

УДК 613.287:637.128:637.112

Кухтин М. Д., д. вет. н., ст. н. с. (kuchtyн@yandex.ru),*Тернопільський національний технічний університет ім. І. Пулюя***Перкій Ю. Б.**, к. вет. н., ст. н. с.*Тернопільська державна сільськогосподарська дослідна станція**Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН***Крушельницька Н. В.**, м. н. с. ©*Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок*

ФОРМУВАННЯ МІКРОБНИХ БІОПЛІВОК НА АБІОГЕННИХ ПОВЕРХНЯХ ЗА РІЗНОЇ ПОЧАТКОВОЇ КІЛЬКОСТІ БАКТЕРІЙ

*Встановлено, що при відмінній чистоті санітарного стану доїльного устаткування до 500 КУО/см³ змиву протягом часу між використанням обладнання (8 год.) мікроорганізми, які виділені з молока збірного та доїльного обладнання, формують біоплівки низької щільності і лише бактерії *Pseudomonas aeruginosa* формують біоплівки середньої щільності.*

Ключові слова: мікробні біоплівки, формування, санітарний стан, доїльне устаткування.

Вступ. Одним із ключових завдань санітарії молока є розробка заходів і технологій для одержання молока незбираного з мінімальним вмістом мікроорганізмів. Це пов'язано перш за все із тим, що проблема мікробного обсіання молока сирого сьогодні виходить на перший план через взаємозв'язок цього показника з якістю та безпечністю готової молочної продукції. Кількісний вміст бактерій у молоці сирому свідчить про гігієнічні умови його одержання та ефективність проведеної первинної обробки (фільтрування, охолодження, зберігання, транспортування).

Найбільш важливим джерелом мікробного обсіання молока незбираного є доїльне устаткування та молочний інвентар [1]. Результати останніх наукових досліджень вказують, що мікроорганізми виживають на технологічному устаткуванні завдяки надзвичайно важливій властивості – здатності формувати біоплівки [2, 3]. Мікробна біоплівка – це жива сукупність одного або декількох видів чи родів бактерій, яка постійно оновлюється, прикріплена до біогенної чи абіогенної поверхні та оточена полісахаридним матриксом [4]. Матрикс – це суміш екзополісахаридів, білків, нуклеїнових кислот та інших неорганічних речовин, який захищає бактерії від факторів навколишнього середовища [5]. Таким чином, здатність бактерій до формування біоплівки на поверхні доїльного устаткування є важливою умовою їх виживання і відповідно джерелом надходження у молоко.

Мікробні біоплівки, які утворюються на поверхнях доїльного устаткування, негативно впливають на якість сировини і безпеку готової

продукції, зокрема продуктів харчування, оскільки, в складі біоплівки крім сапрофітної мікрофлори можуть бути патогенні мікроорганізми [6].

Інтенсивність формування біоплівок мікроорганізмами залежить від великої кількості змінних чинників, особливо таких, як рід та вид мікроорганізму (не всі мікроорганізми мають однакову здатність до адгезії), фізичні і хімічні властивості поверхні (макро- і мікроструктура, електростатичність, гідрофільність чи гідрофобність матеріалу), екологічні фактори (осмотичність, рН середовища, температура, парціальний тиск кисню, наявність антибактеріальних речовин і т.д.), а також від початкової кількості мікроорганізмів на поверхні об'єкту [7, 8].

Метою роботи було вивчити здатність бактерій формувати біоплівки на абіогенних поверхнях в залежності від різної початкової їх кількості.

Матеріали та методи досліджень. Експериментальні дослідження проводили в лабораторіях Тернопільської державної сільськогосподарської дослідної станції Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН і господарствах Тернопільської області.

У досліді використано бактерії родів *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Alcaligenes* і *Flaobacterium*, які виділені з доїльного устаткування та молока сирого. Мікробіологічні дослідження молока та змивів із доїльного устаткування проводили у відповідності з загальноприйнятими вимогами [9, 10].

