

Ю. Б. ПЕРКІЙ, кандидат ветеринарних наук
Є. М. КРИВОХИЖА, кандидат ветеринарних наук
 Тернопільська дослідна станція Інституту ветеринарної медицини НААН
М. Д. КУХТИН, доктор ветеринарних наук
 Тернопільський національний технічний університет ім. І. Пулюя

ФОРМУВАННЯ МІКРОБНИХ БІОПЛІВОК НА ДОЇЛЬНОМУ УСТАТКУВАННІ ЗА НАЯВНОСТІ МОЛОЧНИХ ЗАЛИШКІВ В УМОВАХ *IN VITRO*

*Встановлено, що у збідненому середовищі, за вмісту лише вуглеводів і мінеральних речовин, мікроорганізми, які виділені з доїльного устаткування та молока сирого, формують у 1,6–4,1 рази частіше біоплівки низької щільності, порівняно з середовищем багатим на поживні речовини. Бактерії роду *Staphylococcus* є єдиними, які в різних середовищах здатні формувати біоплівки однакової щільності. Ефективна санітарна обробка доїльного устаткування є важливим заходом у запобіганні формування біоплівок високої щільності на його поверхні. Розуміння взаємодії різних чинників, які впливають на бактеріальну адгезію та формування біоплівок, є важливим фактором у виборі стратегій, щоб управляти і боротися з мікробними біоплівками на обладнанні.*

Ключові слова: мікробні біоплівки, формування, поживні речовини, доїльне устаткування.

Бактерії, які є у молоці та на поверхні обладнання, здатні осідати, адгезуватися і формувати мікробні біоплівки. Останні утворюються на всіх типах поверхонь технологічного устаткування молочних підприємств та господарств, негативно впливають на безпеку молочної сировини та готової продукції [1, 2]. Тому, у молочній промисловості технологічне устаткування є найбільш суттєвим джерелом мікробного обсягання молока і молочних продуктів під час його одержання та переробки [3]. Більше 40 % харчових отруєнь людей у світі спричиняються мікроорганізмами, які надходять у сировину та готові продукти з технологічного устаткування [4].

Розвиток мікробної біоплівки – це результат успішної адгезії і подальшого розросту бактерій на поверхні матеріалу. Потенціал росту лобної мікробної біоплівки обмежений кількістю поживних речовин у зовнішньому середовищі, доступність їх до клітин, які знаходяться всередині біоплівки, і здатності видаляти продукти метаболізму [5]. Дослідники Flint S. та ін. довели, що залишки молочних білків є сприятливим фактором для адгезії і формування мікробних біоплівок на металевих поверхнях устаткування [6]. Наявність поживних речовин сприяє утворенню щільніших біоплівок з більшою кількістю екзополісахаридного шару (матриксу) [7].

Після незадовільної санітарної обробки доїльного устаткування на його поверхнях залишаються молочні залишки, які містять білки, жири та вуглеводи і є добрим поживним середовищем для мікроорганізмів.

Метою роботи було вивчити вплив поживних речовин щодо здатності формувати біоплівки на абіогенних поверхнях бактеріями, які виділені з доїльного устаткування та молока сирого.

Матеріали і методи. Експериментальні дослідження проводили в лабораторіях Тернопільської дослідної станції Інституту ветеринарної медицини НААН і господарствах Тернопільської області.

Мікробіологічні дослідження молока та змивів із доїльного устаткування проводили у відповідності до загальноприйнятих вимог [8]. Видову і родову ідентифікацію виділених культур проводили згідно з дев'ятим виданням визначника бактерій Берджі [9].

