

Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2519–268X print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.32718/nvlvet9012
<http://nvlvet.com.ua/>

UDC 637.1.075.579.66

Characteristic features of *Enterococcus faecalis* film formation on the stainless steel AISI 321 depending on the surface roughness

K.U. Kravcheniuk

Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ternopil, Ukraine

Article info

Received 14.09.2018
Received in revised form
12.10.2018
Accepted 15.10.2018

Ternopil Ivan Puluj National
Technical University,
Ruska Str., 56, Ternopil,
46001, Ukraine.
Tel.: + 38-035-251-97-01
E-mail: kravcheniuk30@gmail.com

Kravcheniuk, K.U. (2018). Characteristic features of *Enterococcus faecalis* film formation on the stainless steel AISI 321 depending on the surface roughness. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. 20(90), 58–62. doi: 10.32718/nvlvet9012

At the present stage of milk products manufacture, the most important factor affecting their safety and reducing their storage time is a microbiological one. Despite all complex of measures including washing, disinfection, heat processing to eliminate microbes on production equipment and in the finished products it is very difficult to achieve good results. This deals with the fact that microorganisms can survive on the production equipment thanks their ability to form biofilms and also treatment-resistant microorganisms strains appear in the process of continuous sanitary treatment. The aim of the paper was to study the biofilms *Enterococcus faecalis* formation on the stainless steel AISI 321 depending on their initial quantity and surface roughness. The plates made of the stainless steel AISI 321 of surface roughness $R_a = 0.955$ mkm, $R_a = 0.63$ mkm and $R_a = 0.16$ mkm were used for the investigation. It was found that during 9 hours *Enterococcus faecalis* was forming the biofilms of weak density less than 0,5 units on the stainless steel surface of AISI 321 of roughness $R_a = 0.955$ mkm. After the 12th hour the intensive film formation process was noticed in the options with initial number of cells *E.f.* from 2000 to 10 000 and 20–50 thousand/cm², the biofilm was getting of high density – 1.246 and 1.415 respectively with initial number of cells less than 1000 per 1 cm² of steel surface and it was of medium density – 0.672 cells. The process of film formation on the steel surface of roughness 0.63 mkm was rather decelerating, in comparison with the surface of roughness 0.955 mkm. Though, despite this, in the options with initial number of *E.f.* cells from 2000 to 10 000 and 20–50 thousand/cm² the biofilms were of high density after the 12th hour of incubation, i.e. it was the same as for the surface of 0.955 mkm roughness. The process of film formation at such initial numbers of *E.f.* on the surface of roughness 0.63 mkm was finishing after the 24th hour while at roughness 0.955 mkm – after the 18th hour of incubation. It was found that on the steel surface of roughness 0.16 mkm the process of film formation was greatly getting slower comparing to the surfaces of roughness 0.955 and 0.63 mkm. During 12 hours of *E.f.* incubation in case when the initial number of *E.f.* was less than 1000 per 1 cm² the film was of weak density but in cases when the initial number was 2000 – 10 000 and 20–50 thousand/cm² the biofilms were of medium and high density – 0.917 and 1.025 units. After 18 hours of incubation the film was of medium density only in case when the initial number was less than 1000 *E.f.* per 1 cm² of the surface. At larger initial number of bacteria it was of high density. Only after 24 hours of *E.f.* incubation biofilms in all options were of high density. Thus, we came to the conclusion that *E.f.* biofilms formation on the stainless steel AISI 321 is influenced by the surface roughness and initial number of bacteria. The results have shown that on the plates of roughness 0,16 mkm the film formation process is slower than on the surface of roughness 0.955 and 0.63 mkm.

Key words: roughness, microbial biofilm, formation, *Enterococcus faecalis*, density, stainless steel, processing equipment.

Характеристика процесу плівкоутворення *Enterococcus faecalis* на нержавіючій сталі AISI 321 залежно від шорсткості поверхні