Для визначення здатності мікроорганізмів формувати біоплівки у стерильні одноразові пластикові чашки Петрі діаметром 5 см (загальна площа 20 см²) вносили 5 см³ м'ясопептонного бульйону з додаванням 0,5 % розчину глюкози та 1 см³ добової тест-культури мікроорганізмів із різною початковою кількістю бактерій. Розведення тест-культури проводили з врахуванням ветеринарно-гігієнічних нормативів санітарного стану доїльного устаткування та молочного інвентаря для одержання якісного та безпечного молока. Вміст до 1 тис. бактерій у 1 см³ зависі тест-культури відповідав чистоті доїльного устаткування до 500 колонієутворюючих одиниць (КУО) в 1 см³ змиву з обладнання (добрий санітарний стан), що необхідно для одержання молока екстра гатунку. Вміст до 10 тис. тест-культури у 1 см³ відповідав нормативу до 5 тис. КУО/см³ змиву (задовільний санітарний стан) та до 100 тис. і більше – відповідає чистоті устаткування до 50 тис. КУО/см³ змиву, що вважається як незадовільний санітарний стан обладнання для одержання молока. Інкубацію культур проводили за температури 30 °С. Дослідження щільності сформованих біоплівок проводили через певні проміжки часу, враховуючи кратність доїння на молочних фермах і час між використанням доїльного устаткування, зокрема через 4-5, 7-9 та 24 год. Після інкубації, чашки триразово відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів стерильним фосфатним буфером, висушували та фіксували утворені біоплівки 96° етиловим спиртом протягом 10 хв. Потім фарбували розчином метиленового синього протягом 10 хв. Знову промивали фосфатним буфером, висушували та фарбували розчином фуксину протягом 2 хв. Після триразового промивання фосфатним буфером оцінювали утворені біоплівки візуально та під мікроскопом [11]. У чашки Петрі

перед інкубацією вносили стерильні скляні пластинки розміром 1x2 см для подальших мікроскопічних досліджень сформованих біоплівок.

Для визначення щільності утворених біоплівки дослідження проводили аналогічно, але вирощені біоплівки фарбували розчином 0,1 % кристалічного фіолетового протягом 10 хв.. Потім у чашки Петрі додавали 3 см³ 96° етилового спирту і добре їх промивали. Вимірювали оптичну густину промивного розчину спирту спектрофотометрично за довжини хвилі 570 нМ [11]. За оптичної густини промивного розчину з чашок Петрі до 0,5 од. щільність сформованих біоплівки вважали низькою, від 0,5 до 1,0 од. – середньою та за густини розчину більше 1,0 од. щільність сформованої біоплівки вважали високою.

Результати досліджень. Результати досліджень формування мікробних біоплівки на біогенних поверхнях за різної початкової кількості бактерій наведено на рисунку та в таблиці.

