



УДК 637.1.075.579.66

Формування біоплівки на нержавіючій сталі AISI 321, залежно від шорсткості поверхні та початкової кількості *E. coli*

Х.Ю. Кравченко, М.Д. Кухтин
kravchenukx30@gmail.com

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя,
вул. Руська, 56, м. Тернопіль, 46001, Україна

У статті наведено результати досліджень щодо впливу шорсткості поверхні нержавіючої харчової сталі на процес формування біоплівки штамом *Escherichia coli* ATCC 25299. Для дослідження були використані пластинки з нержавіючої корозійно-стійкої нікель-хромової аустенітної сталі марки AISI 321, з шорсткістю поверхні $R_a = 0,955$ мкм, $R_a = 0,63$ мкм та $R_a = 0,16$ мкм. Встановлено, що за сприятливих температурних режимів кишкова паличка протягом 9–12 год. здатна формувати біоплівку середньої та високої щільності на поверхні нержавіючої сталі з шорсткістю 0,955 мкм. Проте щільність біоплівки за початкової кількості клітин *E. coli* до 1 тис. на $см^2$ площі була в середньому в 1,8–2,2 рази ($P \leq 0,05$) нижчою, порівняно з біоплівкою, сформованою у варіантах з початковою кількістю клітин 2–10 тис. та 20–50 тис. на $см^2$ площі сталі. Інтенсивність формування біоплівки на поверхні сталі з шорсткістю 0,63 мкм була децю сповільнена, порівняно з поверхнею із шорсткістю 0,955 мкм. Проте, незважаючи на це, за щільністю біоплівки у варіантах з початковою кількістю клітин *E. coli* 2–10 тис. і 20–50 тис. на $см^2$ площі були високої щільності починаючи з 12 години інкубації, тобто аналогічно, як на поверхні із шорсткістю 0,955 мкм. Процес плівкоутворення за таких початкових кількостей *E. coli* на поверхні з шорсткістю 0,63 мкм завершувався на 24 год., тимчасом, як за шорсткості 0,955 мкм на 18 год. інкубації. За початкової кількості *E. coli* на поверхні сталі до 1 тис. з шорсткістю поверхні 0,63 мкм, біоплівки формувалися високої щільності, починаючи з 20 год., що, в середньому, на 5–6 год. довше, порівняно з шорсткістю поверхні 0,955 мкм.

За шорсткості поверхні сталі 0,16 мкм процес плівкоутворення значно сповільнився, порівняно з поверхнями, які мали шорсткість 0,955 та 0,63 мкм. Через дев'ять годин інкубації *E. coli* на сталі з шорсткістю 0,16 мкм біоплівки були в середньому в 2,0 рази ($P \leq 0,05$) слабшої щільності, порівняно з шорсткістю 0,955 мкм, і в 1,3–1,6 рази ($P \leq 0,05$), порівняно з шорсткістю 0,63 мкм незалежно від початкової кількості *E. coli*. За 12 годин інкубації *E. coli* у варіанті з початковою кількістю до 1 тис. на $см^2$ площі біоплівка ще була слабкою, а у варіантах з початковою кількістю 2–10 тис. і 20–50 тис. на $см^2$ площі – середньої щільності – 0,805 і 0,916 од. відповідно. Протягом 18 годин інкубації біоплівка була середньої щільності тільки у варіанті з початковою кількістю до 1 тис. *E. coli* на $см^2$ поверхні. За більшої початкової кількості бактерій вона була високої щільності. Тільки через 24 год інкубації *E. coli* біоплівки у всіх варіантах були високої щільності.

Ключові слова: мікробна біоплівка, формування, *Escherichia coli*, щільність, шорсткість, нержавіюча сталь, технологічне обладнання.

Формирование биопленок на нержавеющей стали AISI 321, в зависимости от шероховатости поверхности и исходного количества *E. coli*

Х.Ю. Кравченко, М.Д. Кухтин
kravchenukx30@gmail.com

Тернопольский национальный технический университет имени Ивана Пулюя,
ул. Русская, 56, г. Тернополь, 46001, Украина

В статье изображены результаты исследований влияния шероховатости поверхности нержавеющей пищевой стали на процесс формирования биопленки штаммом *Escherichia coli* ATCC 25299. Для исследования были использованы пластинки из

Citation:

Kravchenyuk, K.U., Kuchtyan, M.D. (2017). Biofilms formation on the stainless steel AISI 321 surface in terms of surface roughness and *E. coli* initial number. *Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj*, 19(75), 144–148.