Х.Ю. Кравченко

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя, м. Тернопіль, Україна

На сучасному етапі виробництва молочних продуктів найбільш важливим чинником, який впливає на їх безпеку, а також знижує стійкість при зберіганні є мікробіологічний. Незважаючи на запровадження всього комплексу заходів таких, як миття, дезінфекція, теплова обробка, щодо знищення мікроорганізмів на технологічному устаткуванні та в готовому продукті дуже важко досягти ефективного результату. Це пов'язано з тим, що мікроорганізми виживають на технологічному устаткуванні завдяки здатності формувати біоплівки, а також в процесі постійної санобробки залишаються стійкі штами мікроорганізмів. Метою роботи було дослідити формування біоплівок *Enterococcus faecalis* на нержавіючій сталі марки AISI 321, залежно від їх початкової кількості і шорсткості поверхні. Для дослідження були використані пластинки з нержавіючої 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 протягом 9 год. *Enterococcus faecalis* формував біоплівки слабкої щільності до 0,5 од. на поверхні нержавіючої сталі з шорсткістю 0,955 мкм. На 12 годину було виявлено інтенсивний процес плівкоутворення у варіантах з початковою кількістю клітин *E. f.* від 2 до 10 тис. та 20–50 тис./см² площі, біоплівка ставала високої щільності – 1,246 та 1,415 од. відповідно, з початковою кількістю до 1 тис. клітин на см² площі сталі – вона була середньої щільності – 0,672 од. Процес формування біоплівки на поверхні сталі з шорсткістю 0,63 мкм, був децю сповільнений, порівняно з поверхнею із шорсткістю 0,955 мкм. Однак, незважаючи на це, у варіантах з початковою кількістю клітин *E. f.* 2–10 тис. і 20–50 тис. на см² площі біоплівки 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. f.* на поверхні з шорсткістю 0,63 мкм завершувався на 24 год., в той час же час, як за шорсткості 0,955 мкм на 18 год. інкубації. Виявлено, що на поверхні сталі з шорсткістю 0,16 мкм процес плівкоутворення значно сповільнився, порівняно з поверхнями, які мали шорсткість 0,955 та 0,63 мкм. Протягом 12 год. інкубації *E. f.* у варіанті з початковою кількістю до 1 тис. на см² площі біоплівка була слабкої щільності, а у варіантах з початковою кількістю 2–10 тис. і 20–50 тис. на см² площі – середньої та високої щільності – 0,917 і 1,025 од. За 18 годин інкубації біоплівка була середньої щільності тільки у варіанті з початковою кількістю до 1 тис. *E. f.* на см² поверхні. За більшої початкової кількості бактерій вона була високої щільності. Тільки через 24 год. інкубації *E. f.* біоплівки у всіх варіантах були високої щільності. Отже, можна відзначити, що на процес формування біоплівок *E. f.* на нержавіючій сталі марки AISI 321 впливає шорсткість поверхні та початкова кількість бактерій. Результати вказують, що на пластинках з шорсткістю 0,16 мкм процес плівкоутворення проходить повільніше, порівняно з шорсткістю поверхні 0,955 та 0,63 мкм.

Ключові слова: шорсткість, мікробна біоплівка, формування, *Enterococcus faecalis*, щільність, нержавіюча сталь, технологічне обладнання.

Вступ

Виготовлення стійкої при зберіганні молочної продукції визначається якістю сировини і санітарним станом обладнання (Kukhtyn et al., 2017). Важливу роль у мікробіологічному забрудненні продуктів відіграє поверхня технологічного обладнання, оскільки саме поверхня є найважливішим джерелом мікробної контамінації продукції (Bremer et al., 2009; Kukhtyn et al., 2017). Результати наукових досліджень вказують, що мікроорганізми виживають на технологічному устаткуванні завдяки специфічній властивості – це здатності формувати біоплівки (Marchand et al., 2012).

Відомо, що процес формування біоплівок на поверхнях технологічних ліній молочного устаткування має свої особливості. Це пов'язано з наявністю великої кількості згинів, з'єднань, рельєфу та шорсткості поверхні молочного обладнання (Perni et al., 2013; Hcevar et al., 2014).

У молочної промисловості шорсткість поверхні нержавіючої сталі не повинна перевищувати $R_a=0,8$ мкм (EHEDG, 2004) і вважається, що чим вона менша, тим буде більш гігієнічна. Проте, в процесі експлуатації поверхня нержавіючої сталі зазнає змін і на ній появляються мікротріщини, потертості, подряпини, які збільшують шорсткість і тим самим площу контакту з мікроорганізмами (Hcevar et al., 2014). Отже, рельєф, шорсткість та структура поверхні обладнання мають значний вплив на процес формування мікробних біоплівок.

Метою роботи було дослідити формування біоплівок *Enterococcus faecalis* на нержавіючій сталі марки AISI 321, залежно від їх початкової кількості та шорсткості поверхні.