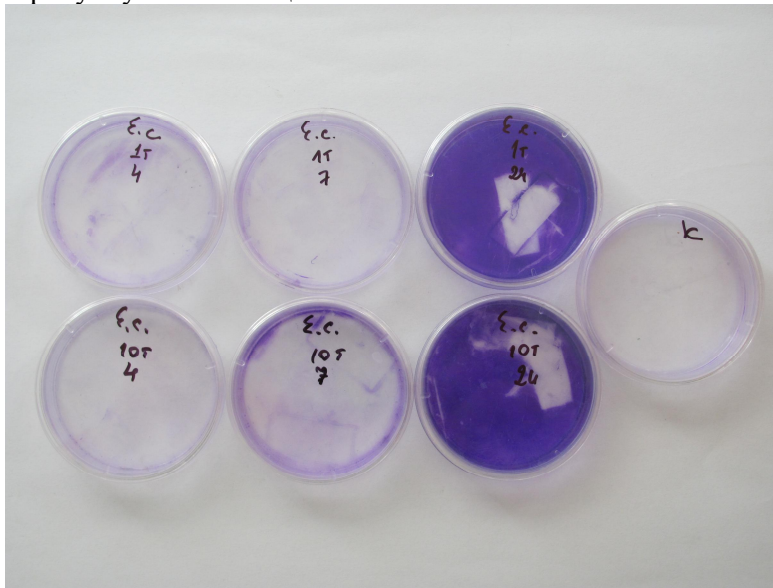


Рис. Формування біоплівки бактеріями *E. coli* на абіогенних поверхнях за вмісту тест-культури в 1 см³ 1 тис. та 10 тис. КУО

Як видно з табл., за початкової кількості тест-культур до 1 тис. в 1 см³, що відповідає чистоті доїльного устаткування до 500 КУО/см³ змиву, усі мікроорганізми, які виділялися із збірного молока та доїльного устаткування, через 4 год. формували біоплівки низької щільності. Здатність до формування середньої щільності біоплівки за даний час проявляли лише культури *Pseudomonas aeruginosa* за вмісту їх у 1 см³ зависі 82 тис., що відповідає вмісту бактерій в 1 см³ зависі з устаткування 41 тис. і є показником незадовільного санітарного стану устаткування.

Через 8 год. за початкової кількості тест-культур до 1 тис./см³, що відповідає доброму санітарному стану доїльного устаткування (до 500 КУО/см³), здатність до формування середньої щільності біоплівки виявляли у *P. aeruginosa*, яка була виділена з доїльного устаткування, всі інші бактерії формували біоплівки низької щільності. Протягом даного часу здатність формувати середньої щільності біоплівки спостерігали у *S. aureus* і *E. coli* за

вмісту їх у 1 см³ зависі відповідно 5,8 тис. та 14,2 тис., що відповідає чистоті доїльного устаткування до 5 тис. та до 10 тис. КУО/см³ змиву. Через 24 год. дослідження усі мікроорганізми, які були виділені з збірного молока та доїльного устаткування здатні формувати біоплівки середньої та високої щільності.

Отже, дані дослідження вказують, що навіть за доброї мікробіологічної чистоти доїльного устаткування на ньому виявляються такі бактерії як *Pseudomonas aeruginosa*, які за 8 год. здатні утворювати біоплівки середньої щільності. При незадовільному санітарному стані практично вся мікрофлора, яка залишається на устаткуванні, через 8–24 год. утворює біоплівки середньої і високої щільності.

Таблиця

Формування мікробних біоплівок на абіогенних поверхнях за різної початкової кількості мікроорганізмів, які виділені з молока сирого та доїльного устаткування, $M \pm m$, $n=225$

Роди, види бактерій	Початкова кількість тест-культури в 1 см ³ зависі, КУО	Щільність утвореної біоплівки через певний проміжок часу, од		
		4 год.	8 год.	24 год.
<i>Micrococcus spp.</i>	820±60	0,12±0,01	0,24±0,02	0,52±0,01
	9400±520	0,21±0,03	0,24±0,01	0,82±0,02
	87000±2100	0,28±0,03	0,42±0,02	1,02±0,04
<i>S. aureus</i>	400±24	0,11±0,01	0,17±0,01	1,05±0,06
	5800±124	0,26±0,02	0,82±0,02	1,27±0,03
	90000±487	0,26±0,02	0,83±0,03	1,35±0,04
<i>E. coli</i>	860±21	0,30±0,03	0,36±0,01	1,24±0,03
	14250±348	0,21±0,01	0,51±0,2	1,65±0,02
	110000±2431	0,43±0,02	0,67±0,02	1,72±0,05
<i>Enterococcus spp.</i>	790±34	0,23±0,01	0,18±0,01	0,79±0,02
	8100±443	0,20±0,02	0,16±0,01	0,62±0,03
	77000±2172	0,22±0,02	0,39±0,0	1,16±0,04
<i>P. aeruginosa</i>	960±33	0,22±0,01	0,51±0,02	0,65±0,02
	7800±422	0,46±0,02	0,72±0,02	1,08±0,03
	82000±2344	0,52±0,02	0,79±0,02	1,17±0,05
<i>P. fluorescens</i>	1050±130	0,23±0,01	0,29±0,01	0,72±0,02
	9800±811	0,32±0,02	0,36±0,02	0,78±0,02
	92000±1120	0,32±0,01	0,25±0,01	0,86±0,03
<i>Alcaligenes spp.</i>	940±21	0,71±0,02	0,20±0,01	0,71±0,04
	11000±530	0,26±0,01	0,28±0,01	0,95±0,02
	122000±4210	0,29±0,02	0,32±0,02	0,80±0,03
<i>Flaobacterium spp.</i>	990±50	0,18±0,01	0,21±0,01	0,52±0,02
	9100±362	0,22±0,01	0,33±0,01	0,64±0,01
	103000±3500	0,36±0,02	0,29±0,02	0,78±0,02
Контроль		0,04±0,01	0,05±0,02	0,09±0,02

