

**М. Д. КУХТИН**, доктор ветеринарних наук

*Тернопільський національний технічний університет ім. І. Пулюя*

**Ю. Б. ПЕРКІЙ**, кандидат ветеринарних наук

*Тернопільська державна сільськогосподарська дослідна станція*

*Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН*

**Н. В. КРУШЕЛЬНИЦЬКА**

*Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок*

### **ФОРМУВАННЯ МІКРОБНИХ БІОПЛІВОК НА ПОВЕРХНЯХ РІЗНИХ МАТЕРІАЛІВ МІКРООРГАНІЗМАМИ, ЯКІ ВИДІЛЕНІ З ТЕХНОЛОГІЧНОГО УСТАТКУВАННЯ**

*Встановлено, що виділені з технологічного устаткування бактерії родів *Enterococcus* і *Acinetobacter* формували більш щільні мікробні біоплівки на поверхні алюмінію, оцинкованої сталі та пластику, ніж на нержавіючій сталі та склі. Бактерії видів *S. aureus* та *P. aeruginosa* формували біоплівки високої щільності на будь-якій поверхні технологічного устаткування.*

*Ключові слова: мікробні біоплівки, формування, технологічне устаткування.*

На своєму шляху від ферми до споживача молоко контактує із поверхнями доїльного устаткування, молочного інвентаря, охолоджувачів, молоковозів, пастеризаторів і т.д.. Мікробні біоплівки, які утворюються на поверхнях технологічного устаткування в молочній промисловості, негативно впливають на якість сировини і безпеку готової продукції, зокрема продуктів харчування. Наявність мікробних біоплівок на поверхнях доїльного устаткування становить небезпеку для здоров'я людей, оскільки, в складі біоплівки крім сапрофітної мікрофлори можуть бути патогенні мікроорганізми [1]. Мікробні біоплівки, які сформовані *E. coli*, *Listeria spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *Bacillus cereus* та ін., були виявлені на устаткуванні молочних ферм і молокопереробних заводів, бактеріями родів *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Escherichia*, *Enterobacter* – на поверхнях пастеризаторів [2, 3].

Результати досліджень свідчать, що бактерії сформовані у мікробні біоплівки на поверхні технологічного устаткування є основним джерелом обсіяння мікроорганізмами молока та молочних продуктів [4, 5, 6]. Це пояснюється тим, що мікроорганізми, які сформовані у біоплівки більш стійкі до розчинів дезінфікуючих засобів, ніж планктонні клітини [7]. Тому, навіть після доброї санітарної обробки доїльного устаткування, бактерії можуть залишатися на його поверхні [8, 9].

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, температура, парціальний тиск кисню, наявність антибактеріальних речовин і т.д.) [10–13]. Особливості еколо-

гічного запуску розвитку біоплівки можуть відрізнятися у різних родів та видів бактерій, однак, саме екологічні параметри мають значний вплив на перехід бактерій від існування і розмноження в планктонному стані до прикріплення та формування біоплівки.

Європейське законодавство з гігієни харчових продуктів ставить спеціальні вимоги до матеріалів, які контактують із даними продуктами та сировиною [14, 15, 16]. В Європі для виготовлення доїльного та технологічного устаткування використовують нержавіючу сталь певної марки, як матеріал, який стійкий до корозії в лужному та кислому середовищах. Уже більше 60 років саме нержавіючу сталь використовують у всіх сегментах молочного ланцюга [17].

Однак, в Україні і нині на молочних фермах та у деяких виробничих циклах при переробці молока використовуються інші матеріали, зокрема, алюміній (доїльні апарати), оцинкована сталь (молочний інвентар, відра), пластик (колектори), скло (молокопроводи) та ін.

Отже, вивчення мікробних біоплівок на поверхнях різних матеріалів технологічного устаткування дасть можливість розкрити механізми формування біоплівок і підібрати матеріали на яких утворення біоплівок є мінімальним, а санітарна обробка найефективніша.

**Метою роботи** було вивчення здатності формувати мікробні біоплівки на поверхнях різних матеріалів мікроорганізмами, які виділенні з доїльного устаткування.

**Матеріали та методи.** Експериментальні дослідження проводили в лабораторіях Тернопільської державної сільськогосподарської дослідної станції Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН та на молочних фермах Тернопільської області.