Матеріал та методи досліджень

Для дослідження були використані пластинки з нержавіючої корозійно-стійкої 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 *Enterococcus faecalis*, дослідження розділили на три варіанти. У першому варіанті в стерильні чашки Петрі ставили стерильні пластини з нержавіючої сталі з відповідною шорсткістю поверхні і вносили в чашку МПБ з концентрацією *E. f.*, 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. f.* 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. f.* 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. f.* 96° етиловим спиртом. Після фіксування біоплівки фарбували, у 0,1% розчині кристалічного фіолетового. Потім кожену 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 більше 1,0 од. щільність сформованих біоплівок вважали високою (Kukhtyn et al., 2017).

Шорсткість поверхонь пластин нержавіючої сталі визначали за допомогою профілометра марки 296, згідно 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. f.* протягом 24 годин наведено на рис. 1.

На рис. 1 показано, що за початкової кількості *E. f.* на поверхні до 1 тис./см² площі через три години щільність біоплівки була практично така ж, як у конт-

ролі. У той же час за початкової кількості *E. f.* від 2 до 10 тис./см² площі, щільність біоплівки зростає в 1,5 рази ($P \leq 0,05$), а за початкової кількості *E. f.* від 20 до 50 тис. в 2,1 рази ($P \leq 0,05$). Упродовж шести та дев'яти годин інкубації біоплівка *E. f.* у всіх варіантах ставала щільніша, однак протягом 9 годин вирощування вона ще була слабкою до 0,5 од. На 12 годину спостерігається інтенсивний процес плівкоутворення у варіантах з початковою кількістю клітин *E. f.* від 2 до 10 тис. та 20–50 тис./см² площі, біоплівка ставала високої щільності – 1,246 та 1,415 од. відповідно, з початковою кількістю до 1 тис. клітин на см² площі сталі – вона була середньої щільності – 0,672 од.

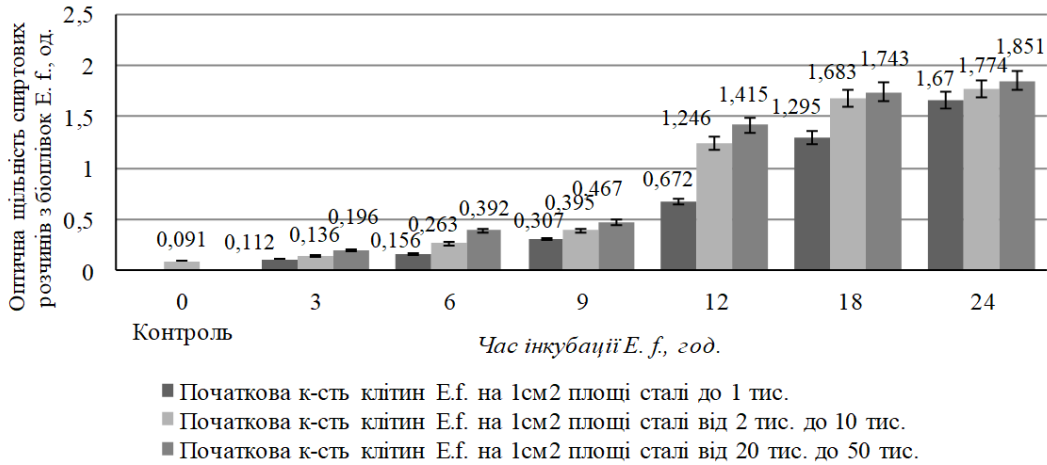


Рис. 1 Формування біоплівки *E. f.* на нержавіючій сталі марки AISI 321 шорсткістю $R_a = 0,955$ мкм при температурі 37 °C

На 18 годину інкубації *E. f.* на поверхні сталі з шорсткістю 0,955 мкм процес плівкоутворення практично завершився у варіантах з початковою кількістю клітин *E. f.* від 2 до 50 тис. на см² площі, а у варіанті до 1 тис. клітин біоплівка стала високої щільності - 1,295 од. У цьому варіанті процес плівкоутворення завершився на 24 годині, тобто щільність біоплівок зрівнялася, як у варіантах два та три.

За результатами проведених досліджень встановлено, що при сприятливій температурі *E. f.* протягом 9–12 год. здатний формувати біоплівки середньої та

високої щільності на поверхні нержавіючої сталі з шорсткістю 0,955 мкм. Проте щільність біоплівок за початкової кількості клітин *E. f.* до 1 тис. на см² площі була в середньому в 1,5–2,1 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. f.* на поверхні нержавіючої сталі з шорсткістю $R_a = 0,63$ мкм.