нержавеющей коррозионно-стойкой никель-хромовой аустенитной стали марки AISI 321, с шероховатостью поверхности $R_a = 0,955$ мкм, $R_a = 0,63$ мкм и $R_a = 0,16$ мкм. Установлено, что при благоприятных температурных режимов кишечная палочка в течение 9–12 ч способна формировать биопленки средней и высокой плотности на поверхности нержавеющей стали с шероховатостью 0,955 мкм. Однако плотность биопленок при начальной численности клеток *E. coli* до 1 тыс. в см^2 площади была в среднем в 1,8–2,2 раза ($P \leq 0,05$) ниже по сравнению с биопленкой сложившейся в вариантах с начальной количеством клеток 2–10 тыс. и 20–50 тыс. в см^2 площади стали. Интенсивность формирования биопленки на поверхности стали с шероховатостью 0,63 мкм была несколько замедленная, по сравнению с поверхностью с шероховатостью 0,955 мкм. Однако, несмотря на это по плотности, биопленки в вариантах с начальной количеством клеток *E. coli* 2–10 тыс. и 20–50 тыс. в см^2 площади были высокой плотности начиная с 12 часа инкубации, так же, как на поверхности с шероховатостью 0,955 мкм. Процесс пленкообразования при таких начальных количествах *E. coli* на поверхности с шероховатостью 0,63 мкм завершился на 24 ч., в то время же время, как по шероховатости 0,955 мкм на 18 часу инкубации. В количестве *E. coli* на поверхности стали до 1 тыс. с шероховатостью поверхности 0,63 мкм, биопленки формировались высокой плотности начиная с 20 ч., что в среднем на 5–6 ч дольше по сравнению с шероховатостью поверхности 0,955 мкм.

По шероховатости поверхности стали 0,16 мкм процесс пленкообразования значительно замедлился по сравнению с поверхностями, которые имели шероховатость 0,955 и 0,63 мкм. Через 9 ч. инкубации *E. coli* на стали с шероховатостью 0,16 мкм биопленки были в среднем в 2,0 раза ($P \leq 0,05$) слабее плотности по сравнению с шероховатостью 0,955 мкм и, в 1,3–1,6 раза ($P \leq 0,05$) по сравнению с шероховатостью 0,63 мкм независимо от исходного количества *E. coli*. За 12 часов инкубации *E. coli* в варианте с начальной численностью до 1 тыс. в см^2 площади биопленка еще была слабой, а в вариантах с начальной количеством 2–10 тыс. и 20–50 тыс. в см^2 площади – средней плотности – 0,805 и 0,916 ед. соответственно. В течение 18 часов инкубации биопленка была средней плотности только в варианте с начальным количеством до 1 тыс. *E. coli* на см^2 поверхности. Только через 24 часа инкубации *E. coli* биопленки во всех вариантах были высокой плотности.

Ключевые слова: микробная биопленка, формирование, *Escherichia coli*, плотность, шероховатость, нержавеющая сталь, технологическое оборудование.

Biofilms formation on the stainless steel AISI 321 surface in terms of surface roughness and *E.coli* initial number

K.U. Kravchenyuk, M.D. Kuchtyн
kravchenukx30@gmail.com

Ternopil Ivan Puluj National Technical University,
Ruska Str., 56, Ternopil, 46001, Ukraine

*The results of the research of stainless food steel surface roughness impact on biofilm Escherichia coli formation have been given. The stainless plates AISI 321 of surface roughness $R_a = 0.955$ mkm, $R_a = 0.63$ mkm and $R_a = 0.16$ mkm were used in the research. It was found that at favorable temperatures bacterium coli is able to form biofilms of medium and high density on the stainless steel surface of roughness 0.955 mkm during 9–12 hours. Though, biofilms density at initial *E. coli* number up to 1000 per cm^2 of area was on the average 1.8–2.2 times ($P \leq 0.05$) lower in comparison with the biofilm formed in cases with initial cell number 2000–10 000 and 20000–50000 on cm^2 of stainless steel surface.*