Для визначення щільності утворених біоплівок у стерильні одноразові пластикові чашки Петрі вносили 5 см³ м'ясопептонного бульйону (або іншого середовища) та 1 см³ добової тест-культури мікроорганізмів у концентрації 10⁵ КУО/см³. Чашки інкубували за температури 30°С протягом 24–48 год – для мезофільних і за температури 15–20 °С протягом 24–48 год – для психротрофних мікроорганізмів. Після інкубації, чашки триразово відмивали від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів фосфатним буфером, висушували та фіксували утворені біоплівки 96° етиловим спиртом протягом 10 хв. Потім фарбували розчином 0,1 %-ного кристалічного фіолетового протягом 10 хв. Знову тричі промивали фосфатним буфером і висушували. Потім у чашки Петрі додавали 3,0 см³ 96° етилового спирту та залишали на 20–30 хв, періодично струшуючи. Вимірювали оптичну густину промивного розчину спирту спектрофотометрично за довжини хвилі 570 нм [10]. За оптичної густини промивного розчину до 0,5 од., щільність сформованих біоплівок вважали низькою, від 0,5 до 1,0 од. – середньою, за густини розчину більше 1,0 од. – щільність сформованої біоплівки вважали високою.

Вивчення впливу поживних речовин на здатність формувати мікробні біоплівки на абіогенних поверхнях проводили наступним чином. Для цього вирощування біоплівок проводили у різних середовищах, а саме у середовищі багатому на білки – МПБ; на вуглеводи – 1 %-ний розчин глюкози з додаванням мінеральних речовин і збагаченому на поживні речовини – середовище МПБ із додаванням 1 %-ного розчину глюкози і 5 %-ного молока (контроль).

Отримані результати досліджень обробляли статистично з використанням програм Microsoft Excel і Statistika 99 Edition. Різницю вважали вірогідною коли $p \leq 0,05$; $p \leq 0,01$ та $p \leq 0,001$.

Результати досліджень.

Мікрофлора біоплівок в основному представлена бактеріями конкретного виробничого середовища, зокрема, при одержанні молока – це мікрофлора доїльного устаткування та молока сирого. У дослідях використано бактерії родів *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Streptococcus* та грампозитивні палички (*Corynebacterium*, *Lactobacillus*), які виділені з доїльного устаткування та молока сирого. Результати досліджень впливу поживних речовин на формування мікробних біоплівок наведено на рис.

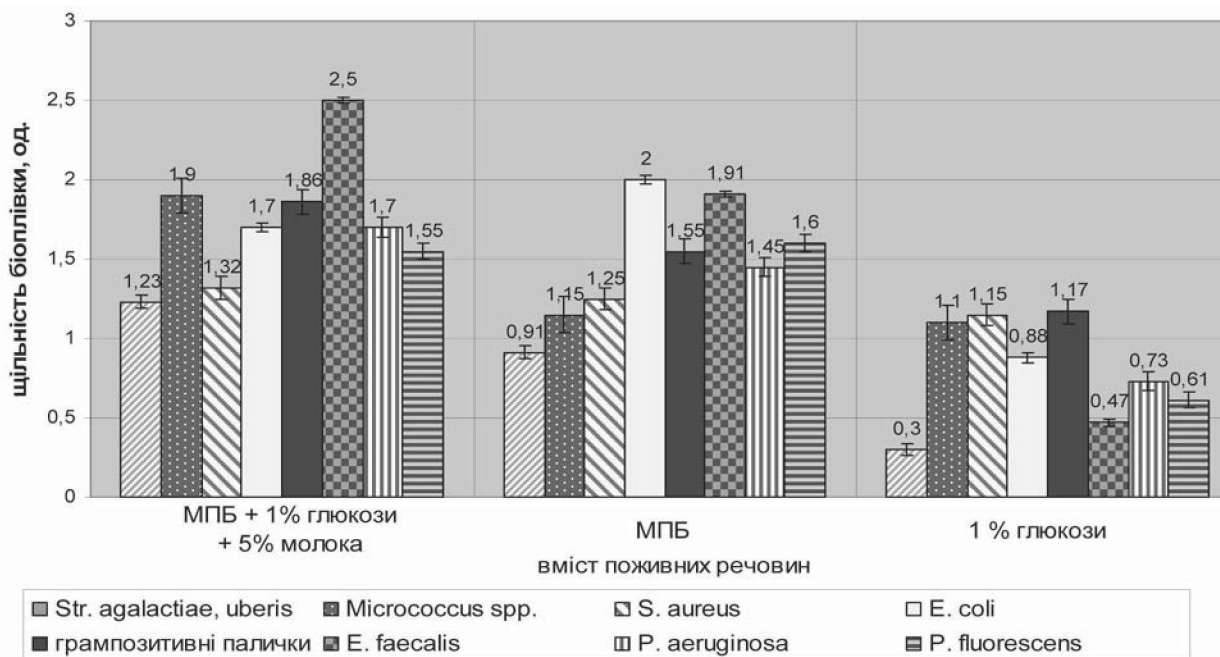


Рис. Вплив поживних речовин на формування мікробних біоплівки на абіогенних поверхнях