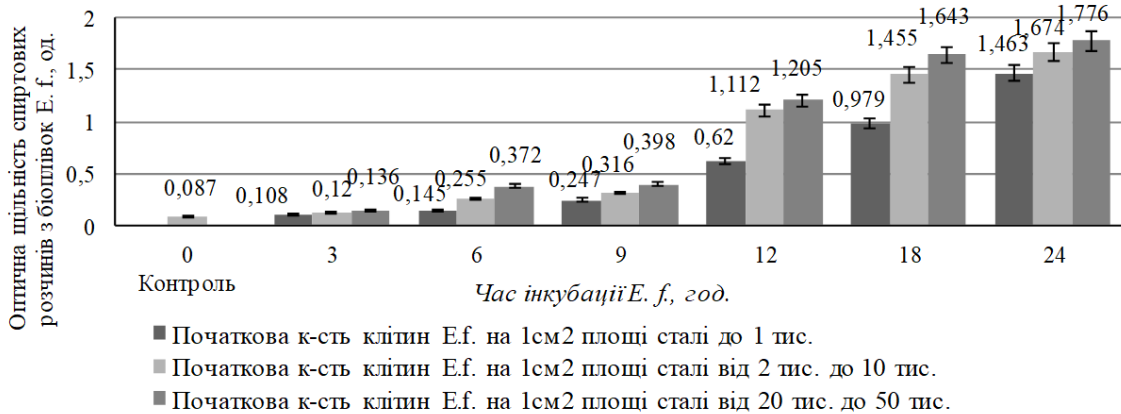


Рис. 2. Формування біоплівки *E. f.* на нержавіючій сталі марки AISI 321 шорсткістю $R_a = 0,63$ мкм при температурі 37 °C

На рис. 2, виявлено сповільнення інтенсивності формування біоплівки на поверхні сталі з шорсткістю 0,63 мкм, порівняно з поверхнею із шорсткістю 0,955 мкм. Починаючи з 12 годин щільність біоплівки у варіантах з початковою кількістю клітин *E. f.* 2–10 тис. і 20–50 тис. на см² площі були високої щільності, як на поверхні із шорсткістю 0,955 мкм. Процес

формування мікробних біоплівок *E. f.* на поверхні з шорсткістю 0,63 мкм завершувався на 24 год., в той же час, як за шорсткості 0,955 мкм на 18 год. інкубації.

На рис. 3 наведено дані щодо формування біоплівки *E. f.* на поверхні сталі з шорсткістю 0,16 мкм.

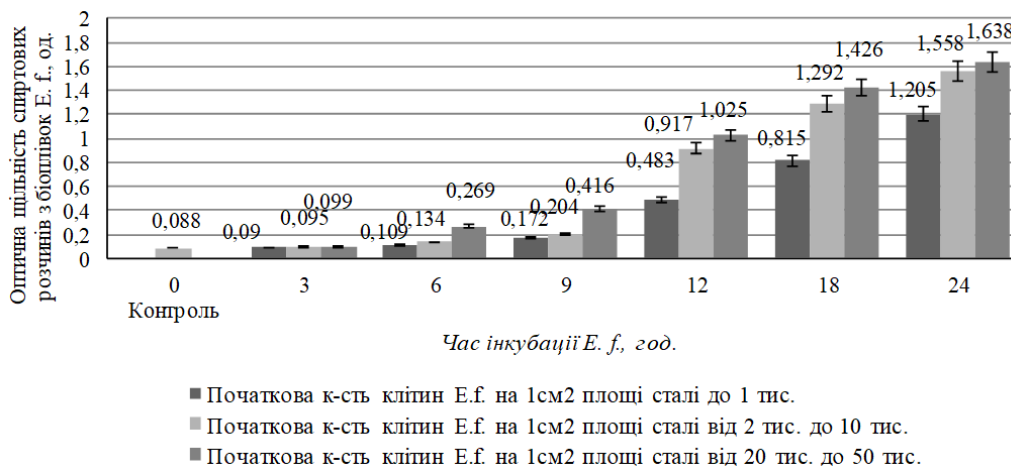


Рис. 3. Формування біоплівки *E. f.* на нержавіючій сталі марки AISI 321 шорсткістю $R_a = 0,16$ мкм при температурі 37 °С

Дані рис. 3 вказують на те, що 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. f.* на сталі з шорсткістю 0,16 мкм біоплівки були, в середньому в 1,1–1,7 раза ($P \leq 0,05$) слабшої щільності, порівняно з шорсткістю 0,955 мкм і, в 1,4 раза ($P \leq 0,05$), порівняно з шорсткістю 0,63 мкм незалежно від початкової кількості *E. f.*

Протягом 12 год. інкубації *E. f.* у варіанті з початковою кількістю до 1 тис. на см² площі біоплівка була слабкої щільності, а у варіантах з початковою кількістю 2–10 тис. і 20–50 тис. на см² площі – середньої та високої щільності – 0,917 і 1,025 од. відповідно.