*Biofilm formation intensity on the steel of roughness 0.63 mkm surface was rather decelerated comparing to the surface of roughness 0.955 mkm. Nevertheless, as for density the biofilms in cases with initial *E. coli* number 2000–10 000 and 20000–50000 on cm^2 of surface were of high density from 12 hours of incubation, i.e. the same as in case with the surface of roughness 0.955 mkm. Film forming process at such initial *E. coli* number on the surface of roughness 0.63 mkm was completed at the 24th hour while on the surface of roughness 0.955 mkm – at the 18th hour of incubation.*

*For the steel of roughness 0.16 mkm the film forming process was greatly decelerated comparing to the surfaces of roughness 0.955 and 0.63 mkm. After 9 hours of *E. coli* incubation on the steel of roughness 0.16 mkm the biofilms were on the average 2,0 times ($P \leq 0.05$) lower density in comparison with roughness 0,955 mkm and 1.3–1.6 times ($P \leq 0.05$) lower comparing to roughness 0,63 mkm irrespective of the initial *E. coli* number. After 12 hours of *E. coli* incubation in case with initial number up to 1 000 per cm^2 of area the biofilm was still weak, and in cases with initial number 2000–10 000 and 20000–50000 on cm^2 of surface – of medium density – 0.805 and 0.916 units correspondingly. Only after 24 hours of *E. coli* incubation the biofilms in all cases were of high density.*

Key words: microbial biofilm, formation, *Escherichia coli*, density, roughness, stainless steel, processing equipment.

Вступ

Забруднення мікроорганізмами технологічного обладнання в харчовій промисловості є важливою проблемою, оскільки негативно впливає на якість і безпечність сировини та готових продуктів харчування. Адже понад 40% харчових отруєнь людей у світі спричиняються мікроорганізмами, які надходять у сировину та готові продукти з технологічного устаткування (Naeghebaert et al, 2001). Це пов'язано з тим, що мікроорганізми виживають на технологічному устаткуванні завдяки специфічній властивості – здат-

ності формувати біоплівки (Pe´rez-Rodríguez et al, 2008; Lequette et al, 2010). Біоплівка – це жива сукупність одного або декількох видів чи родів бактерій, яка постійно оновлюється, прикріплена до біогенної чи абіогенної поверхні та оточена полісахаридним матриксом (Costerton et al, 2003). Дезінфікуючі засоби не завжди діють на бактерії, які сформовані у біоплівки, адже резистентність бактерій у біоплівках до дезінфікуючих речовин, антибіотиків чи антисептиків приблизно в 100 разів більша, ніж у планктонних мікроорганізмів (Levis, 2001; Kukhtyn, 2011). Це пов'язано з тим, що в біоплівках мікроорганізми пе-

ребувають в метаболічно інертних формах, на які погано діють біоциди, а також через те, що пори і канали біоплівки не пропускають великі молекули біоцидів всередину біоплівки.

Основним моментом, без якого неможливе утворення біоплівки, є процес адгезії мікроорганізмів до поверхні, доступної для подальшої колонізації. Адгезія мікроорганізмів залежить від доволі великої кількості змінних чинників, особливо таких, як рід та вид мікроорганізму, шорсткість поверхні, гідрофільність чи гідрофобність матеріалу та ряду екологічних факторів (осмолярність, рН, температура, парціальний тиск кисню, наявність антибактеріальних речовин і т. д.). У молочній промисловості шорсткість поверхні нержавіючої сталі не повинна перевищувати $R_a = 0,8$ мкм (EHEDG, 2004) і вважається, чим вона менша, тим буде більш гігієнічна. Проте в процесі експлуатації поверхня нержавіючої сталі зазнає змін і на ній з'являються потертості, подряпини, які збільшують шорсткість і тим самим площу контакту з мікроорганізмами.

Метою роботи було дослідити вплив шорсткості поверхні нержавіючої харчової сталі марки AISI 321 на процес формування біоплівки *Escherichia coli*.

Матеріал і методи дослідження

Дослідження процесу формування біоплівки проводили на моделі штаму *Escherichia coli* ATCC 25299. Для дослідження були використані пластинки з нержавіючої корозійно-стійкої нікель-хромової аустенітної сталі марки AISI 321, розміром 30×30 мм та товщиною 5 мм, з шорсткістю поверхні $R_a = 0,955$ мкм, $R_a = 0,63$ мкм та $R_a = 0,16$ мкм.