Мікробіологічні дослідження змивів із доїльного устаткування проводили згідно з загальноприйнятими вимогами [18, 19, 20, 21].

У дослідях використано бактерії родів *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Acinetobacter* та грампозитивні палички, які виділенні з доїльного устаткування.

Визначення здатності бактерій формувати біоплівки на поверхнях різних матеріалів технологічного устаткування проводили наступним чином. Вирізували пластинки із скла, пластику, алюмінію, оцинкованої та нержавіючої сталі розміром 2x2 см і стерилізували їх. У стерильні чашки Петрі пінцетом ставили пластинки, вносили 15 см<sup>3</sup> м'ясопептонного бульйону та 1 см<sup>3</sup> добової тест-культури мікроорганізмів у концентрації 10<sup>5</sup> КУО/см<sup>3</sup> та інкубували за температури 30 °С протягом 24–48 год. Після інкубації, пластинки тричі відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів фосфатним буфером, висушували та фіксували утворені біоплівки 96° етиловим спиртом протягом 10 хв. Потім фарбували розчином 0,1 % кристалічного фіолетового протягом 10 хв. Знову промивали фосфатним буфером і висушували. Кожну пластинку ставили у окрему чисту чашку Петрі, додавали 2,5–3,0 см<sup>3</sup> 96° етилового спирту і промивали протягом 15 хв.. Вимірювали оптичну густину промивного розчину спирту спектрофотометрично за довжини хвилі 570 нМ [22]. За оптичної густини промитого розчину до 0,5 од. – щільність сформованих біоплівок вважали низькою, від 0,5 до 1,0 од. – середньою та за оптичної густини розчину більше 1,0 од. щільність сформованої біоплівки вважали високою.

Отримані результати досліджень обробляли статистично з використанням програм Microsoft Excel і Statistika 99 Edition на персональному комп'ютері. Різницю вважали вірогідною при  $P \leq 0,05$ ,  $P \leq 0,01$  та  $P \leq 0,001$ .

**Результати досліджень.** Результати досліджень здатності формувати біоплівки основними представниками мікрофлори доїльного устаткування на різних поверхнях в лабораторних умовах наведено на рисунку та в таблиці.

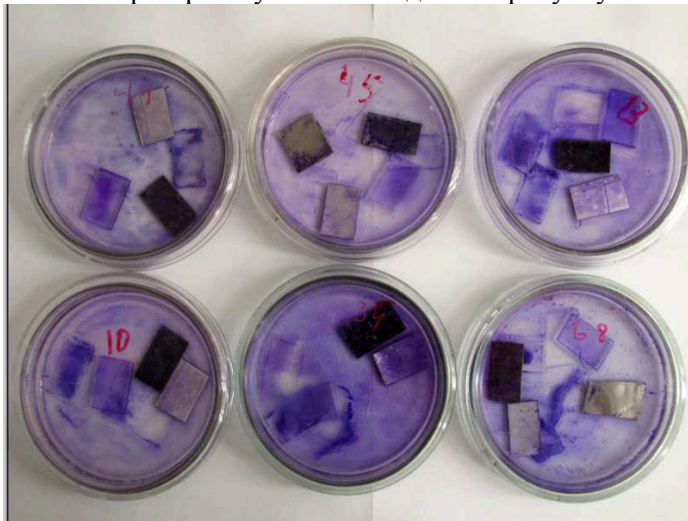


Рис. Формування біоплівок мікроорганізмами на поверхнях різних матеріалів у чашках Петрі

Таблиця

Формування біоплівок мікроорганізмами на поверхнях різних матеріалів,  $M \pm m$ ,  $n=160$