Як видно з рис. наявність у середовищі тільки білків (МПБ) дає можливість мікроорганізмам формувати біоплівки високої щільності протягом 18–24 год, крім бактерій роду *Streptococcus*, які формували за даних умов біоплівки середньої щільності. Щільність сформованих біоплівки у бактерій родів *Streptococcus*, *Enterococcus* та *Micrococcus* за наявності білків (МПБ) зменшувалася у 1,3–1,6 рази ($p \leq 0,01$), порівняно з контролем (МПБ, глюкоза, молоко).

На збідненому середовищі, тобто за вмісту лише вуглеводів і мінеральних речовин, мікроорганізми формували біоплівки нижчої щільності, порівняно з контролем. Так, щільність біоплівки у грамполозитивних паличок (*Corynebacterium*, *Lactobacillus*) і роду *Micrococcus* зменшувалася у 1,6–1,7 рази ($p \leq 0,001$), але при цьому сформовані біоплівки були високої щільності. Щільність сформованих біоплівки *Escherichia coli*, *P. aeruginosa* і *P. fluorescens* зменшувалася у 1,6–2,5 рази ($p \leq 0,001$) і вони були середньої щільності, а щільність біоплівки роду *Streptococcus* і *Enterococcus* зменшувалася у 4,1–5,3 рази ($p \leq 0,001$) і сформовані біоплівки були низької щільності, порівняно до середовища багатого на поживні речовини. Бактерії роду *Staphylococcus* виявилися єдиними, які в різних середовищах здатні формувати біоплівки однакової щільності.

Дані результати досліджень вказують, що наявність достатньої кількості поживних речовин (залишки молока) є сприяючим фактором у формуванні мікробних біоплівки високої щільності на поверхнях доїльного устаткування.

Під час санітарної обробки доїльного устаткування до 99,8 % мікроорганізмів, які присутні на поверхні обладнання, видаляються, лише незначна частина бактерій залишається. Залежно від умов вони можуть формувати мікробні біоплівки [11]. За попередніми результатами наших досліджень, усі мікроорганізми, які виділені з доїльного устаткування та молока сирого, у 24,3±3,71 % здатні формувати біоплівки високої щільності, у 61,5±4,16 % – середньої та у 14,2±1,82 % – низької щільності за оптимальних умов. Також встановлено, що за сучасної технології одержання та зберігання молока на доїльному обладнанні (за температури 30–37 °C) переважають мікробні біоплівки мезофільних мікроорганізмів, а на охолоджувачах (за температури 4–6 °C) – психротрофних мікроорганізмів.

На молочних фермах і в молочній промисловості основою санітарної обробки обладнання є санація поверхонь, що включає в себе як процес миття, тобто, очищення від органічних і неорганічних відкладень, які змішані з мікроорганізмами, так і, дезінфекцію – знищення бактерій, які можуть бути основною причиною утворення біоплівки. Як показали вище наведені результати наших досліджень та інших науковців [12], за наявності поживних речовин на поверхнях обладнання (незадовільна санітарна обробка) утворюються щільніші біоплівки, які містять більше екзополісахаридного шару (матриксу). Так, на абіогенних поверхнях у 75,0 % випадках утворювалися біоплівки високої щільності, у 16,7 % – середньої та у 8,3 % – низької. Тому, ефективна санітарна обробка доїльного устаткування є важливим заходом у запобіганні формування біоплівки високої щільності на його поверхні.

Висновки.

1. У збідненому середовищі, за вмісту лише вуглеводів і мінеральних речовин, мікроорганізми, які виділені з доїльного устаткування та молока сирого, формують у 1,6–4,1 рази частіше біоплівки низької щільності, порівняно з середовищем багатим на поживні речовини. Бактерії роду *Staphylococcus* є єдиними, які в різних середовищах здатні формувати біоплівки однакової щільності.