Висновки. При відмінній чистоті санітарного стану доїльного устаткування і молочного інвентаря згідно з ветеринарно-гігієнічним нормативом до 50 КУО/см² поверхні (або 500 КУО/см³ змиву) протягом 8 год. мікроорганізми, які виділені з молока збірного та доїльного обладнання, формують біоплівки низької щільності і лише бактерії *Pseudomonas aeruginosa* формують біоплівки середньої щільності.

Література

1. Оксамитний М. К. Технологія одержання високоякісного молока / М. К. Оксамитний, І. П. Даниленко. – К.: Урожай, 1976. – 96 с.
2. 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.
3. Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review / F. Pe´rez-Rodríguez, A. Valero, E. Carrasco and other // *Trends Food Sci. Technol.* – 2008. – P.131–144.
4. 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.
5. Kolter R. Microbial sciences: the superficial life of microbes / R. Kolter, EP. Greenberg // *Nature*. – 2006. – Vol.441. – P. 300–302.
6. Biofilms and Hygiene on Dairy Farms and the Dairy Industry: Sanitation Chemical Products and their Effectiveness on Biofilms – a Review / H. Vlkova, V. Babak, R. Seydlova and other // *Czech J. Food Sci.* –2008. – Vol.26, №5. – P. 309–323.
7. Anand Y.H. Mechanism of bacterial adhesion and pathogenesis of implant and tissue infections. Handbook of bacterial adhesion: principles, methods and applications / Y.H. Anand, R.S. Friedlman // Humana press; Totowa. NJ: 2000. – P. 1–27.
8. Lars D. Renner. Physicochemical regulation of biofilm formation / Lars D. Renner, Douglas B. Weibel // *MRS Bull.* – 2011. – Vol. 36(5). – P. 347–355.
9. ГОСТ 9225-84. Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа. Взамен ГОСТ 9225-68. Введ. 01.01.86. – М.: Изд-во стандартов, 1984. – 25 с.
10. Определитель бактерий Берджи: девятое изд. в 2 Т. / [под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита и др.; перевод с англ. под ред. академ. РАН Г.А. Заварзина]. – М.: Мир, 1997. – 799, [1] с.
11. 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.

Summary

Kuchtn M.D., Perkiy Yu.B., N. V. Krushelnitska

FORMING OF MICROBAL BIOFILMS IS ON ABIOTIC SURFACES AT DIFFERENT INITIAL AMOUNT OF BACTERIA

Found, that when excellent clean sanitary condition of milking equipment to 500 bacterium in 1 ml flushing during the time between the use of equipment (8 h.) microorganisms are isolated from milk and milking equipment assembly, form biofilms, and only low-density Pseudomonas aeruginosa bacteria form biofilms average density.

Key words: *microbal biofilms, forming, sanitary state, milking equipment.*

Рецензент – к.б.н., доцент Турко І.Б.