З метою визначення впливу шорсткості поверхні нержавіючої сталі на процес формування біоплівки *E. coli*, дослідження поділили на три варіанти. У пер-

шому варіанті в стерильні чашки Петрі ставили стерильні пластини з нержавіючої сталі з відповідною шорсткістю поверхні та вносили в чашку МПБ з концентрацією *E. coli*, щоб на 1 см² площі пластини припадало в середньому до 1 тис. клітин. У другому варіанті у чашки Петрі з пластинами нержавіючої сталі вносили МПБ з концентрацією *E. coli* від 2 тис. до 10 тис. клітин на 1 см² площі. У третьому варіанті у чашки Петрі з пластинами нержавіючої сталі вносили МПБ з концентрацією *E. coli* від 20 тис. до 50 тис. клітин на 1 см² площі. Через 3, 6, 9, 12, 18 та 24 годин інкубації за температури 37 °С пластини витягували з чашок Петрі, триразово відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів фосфатним буфером та фіксували утворені біоплівки *E. coli* 96° етиловим спиртом. Після фіксування біоплівки фарбували, у 0,1% розчині кристалічного фіолетового. Потім кожну пластинку окремо заливали 7,0 см³ 96° етиловим спиртом та залишали на 10 хв. Після експозиції 10 хв. відбирали 5 см³ промивного розчину з біоплівок та визначали його оптичну густину спектрофотометрично за довжини хвилі 570 нм.

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 понад 1,0 од. щільність сформованих біоплівок вважали високою.

Шорсткість поверхонь пластин нержавіючої сталі визначали за допомогою профілометра марки 296, згідно з ГОСТ 2789-73 (GOST 2789-73, 1973).

Результати та їх обговорення

Результати досліджень формування біоплівки на нержавіючій сталі марки AISI 321 з шорсткістю поверхні 0,955 мкм, залежно від початкової кількості клітин *E. coli*, протягом 24 годин наведено на рис. 1.

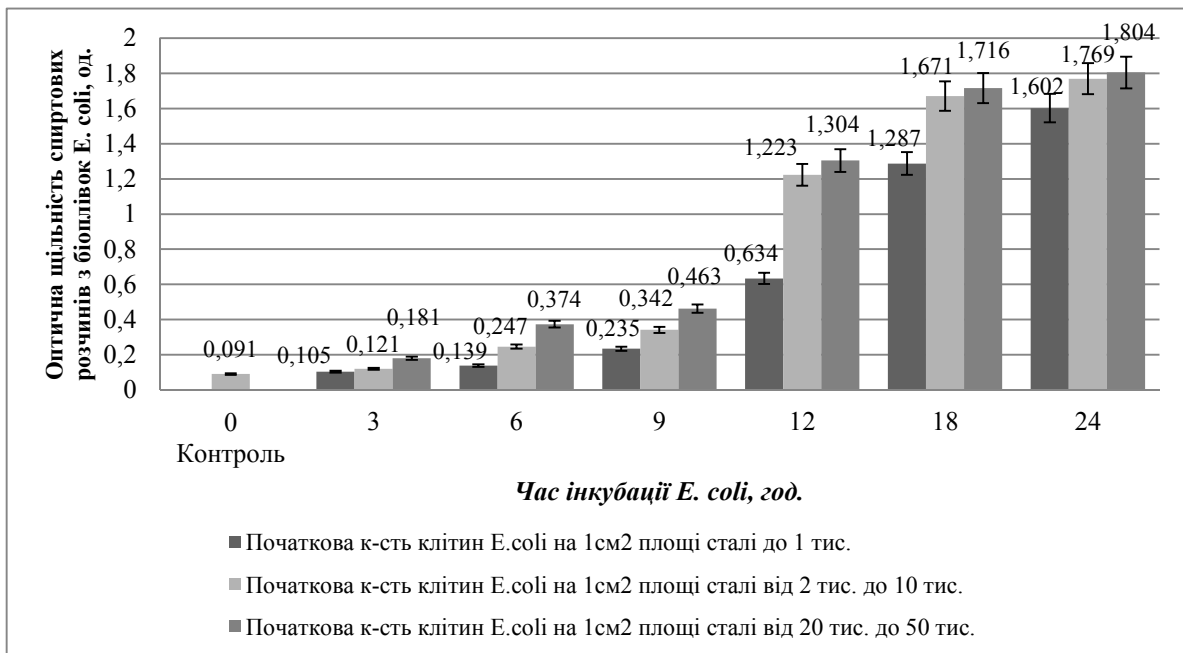


Рис. 1. Формування біоплівки *E. coli* на нержавіючій сталі марки AISI 321 шорсткістю $R_a = 0,955$ мкм при температурі 37 °С