2. Ефективна санітарна обробка доїльного устаткування є важливим заходом у запобіганні формування біоплівки високої щільності на його поверхні.

Перспектива подальших досліджень полягає у розробці засобів, які здатні руйнувати мікробні біоплівки, що забезпечить ефективну санітарну обробку доїльного устаткування.

Список використаної літератури:

1. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety / [S. Marchand, J. D. Block, V. D. Jonghe and other] // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2012. – Vol. 11. – Issue 2. – P. 133–147.
2. 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.
3. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods / [H D. Kusumaningrum, G. Riboldi, W C. Hazeleger, R R. Beumer] // Int. J. Food Microbio. – 2003. – Vol. 85. – P. 227–236.
4. Food poisoning incidents in France in 1998 / S. Haeghebaert, F. Le Querrec, V. Vaillant and other // Bull Epidemiol Hebdomad. – 2001. – P. 65–70.

5. 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.
6. The growth of *Bacillus stearothermophilus* on stainless steel / [S. Flint, J. Palmer, K. Bloemen and other] // J. Appl Microbiol. – 2001. – Vol. 90(2). – P. 151–157.
7. Microbial biofilms: Problems of control. Community structure and cooperation in biofilms / [Allison D. G., Gilbert P., Lappin – Scott H., Wilson M.] // Cambridge University Press. – 2000. – P. 309–327.
8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Design and performance of systems for cleaning product-contact surfaces of food equipment: a review / D. G. Dunsmore, A. Twomey, W. G. Whittlestone, H. W. Morgan // Journal of Food Protection. – 1981. – Vol.44. – P. 220–240.
12. Rochex A. Effects of nutrients on biofilms formation and detachment of *Pseudomonas putida* strain isolated from a paper machine / A. Rochex, J. M. Lebeault // Water Res. – 2007. – Vol.41. – P. 2885–2892.

ФОРМИРОВАНИЕ МИКРОБНЫХ БИОПЛЕНОК НА ДОИЛЬНОМ ОБОРУДОВАНИИ ПРИ НАЛИЧИИ МОЛОЧНЫХ ОСТАТКОВ В УСЛОВИЯХ IN VITRO / Н. Д. Кухтин, Ю. Б. Перкий, Е. М. Кривохижа

*Установлено, что в бедной среде, при содержании только углеводов и минеральных веществ, микроорганизмы, выделены из доильного оборудования и молока сырого, формируют в 1,6–4,1 раза чаще биопленки низкой плотности по сравнению со средой богатой питательными веществами. Бактерии рода *Staphylococcus* являются единственными, которые в различных средах способны формировать биопленки одинаковой плотности. Эффективная санитарная обработка доильного оборудования является важным мероприятием в предотвращении формирования биопленок высокой плотности на его поверхности. Понимание взаимодействия различных факторов, которые влияют на бактериальную адгезию и формирование биопленок, является важным фактором в выборе стратегий, чтобы управлять и бороться с микробными биопленками на оборудовании.*

Ключевые слова: микробные биопленки, формирования, питательные вещества, доильное оборудование.

MICROBIAL BIOFILMS FORMATION IN THE PRESENCE MILKING EQUIPMENT DAIRY RESIDUES IN THE IN VITRO / M. D. Kuchtyan, Yu. B. Perkiy, J. M. Krivokhizha

*Depleted environment by containing only carbohydrates and minerals, microorganisms that allocation of milking equipment and raw milk, formed in 1,6–4,1 times more biofilm low density compared to medium rich in nutrients is found. Bacteria of the genus *Staphylococcus* are the only ones which are able to form different environments biofilm identical density. An efficient sanitizing milking equipment is an important measure in preventing the formation of biofilms, high density on the surface. Understanding the interaction of various factors affecting bacterial adhesion and formation of biofilms is an important factor in the choice of strategies to manage and deal with microbial biofilms on equipment are summarized.*

Keywords: microbial biofilm, formation, nutrients, milking equipment.

Рецензент – доктор ветеринарных наук Я. С. Стравський
Рукопис надійшов 14.07.2014 року.