

Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя

**ВПЛИВ МИЙНОГО ЗАСОБУ «ЕНЗИМИЙ» НА МІКРОБНІ БІОПЛІВКИ
ENTEROCOCCUS FAECALIS TA ESCHERICHIA COLI**

Після незадовільної санітарної обробки технологічного устаткування молокопереробних підприємств на його поверхнях залишаються молочні залишки, які є добрим поживним середовищем для розвитку мікроорганізмів. Для боротьби з бактеріями Enterococcus faecalis та Escherichia coli, які сформовані у біоплівки, нами розроблено рідкий ензимний мийний засіб «Ензимий», який здатний руйнувати екзополісахаридний матрикс. Результати попередніх досліджень показали, що

© О. Ю. Шинкарук, М. Д. Кухтин

*Науковий керівник – д. вет. н., професор М. Д. Кухтин

найоптимальніша протеолітична активність засобу проявляється за температури робочого розчину 60°C, рН 8,35 од. і твердості води 0,357–0,714 мг-екв/л.

Встановлено, що оптична щільність мікробних біоплівки *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli* зменшується при збільшенні температури ензимного засобу і його тривалості дії, що призводить до руйнування біоплівки.

Найбільш активною до мікроорганізмів у біоплівках була концентрація ензимного засобу 0,01 % за температури 60 °С і тривалості дії засобу 60 хв., при цьому оптична щільність біоплівки вважається низькою.

Ключові слова: мікробні біоплівки, матрикс, позаклітинні полімерні речовини, ензими, деградація, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*.

Постановка проблеми

Мікроорганізми у біоплівках є джерелом обсіменіння молока і молочних продуктів та зниження їх безпечності, це пояснюється тим, що вони виявляються у сотні й тисячі разів стійкішими до антибактеріальних і дезінфікуючих препаратів, порівняно з тими ж бактеріями поза біоплівками.

Бактеріальне псування продуктів є серйозною проблемою у харчовій промисловості. Наукові дослідження останніх років доводять, що більшість бактерій існує не у вигляді планктонних клітин, а у вигляді специфічно організованих структур – біоплівки, які здатні виживати на поверхні технологічного обладнання молокопереробних підприємств. Біоплівка – мікробне угруповання одного або декількох видів чи родів бактерій, прикріплених до субстрату біогенного чи абіогенного походження та оточена екзополісахаридним матриксом (позаклітинна полімерна речовина), який за формою нагадує «вежі» або «гриби». Біоплівка включає зазвичай 15–20 % бактеріальної маси, що міцно прикріпилася до тієї чи іншої поверхні, і 80–85 % захисного матриксу [1, 2].

До складу матриксу входять поліцукриди, структурні білки, екзоферменти, глікопротеїни, гліколіпіди, нуклеїнові кислоти, уранові кислоти та інші [3]. У глибині матриксу проходять водні канали, через які здійснюється постачання киснем, поживними речовинами та видалення побічних продуктів життєдіяльності бактерій [4]. Якісний і кількісний склад екзополімерного матриксу неоднорідний і залежить від видів мікроорганізмів, що формують біоплівку, і від умов, у яких ці біоплівки утворюються [5].

Матрикс біоплівки завдяки своєму складу та будові формує оптимальне мікросередовище для існування клітин мікроорганізмів і виконує наступні функції: забезпечує механічну стійкість біоплівки і захищає мікроорганізми від висихання; виконує роль бар'єру від несприятливих хімічних і біологічних впливів, сприяє сорбції та зберіганню поживних речовин і мікроелементів, забезпечує тісний контакт бактеріальних клітин один з одним, що полегшує обмін генетичним матеріалом між ними [6, 7].

Планктонні форми мають здатність швидко розмножуватися та розповсюджуватися, мікроорганізми у біоплівці цього не можуть робити, але виявляють високу стійкість до впливу несприятливих факторів середовища (таких як низькі або високі значення рН, висока осмотична сила, температура тощо).