Досліджені бактерії	Оптична густина промивних розчинів біоплівок сформованих на поверхнях різних матеріалів, од.				
	алюміній	нержавіюча сталь	скло	пластик	оцинкована сталь
<i>P. aeruginosa</i>	1,17±0,05	1,11±0,06	1,08±0,05	1,20±0,06	1,13±0,07
<i>S. aureus</i>	1,44±0,12	1,23±0,11	1,21±0,10	1,43±0,13	1,32±0,12
<i>Micrococcus</i>	0,74 ±0,07*	0,56 ±0,04	0,35±0,04	0,69±0,05*	0,64±0,05*
Грампозитивні палички	0,89 ±0,06*	0,54±0,05	0,32±0,03	0,71±0,05*	0,77±0,06*
<i>Enterococcus</i>	0,78± 0,06*	0,51±0,04	0,53±0,05	0,77±0,05*	0,78± 0,005*
<i>Acinetobacter</i>	0,82±0,07	0,60±0,05	0,61±0,05	0,77±0,06	0,77±0,05
<i>E. coli</i>	0,98±0,08	0,91±0,07	0,82±0,06	0,92±0,07	0,98±0,06
Контроль	0,08 ±0,004	0,11±0,006	0,12 ±0,006	0,11±0,005	0,15±0,006

Примітка: \* $P \leq 0,05$  – по відношенню до скла та нержавіючої сталі

Як видно з даних табл., всі досліджувані мікроорганізми формували біоплівки на поверхнях використаних матеріалів. Однак, найбільшу здатність до формування біоплівок виявлено у *P. aeruginosa* та *S. aureus*, які утворювали в 1,5–2,2 раза щільніші біоплівки на всіх поверхнях, порівняно з іншими родами мікроорганізмів. Їх біоплівки були однакової щільності практично на всіх поверхнях, для *P. aeruginosa* оптична густина промивних розчинів становила  $1,13 \pm 0,05$  од., а для *S. aureus* –  $1,33 \pm 0,12$  од. Також бачимо, що мікрококи, грампозитивні палички, бактерії роду *Enterococcus* та *Acinetobacter* утворювали в 1,3–1,8 раза ( $P \leq 0,05$ ) щільніші біоплівки на алюмінії, оцинкованій сталі та пластику, порівняно з нержавіючою сталлю та склом. Кишкова паличка формувала біоплівку однакової щільності на всіх поверхнях, оптична густина промивних розчинів становила  $0,92 \pm 0,06$  од.

Отже, результати даних досліджень вказують на те, що для запобігання утворенню щільних мікробних біоплівок на деталях доїльного устаткування необхідно для його виготовлення використовувати ті матеріали, на поверхнях яких мікроорганізми формують менш щільні біоплівки. За нашими дослідженнями – це скло та нержавіюча сталь.

#### **Висновки.**

1. Бактерії *S. aureus* та *P. aeruginosa* проявляють найбільшу здатність до формування мікробних біоплівок та формують біоплівки високої щільності на будь-якій поверхні.

2. Грампозитивні палички, бактерії роду *Enterococcus* та *Acinetobacter* формують в 1,3–1,8 раза щільніші біоплівки на поверхні алюмінію, оцинкованої сталі та пластику, ніж на нержавіючій сталі та склі. Для виробництва якісного та безпечного молока і молочних продуктів необхідно використовувати устаткування, яке виготовлено з нержавіючої сталі та скла.

**Перспектива подальших досліджень** полягає у вивченні впливу на мікробні біоплівки різних мийних і дезінфікуючих засобів.

#### **Список використаної літератури**

1. 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.

2. Zottola E. A. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern / E. A. Zottola, K. C. Sasahara // International Journal of Food Microbiology. – 1994. Vol.23. – P. 125–148.

3. Sharma M. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines / M. Sharma, S. K. Anand // Food Microbiology. – 2002. – Vol.19. – P. 627–636.

4. Koutzayiotis D. Bacterial biofilms in milk pipelines / D. Koutzayiotis // S. Afr. J. Dairy Sci. – 1992. – Vol.64. P. 19–22.

5. Flint S. H. Biofilms in dairy manufacturing plant-description, current concerns and methods of control / S. H. Flint, P. J. Bremer, J. D. Brooks // Biofouling. – Vol.11. – P. 81–97.

6. Bremer P. Laboratory scale Clean-In-Place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms / P. Bremer, J. Suzanne Fillery, A. James McQuillan // Int. J. Food Microbiol. – 2006. – Vol.106. – P. 254–262.

7. Vidal D. R. Bacterial biofilms and resistance to disinfectants / D. R. Vidal, C. Ragot, F. Thibault // *Annales Pharmaceutiques Francaises*. – 1997. – Vol.55. – P. 49–54.