З рис. 1 видно, що за температури 37 °С упродовж трьох годин інкубації *E. coli* щільність біоплівки, залежала від початкової кількості мікробних клітин на поверхні нержавіючої сталі. Так, за початкової кількості *E. coli* на поверхні до 1 тис./см² площі через три години щільність біоплівки була практично такою ж як у контролі. Водночас за початкової кількості *E. coli* від 2 до 10 тис./см² площі, щільність біоплівки зростає в 1,3 раза ($P \leq 0,05$), а за початкової кількості *E. coli* від 20 до 50 тис. в 2,0 рази ($P \leq 0,05$). Надалі упродовж наступних годин інкубації біоплівка у всіх варіантах ставала щільніша, однак протягом 9 годин вирощування вона ще була слабкою до 0,5 од. Після дев'ятої години інкубації відмічаємо інтенсивний процес плівкоутворення і на 12 годину у варіантах з початковою кількістю клітин *E. coli* від 2 до 10 тис. та 2–50 тис./см² площі біоплівка ставала високої щільності – 1,22 та 1,30 од відповідно. У варіанті до 1 тис. клітин на см² площі сталі вона була середньої щільності – 0,63 од.

На 18 годину інкубації *E. coli* на поверхні сталі з шорсткістю 0,955 мкм процес плівкоутворення практично завершився у варіантах з початковою кількістю клітин *E. coli* від 2 до 50 тис. на см² площі, а у варіанті до 1 тис. клітин біоплівка стала високої щільності – 1,28 од. У цьому варіанті процес плівкоутворення завершився на 24 годині, тобто щільність біоплівки зрівнялася, як у варіантах два та три.

Отже, проведені дослідження вказують на те, що за сприятливих температурних режимів кишкова паличка протягом 9–12 год здатна формувати біоплівки середньої та високої щільності на поверхні нержавіючої сталі з шорсткістю 0,955 мкм. Проте щільність біоплівки за початкової кількості клітин *E. coli* до 1 тис. на см² площі була в середньому в 1,8–2,2 рази ($P \leq 0,05$) нижчою, порівняно з біоплівкою сформованою у варіантах з початковою кількістю клітин 2–10 тис. та 20–50 тис. на см² площі сталі.

На рис. 2 наведено дані щодо формування біоплівки *E. coli* на поверхні нержавіючої сталі з шорсткістю $R_a = 0,63$ мкм.