Таким чином, біоплівки є основним фактором перехресного забруднення з поверхонь технологічного обладнання у продукти харчування. Використання ензимів для руйнування мікробних біоплівок у молочній промисловості є альтернативою майбутнього, так як класичне миття СІР-установок хімічними агентами не дає позитивних результатів.

Отже, одним із важливих завдань у технології виробництва молочних продуктів є забезпечення відмінного санітарного стану технологічного обладнання. Цього можна досягти, використовуючи засоби з ензимами, які здатні впливати на сформовану біоплівку та викликати її деградацію, але важливо при цьому враховувати її видовий склад та структуру позаклітинних полімерних речовин [8].

Аналіз останніх досліджень і публікацій

У молочній промисловості технологічне устаткування може бути контаміноване різними видами мікроорганізмів, серед яких зустрічаються *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli*.

Експериментальні дослідження, які проведені багатьма науковцями, показують, що 99,9 % бактерій ростуть у вигляді мікробних біоплівок.

У літературі наводяться дані щодо здатності протеолітичних ензимів впливати на бактерії у біоплівках, які сформовані на технологічному обладнанні молокопереробних підприємств [2, 8].

Нами було розроблено рідкий ензимний мийний засіб «Ензимий» для санітарної обробки СІР-установок на молочних підприємствах, у склад якого входять: калію гідроксид, комплексопи, протеолітичний ензим, стабілізатори, вода дистильована.

Мета, завдання та методика досліджень

Метою роботи було дослідити вплив різних концентрацій ензимного мийного засобу «Ензимий» у різних концентраціях на мікробні біоплівки, утворені штамами *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli*.

Дослідження проводили у лабораторіях Тернопільського національного технічного університету імені Івана Пулюя.

Для визначення щільності утворення біоплівок використовували стерильні одноразові пластикові чашки Петрі. У чашки вносили 5 см³ м'ясо-пептонного бульйону і 1 см³ добової культури мікроорганізмів у концентрації 10⁵ КУО/ см³ та інкубували за температури 37 °С протягом 24 год. Після інкубації чашки

триразово відмивали від планктонних клітин фосфатним буфером та висушували.

Для вивчення дії рідкого ензимного мийного засобу «Ензимий» на мікробні біоплівки, після висушування вносили засіб у концентраціях 0,1 %, 0,07 %, 0,05 %, 0,03 %, 0,01 %, 0,008 % витримували за температури 20, 40, 60°C і за часу 15, 30, 60, 70 хв. За контроль брали дистильовану воду.

Потім відмивали фосфатним буфером, висушували та фіксували біоплівки 96° етиловим спиртом протягом 10 хв. Після цього фарбували розчином кристалічного фіолетового протягом 10 хв., знову промивали фосфатним буфером, висушували та додавали 5 см³ – 96° етилового спирту і визначали оптичну щільність біоплівки спектрофотометрично при довжині хвилі 570 нМ [9].

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 сформованої біоплівки вважали високою.

Результати досліджень

Для того, щоб визначити найоптимальнішу концентрацію засобу «Ензимий» щодо руйнування біоплівок сформованими бактеріями *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli*, ми на першому етапі досліджень вивчили вплив засобу за різних концентрацій розчинів при температурі 40 °C та часі його дії упродовж 30 хв. Результати наведено на рис. 1.