8. Austin J. W. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines / J. W. Austin, G. Berferon // *J. Dairy Res.* – 1995. – Vol.62. – P. 509–519.

9. Amy C. Biofilms in food processing environments / C. Amy, L. Wong // *J. Dairy Sci.* – 1998. – Vol.81. – P. 2765–2770.

10. Carpentier B. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry / B. Carpentier, O. Cerf // *S. Appl. Bacteriol.* – 1993. – № 75. – P. 499–511.

11. 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 // – 2000. – P. 1–27.

12. O'Toole G. A. The initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WC 365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis / G. A. O'Toole, R. Kolter // *Mol. Microbiol.* – 1998. – № 28. – P. 449–461.

13. Platt L. A. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: defining the robes of flagella, motility, chemotaxis and type I pili / L. A. Platt, R. Kolter // *Mol. Microbiol.* – 1998. – № 30. – P. 285–294.

14. Anonymous. 2004. Regulations on materials intended to come into contact with food EC1935/2004. Off J Eur Union L338:1–17.

15. FDA. 2007. Determining the regulatory status of components of a food contact material. U.S. Food and Drug Administration.

16. EFSA. 2008. Guidance document on the submission of a dossier on a substance to be used in food contact materials for evaluation by EFSA by the pannel on additives, flavourings, processing aids and materials in in contact with food (AFC). Eur Food Saf Authority 1–125.

17. Boulangé-Petermann L. Adhesion of *Streptococcus thermophilus* to stainless steel with different surface topography and roughness / L. Boulangé-Petermann, J. Rault, M. N. Bellon-Fontaine // *Biofouling*. – 1997. – Vol.11. – P. 201–16.

18. Методичні рекомендації. Санітарні правила щодо догляду за доїльним устаткуванням та молочним інвентарем і контролю їх санітарного стану. Кухтин М. Д., Крижанівський Я. Й., Даниленко І. П. та ін.. – Тернопіль: СПД ФОП Гриник Т. Я., 2010. – 12 с.

19. Молоко і молочні продукти. Готування проб і розведень для мікробіологічного дослідження: ДСТУ IDF 122С:2003. – [Чинний від 2005–01–01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2005. – 12 с. – (Національний стандарт України).

20. Молоко і молочні продукти. Визначення кількості мікроорганізмів. Метод підрахунку колоній за температури 30 °С: ДСТУ IDF 100В:2003. – [Чинний від 2005–01–01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2005. – 11 с. – (Національний стандарт України).

21. Молоко і молочні продукти. Визначення кількості психротрофних мікроорганізмів. Метод підрахунку колоній за температури 6,5 °С: ДСТУ IDF 101 А: 2003. – [Чинний від 2005–01–01]. – К.: Держспоживстандарт України, 2005. – № 6 с. – (Національний стандарт України).

22. 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.

**ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК НА ПОВЕРХНОСТЯХ РАЗЛИЧНЫХ МАТЕРИАЛОВ МИКРООРГАНИЗМАМИ ВЫДЕЛЕННЫХ С ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ / Н. Д. Кухтин, Ю. Б. Перкий, Н. В. Крушельницкая**

*Установлено, что выделенные с технологического оборудования бактерии родов Enterococcus и Acinetobacter формировали более плотные микробные биопленки на поверхности алюминия, оцинкованной стали и пластика, чем на нержавеющей стали и стекле. Бактерии видов S. aureus и P. aeruginosa формировали биопленки высокой плотности на любой поверхности технологического оборудования.*

*Ключевые слова: микробные биопленки, формирования, технологическое оборудование.*

**FORMATION OF MICROBIAL BIOFILMS ON SURFACES OF VARIOUS MATERIALS BY MICROORGANISMS ISOLATED FROM TECHNOLOGICAL EQUIPMENT / M. D.Kuchtyн, Yu. B. Perkiy, N. V. Krushelnytska**

*The isolated bacteria from process equipment species Enterococcus and Acinetobacter formed denser microbial biofilm on the surface of aluminum, galvanized steel and plastic than stainless steel and glass. Bacteria's S. aureus and P. aeruginosa species formed high density biofilm on any surface process equipment.*

*Keywords: microbial biofilms, formation, technological equipment.*

**Рецензент – доктор ветеринарных наук Я. С. Стравський**