

**ФОРМУВАННЯ ЗМІШАНИХ БІОПЛІВОК МІКРООРГАНІЗМАМИ,
ЯКІ ВИДІЛЕНІ З ДОЇЛЬНОГО УСТАТКУВАННЯ ТА МОЛОКА СИРОГО****Кухтин М.Д., Перкій Ю.Б.**Тернопільська державна сільськогосподарська дослідна станція Інституту кормів та сільського господарства Поділля НААН,
м. Тернопіль**Крушельницька Н.В.**

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, м. Львів

Мікроорганізми у природі можуть перебувати у двох формах існування – це поодинокі клітини (планктонні бактерії або вільно плаваючі утворення) і у біоплівці. Встановлено, що там де виявлено одну планктонну бактерію, там є близько 1000 мікроорганізмів, сформованих у біоплівки. 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. Матрикс – це суміш екзополісахаридів, білків, нуклеїнових кислот та інших неорганічних речовин, який захищає бактерії від факторів навколишнього середовища. Біоплівки на поверхні устаткування можуть бути утворені одним видом мікроорганізмів, тобто монобіоплівки, але зазвичай це змішані мікробні біоплівки декількох видів чи родів бактерій, які формують один шар або багатшарові структури [1].

Важливий чинник мікробного обсіяння молока та молочних продуктів у молочній промисловості, на який недостатньо звертають увагу, є мікробні біоплівки. У процесі отримання, зберігання та переробки молока частина мікроорганізмів знаходиться на поверхні обладнання у біоплівках [2, 3, 4].

Мікроорганізми одного виду колонізують поверхню, утворюючи біоплівку, а їх екзополісахаридний шар сприяє кращій адгезії інших бактерій з наступним утворенням змішаних біоплівок. Так, *Pseudomonas fragi* та *Flavobacterium spp.* сприяють прикріпленню та утворенню біоплівки *Listeria monocytogenes* [5, 6], а *P. fluorescens* – прикріпленню *B. cereus* [2]. Однак, може бути й інша ситуація, коли мікроорганізми, які перші колонізували поверхню, у процесі конкуренції за субстрати продукують побічні токсичні продукти життєдіяльності, що сприяють формуванню тільки монобіоплівки [7].

Різноманітність у мікробних біоплівках призводить до цілого ряду складних міжвидових і внутрішньовидових взаємодій у бактерій [8, 9]. Змішані біоплівки різних видів у декілька разів метаболічно активніші, володіють більшою комбінованою стабільністю та є стійкіші до антибактеріальних препаратів, ніж монобіоплівки [2, 10, 11].

Ряд авторів [12] встановили, що спільне культивування *Lactococcus lactis spp. cremoris* і *Pseudomonas fluorescens* в охолодженому молоці призводило до утворення змішаних біоплівок, які краще розвивалися, ніж біоплівки кожного окремого виду. Бактерії *P. fluorescens* споживали багато кисню у біоплівці, що сприяло кращому розвитку факультативних анаеробів *L. lactis*. Натомість *L. lactis* виділяли молочну кислоту, яку використовували *P. fluorescens*, як джерело живлення. Ці взаємовідносини створювали сприятливі умови для розвитку та збільшення кількості *P. fluorescens* та *L. lactis* у змішаній біоплівці.

При отриманні та переробці молока на поверхнях устаткування мікробні біоплівки формуються з бактерій, які є на даних поверхнях та потрапляють на них з молока, а саме *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomonas spp.*, *Enterococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Micrococcus spp.*, грампозитивні палички та інші.

Метою роботи було вивчити здатність формувати змішані біоплівки мікроорганізмами, які виділені з доїльного устаткування та молока сирого.

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

Мікробіологічні дослідження молока та змивів із доїльного устаткування проводили у відповідності з загальноприйнятими вимогами [13, 14, 15]. У досліді використали штами мікроорганізмів, які були виділені з доїльного устаткування та молока сирого, а саме: *Staphylococcus spp.* (сапрофітні види), *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus spp.*, *Str. agalactiae*, *Enterococcus spp.*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, грампозитивні палички (*Lactobacillus spp.*).