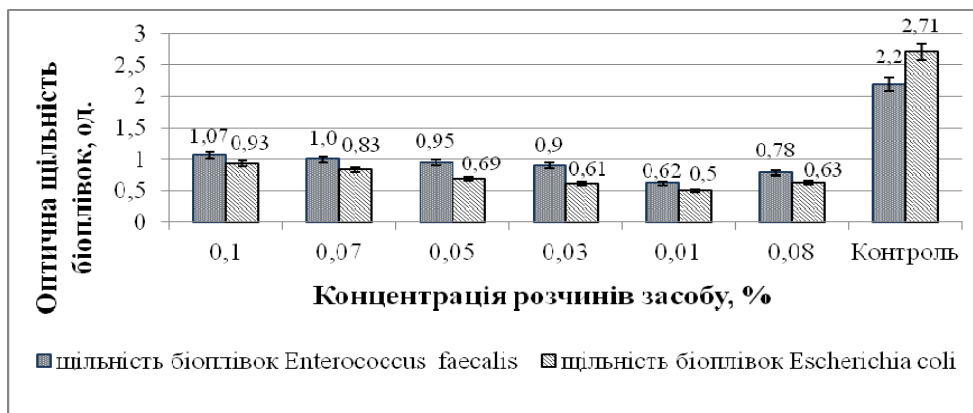


Рис. 1. Вплив засобу «Ензимий» за різних концентрацій розчинів при температурі 40±1 °C та часу дії 30 хв. на мікробні біоплівки *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli*

Як видно із рис. 1, мийний засіб «Ензимий» руйнує мікробні біоплівки *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli* і ефективність цієї деградації залежить від концентрації розчинів. Найоптимальніша дія засобу на біоплівки

проявляється за концентрації 0,01 %, за якої оптична щільність біоплівки знижується в 3,5 раза у *Enterococcus faecalis* та в 5,4 раза у *Escherichia coli* і становить 0,62 од. і 0,5 од. відповідно. Зниження концентрації засобу до 0,008 % зумовило зменшення у середньому в 1,25 раза його активності, щодо мікробних біоплівок *Enterococcus faecalis* та *Escherichia coli*, порівняно з концентрацією 0,01 %.

Таким чином, проведені дослідження вказують на те, що рідкий ензимний мийний засіб «Ензимий», відносно руйнування мікробних біоплівок грампозитивних і грамнегативних бактерій, найефективніший за концентрації 0,01 %. Тому для подальших досліджень з метою визначення оптимальної температури та часу його застосування використовували 0,01 % концентрацію.

Результати досліджень впливу засобу на мікробні біоплівки залежно від температури робочих розчинів наведено на рис. 2.

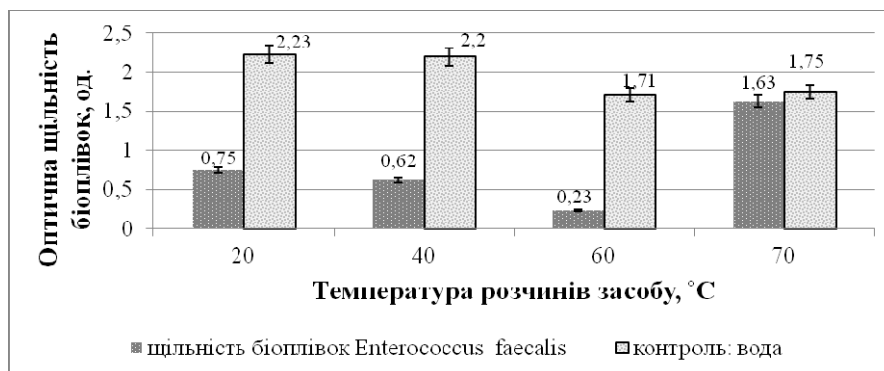


Рис. 2. Вплив 0,01 % концентрації розчинів засобу «Ензимий» за різних температур використання та часу дії 30 хв. на мікробні біоплівки *Enterococcus faecalis*

Як видно із даних рис. 2, з підвищенням температури розчинів засобу «Ензимий» відбувається збільшення його ефективності щодо руйнування мікробних біоплівок *Enterococcus faecalis*.

