33,4±0,95	–
Enterococcus faecalis	низька	–	–	–
	середня	–	–	–
	висока	100	100	100
Pseudomonas fluorescens	низька	100	–	–
	середня	–	38,5±1,78	46,2±2,37*
	висока	–	61,5±2,13	53,8±2,41
Pseudomonas aeruginosa	низька	100***	13,3±0,24	13,3±0,48
	середня	–	26,7±0,84	40,0±1,38**
	висока	–	60,0±1,81	46,7±1,72*
Alcaligenes spp.	низька	100***	11,8±0,65	41,2±0,98***
	середня	–	64,7±1,20	58,8±2,11
	висока	–	23,5±0,21	0

Примітка: * − P ≤ 0,05; ** − P ≤ 0,01; *** − P ≤ 0,001 – щодо pH 7,0 од.

Було встановлено, що за pH середовища 9,0 грампозитивні палички не здатні формувати біоплівки високої щільності, в той же час, збільшувалася у 1,7–2,1 раза кількість сформованих біоплівок середньої щільності у бактерій роду *Micrococcus* і грампозитивних паличок, а на інші мезофільні мікроорганізми лужне середовище практично не впливало, порівняно з pH 7,0.

Зовсім інша тенденція спостерігалася щодо формування біоплівок психротрофними мікроорганізмами за різних величин pH середовища. При pH 4,0 усі психротрофні мікроорганізми та синьогнійна паличка формували біоплівки дуже низької щільності або взагалі не формували.

Зростання величини pH до 9,0 призводило у психротрофних мікроорганізмів до здатності збільшення у 1,2–3,5 рази кількості біоплівок низької та середньої щільності, та знижує у бактерій роду *Alcaligenes* формування біоплівок високої щільності.

Результати досліджень показали, що збільшення або зменшення водневого показника середовища беззаперечно впливає на процес формування біоплівок мікроорганізмами, які виділені з доїльного устаткування та молока сирого. При цьому формування біоплівок бактеріями в кислому середовищі є слабшим, ніж у лужному. Це свідчить про те, що застосування для санітарної обробки розчинів з певним pH є ефективним способом запобігання формуванню мікробних біоплівок.

В И С Н О В К И

1. Бактерії роду *Enterococcus* формують біоплівки високої щільності незалежно від величини *pH* середовища. В кислому середовищі *pH* 4,0 — щільність мікробних біоплівок у родів *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* і *E. coli* знижувалася в 1,3–3,0 рази, порівняно з нейтральним середовищем pH 7,0. Лужне середовище — pH 9,0 не впливає на процес формування біоплівок цими мікроорганізмами.

2. Психротрофні бактерії та синьогнійна паличка в кислому середовищі не формують біоплівки, а в лужному формують біоплівки середньої та високої щільності.

Перспективи подальших досліджень. Доцільно провести роботу по вивченню впливу ферментів на мікробні біоплівки з доїльного устаткування, що дозволить розробити нові підходи до санітарної обробки устаткування і одержання молока сирого з мінімальним умістом мікроорганізмів.

THE INFLUENCE OF PH MEDIUM ON THE ABILITY TO FORM MICROBIAL BIOLOGICAL TAPE BY MICROORGANISMS EXTRACTED FROM MILKING EQUIPMENT AND RAW MILK

N. V. Krushelnytska

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medical Products and Fodder Additives

S U M M A R Y

The article presents the test results of hydrogenous index influence of pH medium on ability to form microbial biological tape and their density by microorganisms extracted from milking equipment and raw milk. It was determined that increase and decrease of pH medium influence on the formation process of biological tape by bacteria. In general, the micro-flora of milking equipment and milk inventory during sanitary processing by means of detergent dizinfective means suffer from the influence of alkaline and acid media. The biological tape formation by bacteria in acid medium is weaker than in alkaline one. It proves that application of solutions with certain media for sanitary processing is effective method of prevention of microbial biological tape formation.

ВЛИЯНИЕ РН СРЕДЫ НА СПОСОБНОСТЬ ФОРМИРОВАНИЯ МИКРОБНЫХ БИОПЛЁНОК В МИКРООРГАНИЗМОВ, КОТОРИЕ ВЫДЕЛЕННЫ С ДОИЛЬНЫХ УСТАНОВОК И МОЛОКА СЫРОГО

Н. В. Крушельницкая

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок

А Н Н О Т А Ц И Я

В статье приведены результаты исследований влияния водородного показателя (pH) среды на способность формирования микробных биопленок и их плотность микроорганизмами, выделенными из доильного оборудования и молока сырого. Установлено, что увеличение или уменьшение pH среды влияет на процесс формирования биопленок бактериями. В основном микрофлора доильного оборудования и молочного инвентаря при проведении санитарной обработки моюще-дезинфицирующими средствами подвергается воздействию щелочного и кислой среды. При этом формирование биопленок

бактериями в кислой среде является слабее, чем в щелочной. Применение для санитарной обработки растворов с определенным pH является эффективным способом предотвращения формирования микробных биопленок.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Vikova H.* Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms — a revivew / H.Vikova, V. Babak, R. Seydlova et. all. // J. Czech Food Sci. — 2008.— № 26. — P. 309–323.

2. Food poisoning incidents in France in 1998 / S. Haeghebaert, F. Le Querrec, V. Vaillant and other // Bull Epidemiol Hebdomad. — 2001. — P. 65–70.

3. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry / Yannick Lequette, Gauthier Boels, Martine Clarisse, Christine Faille // Biofouling. — 2010. — Vol. 26, № 4. — P. 421−431.

4. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review / F. Pe´rez-Rodrı´guez, A. Valero, E. Carrasco and other // Trends Food Sci. Technol. — 2008. — P. 131−144.

5. *Costerton J. W.* The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections / J. W. Costerton, R. Veeh, M. Shirtliff // J. Clin. Invest. — 2003. — Vol. 112 (10). — P. 1466−1477.

6. *Kolter R.* Microbial sciences: the superficial life of microbes / R. Kolter, E. P. Greenberg // Nature. — 2006. — Vol.441. — P. 300−302.

7. *Wirtanen G.* Disinfection in food processing — Efficacy testing of disinfectants. / G. Wirtanen, S. Salo // Reviews in Environmental Science and Biotechnology. — 2003. — № 3. — P. 293–306.

8. *Stepanovic S.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation / S. Stepanovic, D. Vurovic, I. Duric, B. Savic // J. Microbiol. Methods. — 2000. — Vol. 40. — P. 175–179.