Для визначення здатності мікроорганізмів формувати біоплівки у стерильні одноразові пластикові чашки Петрі вносили 5 см³ м'ясопептонного бульйону та 1 см³ добової культури або суміші культур мікроорганізмів у концентрації 10⁸ КУО/см³ та інкубували за температури 30 °С протягом 24–48 год. Після інкубації чашки триразово промивали фосфатним буфером від планктонних (неприкріплених) мікроорганізмів, 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 [16].

Для визначення щільності утворених біоплівок вирощені біоплівки фарбували розчином 0,1% кристалічного фіолетового протягом 10 хв. У чашки Петрі додавали 3 см³ 96% етилового спирту, добре їх промивали. Вимірювали оптичну густину промивного розчину спирту спектрофотометрично за довжини хвилі 570 нм [16]. За оптичної густини промивного розчину з чашок Петрі 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.

Результати досліджень. Нами було проведено вивчення формування змішаних біоплівок мікроорганізмами, які виділені з молока сирого та доїльного устаткування. Результати досліджень наведено у таблиці.

Як видно з таблиці, у варіантах досліду № 1–№ 4 щільність змішаних біоплівок була значно меншою, порівняно з щільністю біоплівок даних мікроорганізмів, вирощених у монокультури, що свідчить про певні антагоністичні властивості між бактеріями. При мікроскопічних дослідженнях змішаних біоплівок у чашках Петрі виявлено, що у полі зору переважали грамнегативні палички, тобто бактерії *E. coli* та *P. aeruginosa*, що свідчить про наявність пасивних антагоністичних властивостей даних мікроорганізмів до інших культур.

У варіантах № 5–№ 8 оптична густина промивних розчинів із змішаних біоплівок була більшою, ніж оптична густина промивних розчинів з монобіоплівок, що є свідченням утворення щільнішої біоплівки та певних синергічних властивостей між бактеріями. У мазках варіантів № 5 і № 8 у біоплівках переважали бактерії *P. aeruginosa*, у мазках варіантів № 6 і № 7 переважали кокові форми мікроорганізмів, а також зустрічалися ділянки де кількість бактерій *Enterococcus spp.*, грампозитивних паличок і *Ent. agglomerans* була практично однаковою.

Незважаючи на певні антагоністичні властивості між мікроорганізмами, лише у дослідних варіантах № 3 і № 4 спостерігали формування біоплівок середньої щільності, у решти шести варіантах формувалися біоплівки високої щільності.

**Розділ 8. Ветеринарна фармакологія та токсикологія. Якість і безпечність продуктів тваринництва.
Ветеринарно-санітарна експертиза. Екологічна та хімічна безпека**

Таблиця – Формування змішаних біоплівків мікроорганізмами, які виділені з молока сирого та доїльного устаткування, М±m, n=93

Варіанти дослідів, №	Види, роди мікроорганізмів	Щільність біоплівків, од.	
		монокультура	змішані культури
1	<i>Staphylococcus spp.</i> (сапрофітні)	1,73±0,22	1,11±0,14
	<i>P. aeruginosa</i>	1,07±0,13	
2	<i>Staphylococcus spp.</i> (сапрофітні)	1,73±0,20	1,20±0,04
	Грампозитивні палички	0,57±0,04	
	<i>E. coli</i>	0,78±0,06	
3	<i>Micrococcus spp.</i>	0,92±0,10	0,67±0,02
	Грампозитивні палички	0,57±0,04	
	<i>E. coli</i>	0,78±0,06	
4	<i>Str. agalactiae</i>	0,47±0,02	0,72±0,02
	Грампозитивні палички	0,58±0,03	
	<i>E. coli</i>	0,78±0,06	
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	0,98±0,07	1,17±0,04
	Грампозитивні палички	0,53±0,03	
	<i>P. aeruginosa</i>	1,07±0,09	
6	<i>Enterococcus spp.</i>	1,5±0,11	1,90±0,11
	Грампозитивні палички	0,53±0,03	
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	0,63±0,05	
7	<i>Enterococcus spp.</i>	1,50±0,08	1,72±0,05
	<i>Micrococcus spp.</i>	0,75±0,08	
	Грампозитивні палички	0,57±0,04	
8	<i>Str. agalactiae</i>	0,47±0,02	1,25±0,02
	<i>P. aeruginosa</i>	1,07±0,06	
	Контроль	0,08±0,02	

Отже, результати досліджень вказують, що на доїльному устаткуванні та молочному інвентарі формуються як моно-, так і змішані мікробні біоплівки різних видів і родів бактерій. У біоплівках можуть співіснувати різні патогенні мікроорганізми та патогенні мікроорганізми та сапрофітні.