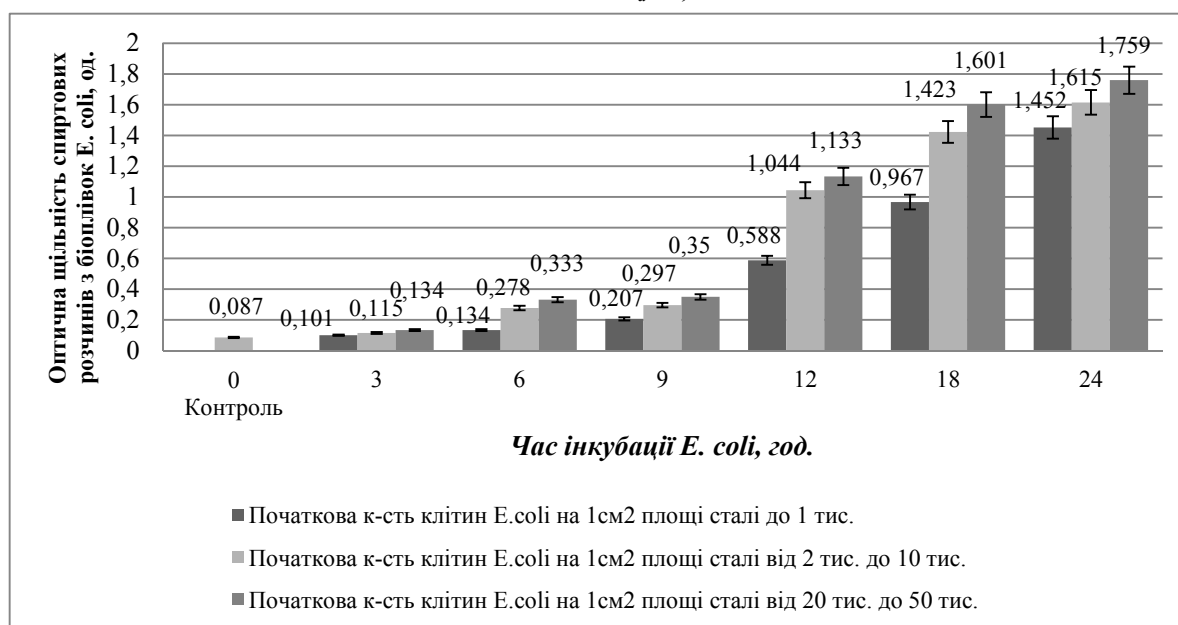


Рис. 2. Формування біоплівки *E. coli* на нержавіючій сталі марки AISI 321 шорсткістю $R_a = 0,63$ мкм при температурі 37 °С

Як видно з даних рис. 2, інтенсивність формування біоплівки на поверхні сталі з шорсткістю 0,63 мкм, була дещо сповільнена, порівняно з поверхнею із шорсткістю 0,955 мкм. Проте незважаючи на це, за щільністю біоплівки у варіантах з початковою кількістю клітин *E. coli* 2–10 тис. і 20–50 тис. на см² площі були високої щільності починаючи з 12 годин інкубації, тобто аналогічно, як на поверхні із шорсткістю 0,955 мкм. Процес плівкоутворення за таких початкових кількостях *E. coli* на поверхні з шорсткістю 0,63 мкм завершувався на 24 годині, тимчасом, як за шорсткості 0,955 мкм на 18 годині інкубації. За початкової кількості *E. coli* на поверхні сталі до 1 тис. з шорсткістю поверхні 0,63 мкм, біоплівки формувалися високої щільності, починаючи з 20 години, що, в середньому, на 5–6 год довше, порівняно з шорсткістю поверхні 0,955 мкм.

На рисунку 3 наведено дані щодо формування біоплівки *E. coli* на поверхні сталі з шорсткістю 0,16 мкм. Дані рис. 3 вказують на те, за що за шорсткості поверхні сталі 0,16 мкм процес плівкоутворення значно сповільнився, порівняно з поверхнями, які мали шорсткість 0,955 та 0,63 мкм. Через дев'ять годин інкубації *E. coli* на сталі з шорсткістю 0,16 мкм біоплівки були в середньому в 2,0 рази ($P \leq 0,05$) слабшої щільності, порівняно з шорсткістю 0,955 мкм і, в 1,3–1,6 рази ($P \leq 0,05$), порівняно з шорсткістю 0,63 мкм незалежно від початкової кількості *E. coli*.

За 12 год. інкубації *E. coli* у варіанті з початковою кількістю до 1 тис. на см² площі біоплівка ще була слабкою, а у варіантах з початковою кількістю 2–10 тис. і 20–50 тис. на см² площі – середньої щільності – 0,805 і 0,916 од. відповідно.