За температури 20 °C дія засобу сприяла руйнуванню біоплівки *Enterococcus faecalis* і її щільність знижувалася в 3 раза, порівняно з контролем за такої самої температури. Використання засобу за температури 40 °C, підвищило його ефективність, як наслідок щільність біоплівки знижувалася в 3,5 раза до 0,62 од. і відносилася до середньої щільності. Підвищення температури розчину мийного засобу до 60 °C призводить до найбільшої деградації біоплівки і її щільність зменшувалася в 7,4 раза і вона ставала слабкою. Подальше підвищення температури розчину «Ензимію» до 70 °C не спричиняло руйнування біоплівки і її щільність

була практично однакова, як у контролі. Це пов'язано з тим, що висока температура інгібує ензим наявний у складі мийного засобу «Ензимий» [10].

Практично аналогічні результати досліджень отримали щодо впливу розчинів засобу «Ензимий», за різних температур на біоплівки сформовані *Escherichia coli* (рис. 3). Відмінність полягає тільки у тому, що *Escherichia coli* формує щільніші біоплівки, проте їх деградація засобом «Ензимий» відбувається краще, порівняно з біоплівками сформованими *Enterococcus faecalis*. Так, за температури 20 °С, розчини «Ензимию» знижували щільність біоплівки в 5,12 раза, порівняно з контролем, а за температури 40 °С – у 5,7 раза і біоплівка ставала слабкою. В той же час, за цієї температури біоплівки *Enterococcus faecalis* руйнувалися, але були середньої щільності. За температури 60 °С щільність біоплівки *Escherichia coli* знижувалася у 8,0 разів і вона ставала слабкою. Температура розчинів засобу 70 °С не впливала на біоплівки *Escherichia coli*.

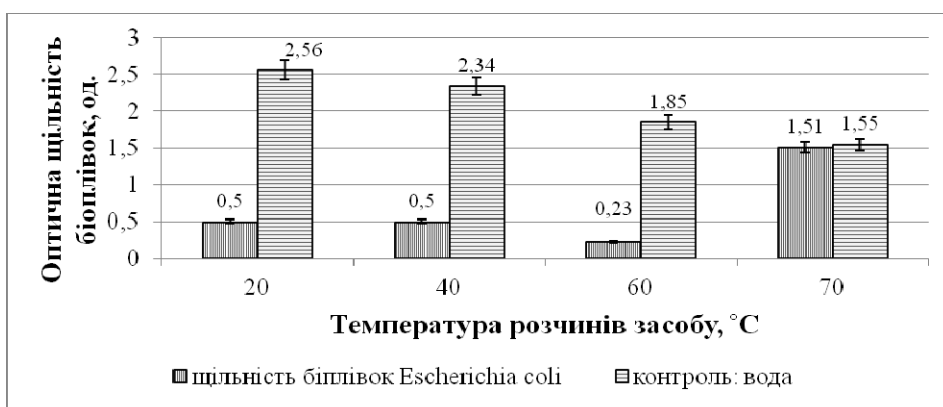


Рис. 3. Вплив 0,01 % концентрації розчинів засобу «Ензимий» за різних температур використання та часу дії 30 хв. на мікробні біоплівки *Escherichia coli*

Таким чином, із наведених досліджень на рис. 2 і 3 випливає, що оптимальна температура, за якої найефективніше руйнуються біоплівки *Escherichia coli* і *Enterococcus faecalis* 0,01 % розчином «Ензимию», становить 60 °С. Цю температуру було застосовано для подальших досліджень з вибору часу дії розчинів засобу «Ензимий».

Результати досліджень впливу 0,01 % концентрації засобу «Ензимий» за температури 60 °С упродовж різного часу дії на біоплівки *Enterococcus faecalis* і *Escherichia coli* наведено на рис. 4 і 5.