Висновки. На поверхні доїльного устаткування та молочного інвентаря формуються змішані біоплівки з переважаючим умістом мікроорганізмів видів *P. aeruginosa*, *E. coli* та *Enterococcus spp.*

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

Список літератури

1. An overview of biofilm formation in distribution systems and its impact on the deterioration of water quality [Text] / MNB. Momba [at al.] // Water SA. – 2000. – Vol. 26. № 1. – P. 59–66.
2. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate [Text] / D. Lindsay [at al.] // J. Appl. Microbiol. – 2002. – Vol. 92(2). – P. 352–361.
3. Brooks, J.D. Biofilms in the food industry: problems and potential solutions [Text] / J.D. Brooks, S.H. Flint // Intl. J. Food Sci. Technol. – 2008. – Vol. 43(12). – P. 2163–2176.
4. Mittelman, M.W. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations [Text] / M.W. Mittelman // J. Dairy Sci. – 1998. – Vol. 81(10). – P. 2760–2764.
5. Zottola, E.A. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? [Text] / E.A. Zottola, K.C. Sasahara // Intern. J. Food Microbiol. – 1994. – Vol. 23. – P. 125–148.
6. Bremer, P.J. Survival of *Listeria monocytogenes* attached to stainless steel surfaces in the presence or absence of *Flavobacterium spp.* [Text] / P.J. Bremer, I. Monk, C.M. Osborne // J. Food Prot. – 2001. – Vol. 64(9). – P. 1369–1376.
7. Marsch, P.D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes [Text] / P.D. Marsch // Microbiol. – 2003. – № 149. – P. 279–294.
8. Berry, D. Microbial ecology of drinking water distribution systems [Text] / D. Berry, C. W.Xi, L. Raskin // Curr. Opin. Biotechnol. – 2006. – Vol. 17(3). – P. 297–302.
9. Evolution of species interactions in a biofilm community [Text] / S.K. Hansen [at al.] // Nature. – 2007. – Vol. 445(7127). – P. 533–536.
10. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilm [Text] / M. Burmolle [at al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72(6). – P. 3916–3923.
11. In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members [Text] / S. Moller [at al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – Vol. 64(2). – P. 721–732.
12. Interactions in biofilms of *Lactococcus lactis ssp cremoris* and *Pseudomonas fluorescens* cultured in cold UHT milk [Text] / J. Kives [at al.] // J. Dairy Sci. – 2005. – Vol. 88(12). – P. 4165–4171.
13. ГОСТ 9225-84. Молоко и молочные продукты. Методы микробиологического анализа. Взамен ГОСТ 9225-68 [Текст]. – Введ. 01.01.86. – М. : Изд-во стандартов, 1984. – 25 с.
14. Молоко і молочні продукти. Готування проб і розведення для мкробіологічного дослідження [Текст] : ДСТУ IDF 122С:2003. – [Чинний від 2005-01-01]. – К. : Держспоживстандарт України, 2005. – 12 с. – (Нац. стандарт України).
15. Определитель бактерий Берджи [Текст] : в 2 т. / под ред. Дж. Хоулта [и др.] ; пер. с англ. – 9-е изд. – М. : Мир, 1997. – 799 с.
16. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation [Text] / S. Stepanovic [at al.] // J. Microbiol. Methods. – 2000. – Vol. 40. – P. 175–179.

FORMATION OF MIXED BIOFILMS OF MICROORGANISMS ISOLATED FROM MILKING EQUIPMENT AND RAW MILK

Kuchtyn M.D., Perkiy Yu.B.

Ternopil state agricultural experimental station Institute of feed research and agriculture of Podillya, Ternopil

Krushelnytska N.V.

State Research Control Institute of Veterinary Preparations and Fodder Additives, Lviv

*Results of research ability to form mixed biofilm microorganisms are isolated from the milking equipment and raw milk are presented. It was established that on the surface of milking equipment the mixed biofilms are formed with prevailing content of microorganisms of species of *P. aeruginosa*, *E. coli* and *Enterococcus* of spp.*