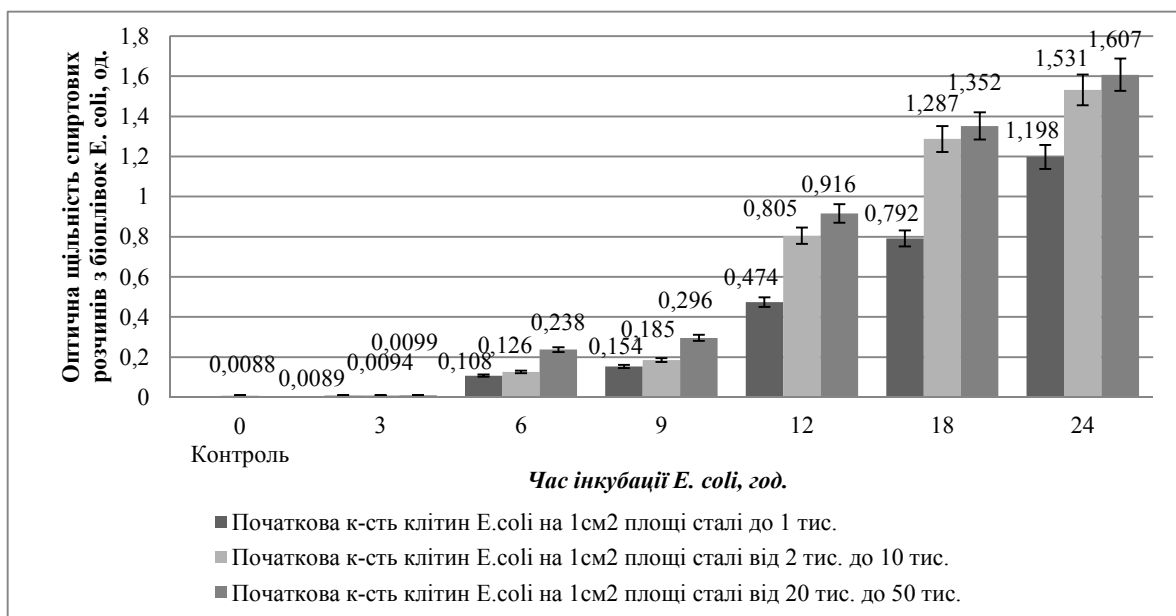


Рис. 3. Формування біоплівки *E. coli* на нержавіючій сталі марки AISI 321 шорсткістю $R_a = 0,16$ мкм при температурі 37 °C

Протягом 18 годин інкубації біоплівка була середньої щільності тільки у варіанті з початковою кількістю до 1 тис. *E. coli* на $см^2$ поверхні. За більшої початкової кількості бактерій вона була високої щільності. Тільки через 24 год. інкубації *E. coli* біоплівки у всіх варіантах були високої щільності.

Отже, підсумок проведених досліджень, можна відзначити, що на процес формування мікробних біоплівок на харчовій сталі марки AISI 321 впливає шорсткість поверхні та початкова кількість бактерій. Тобто результати вказують, що на поверхні з шорсткістю 0,16 мкм процес адгезії *E. coli* проходить повільніше, порівняно зі сталлю, яка мала шорсткість 0,63 і 0,955 мкм. Крім того, отримані дані вказують, що для запобігання формуванню біоплівок високої щільності необхідно проводити ретельну санітарну обробку поверхні сталевого обладнання з метою недопущення великої кількості бактерій на ньому.

Висновки

Процес формування біоплівки *E. coli* на поверхні нікель-хромової аустенітної сталі марки AISI 321 залежав, як від шорсткості поверхні, так і від початкової кількості мікробних клітин на сталі.

За початкової кількості *E. coli* на поверхні сталі до 1 тис. з шорсткістю поверхні 0,63 мкм біоплівки формувалися високої щільності, починаючи з 20 год, що, в середньому на 5–6 год довше, порівняно з шорсткістю поверхні 0,955 мкм і на 10 год довше, порівняно з шорсткістю поверхні 0,16 мкм.

Через дев'ять годин інкубації *E. coli* на сталі з шорсткістю 0,16 мкм біоплівки були в середньому в 2,0 рази слабшої щільності, порівняно з шорсткістю 0,955 мкм і в 1,3–1,6, порівняно з шорсткістю 0,63 мкм незалежно від початкової кількості *E. coli*.

Перспективи подальших досліджень полягають у розробці математичної моделі формування біоплівок

на поверхні нержавіючої сталі з різною шорсткістю, залежно від виду мікроорганізмів, їх морфології, початкової кількості, температури навколишнього середовища, з метою прогнозування і запобігання утворення біоплівок на технологічному обладнанні в харчовій промисловості.

Бібліографічні посилання

- Haeghebaert, S., Le Querrec, F., Vaillant, V. (2001). Food poisoning incidents in France in 1998. *Bull Epidemiol Hebdomad.* 65–70.
- Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M. (2010). Christine Faille Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling.* 26(4), 421–431.
- Pe'rez-Rodr'iguez, F., Valero, A., Carrasco, E. (2008). Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review. *Trends Food Sci. Technol.* 131–144.
- Costerton, J.W., Veeh, R., Shirtliff, M. (2003). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.* 112(10), 1466–1477.
- Levis, K. (2001). Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 45(4), 999–1007.
- Kukhtyn, M.D. (2011) Theoretical substantiation of veterinary-sanitary regulations and development of control system of whole cooled milk production: abstract of doctoral (Veterinary science) dissertation. Lviv, 40 (in Ukrainian).
- Hygienic equipment design criteria (Guideline Document No. 8), Brussels: EHEDG 2004. ENEDG.
- GOST 2789-73 (1973). Surface roughness. Parameters and characteristics. Moscow: GosStandard USSR. 6 (in Russian).

Стаття надійшла до редакції 24.02.2017