За 18 годин інкубації біоплівка була середньої щільності тільки у варіанті з початковою кількістю до 1 тис. *E. f.* на см² поверхні. За більшої початкової кількості бактерій вона була високої щільності. Тільки через 24 год. інкубації *E. f.* біоплівки у всіх варіантах були високої щільності.

Таким чином, можна відзначити, що на процес формування біоплівок *E. f.* на нержавіючій сталі марки AISI 321 впливає шорсткість поверхні та початкова кількість бактерій. Так, на пластинках з шорсткістю 0,16 мкм процес плівкоутворення проходить повільніше, порівняно з шорсткістю поверхні 0,955 та 0,63 мкм. У той же час згідно досліджень (Kravcheniuk and Kukhtyn, 2017) встановлено, що за тих самих умов біоплівка *E. coli* мала меншу щільність порівняно з *E. f.* на поверхні нержавіючої сталі AISI 321. Ймовірно, це пов'язано з тим, що процес плівкоутворення залежить від розмірів бактерій, величина *E. f.* в два рази менша, ніж *E. coli*, на нашу

думку це дозволяє швидше заповнити западини шорсткості і формувати щільнішу біоплівку на поверхні з малою шорсткістю протягом короткого періоду часу. Тому для попередження формування біоплівок високої щільності необхідно проводити ретельну санітарну обробку поверхні технологічного обладнання з метою не допускання великої кількості бактерій на ньому.

Висновки

Встановлено, що на пластинках з шорсткістю 0,16 мкм процес плівкоутворення *E. f.* проходить повільніше, порівняно з шорсткістю поверхні 0,955 та 0,63 мкм. Через дев'ять годин інкубації *E. f.* на сталі з шорсткістю 0,16 мкм біоплівки були, в середньому в 1,1–1,7 раза ($P \leq 0,05$) слабшої щільності, порівняно з шорсткістю 0,955 мкм і, в 1,4 раза ($P \leq 0,05$), порівняно з шорсткістю 0,63 мкм незалежно від початкової кількості *E. f.* На 12 годину було виявлено інтенсивний процес плівкоутворення, на пластинках з шорсткістю 0,63 мкм та 0,955 мкм з початковою кількістю клітин *E. f.* від 2 до 10 тис. та 20–50 тис./см² площі, біоплівка була високої щільності, а з шорсткістю 0,16 мкм – середньої.

Перспективи подальших досліджень полягають у дослідженні впливу санітарної обробки молочного обладнання з різною шорсткістю поверхні на мікробне забруднення.

References

Kukhtyn, M., Berhilevych, O., Kravcheniuk, K., Shynkaruk, O., Horyuk, Y., & Semaniuk, N. (2017). For-

- mation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them. *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*, 5, 11(89), 26–33. doi: 10.15587/1729-4061.2017.110488.
- Bremer, P.J., Seale, B., Flint, S., & Palmer, J. (2009). *Biofilms in dairy processing. Biofilms in the food and beverage industries*. Oxford, Cambridge, New Delhi: Woodhead Publishing Limited, 396–431. doi: 10.1533/9781845697167.4.396.
- Marchand, S., De Block, J., De Jonghe, V., Coorevits, A., Heyndrickx, M., & Herman, L. (2012). *Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), 133–147. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x.
- Perni, S., Callard Preedy, E., & Prokopovich, P., (2013). *Succes and failure of colloidal approaches in adhesion of microorganisms to surface. Advances in Colloid and Interface Science*, 206, 265–274. doi: 10.1016/j.cis.2013.11.008.
- Hcevar, M., Jenko, M., Godec, M., Drobne D. (2014). *An overview of the influence of stainless-steel surface properties on bacterial adhesion. Materials and technology*, 48(5), 609–617. <http://mit.imt.si/Revija/izvodi/mit145/hocevar.pdf>.
- 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.
- Kravcheniuk, K., & Kukhtyn, M., (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. doi: 10.15421/nvlvet7529.