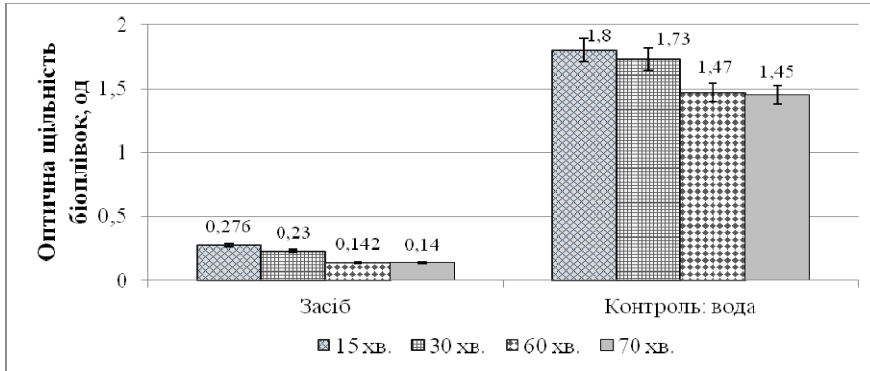


Рис. 4. Вплив 0,01 % концентрації розчинів засобу «Ензимий» за температури 60 °С протягом різного часу дії на мікробні біоплівки *Enterococcus faecalis*

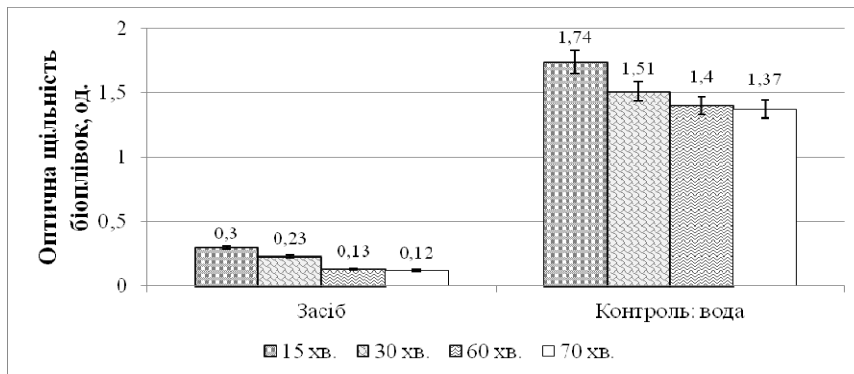


Рис. 5. Вплив 0,01 % концентрації розчинів засобу «Ензимий» за температури 60 °С протягом різного часу дії на мікробні біоплівки *Escherichia coli*

Дані рисунків 4 і 5 вказують на часозалежний ефект дії засобу «Ензимий», тобто із збільшенням експозиції відбувається сильніша деградація біоплівок, сформованих *Enterococcus faecalis* і *Escherichia coli*.

Практично уже за дії упродовж 15 хв. біоплівки ставали слабкими із щільністю 0,276 од. у *Enterococcus faecalis* і 0,300 од. у *Escherichia coli*. Збільшення експозиції засобу до 30 хв. не спричиняло суттєвого руйнування і зниження щільності біоплівок, порівняно з часом витримки 15 хв. За експозиції розчинів засобу упродовж 60 хв. щільність біоплівок знижувалася у *Enterococcus faecalis* в 1,9 раза і у *Escherichia coli* у 2,3 раза, порівняно з експозицією 15 хв. Збільшення тривалості впливу засобу до 70 хв. не забезпечувало вірогідного зниження щільності біоплівок, порівняно з експозицією 60 хв.

Отже, дані дослідження вказують, що оптимальний час дії мийного засобу «Ензимий» на мікробні біоплівки, сформовані *Enterococcus faecalis* і *Escherichia coli*, становить 60 хв.

Висновки та перспективи подальших досліджень

Встановлено, що розроблений ензимний засіб «Ензимий» найефективніше руйнує мікробні біоплівки, сформовані *Enterococcus faecalis* і *Escherichia coli* за концентрації розчинів 0,01 %, температури 60 °С і експозиції протягом 60 хв.

Перспективи подальших досліджень полягають у проведенні виробничих досліджень засобу «Ензимий» на молокопереробних підприємствах щодо санітарної обробки технологічного обладнання і розроблення режимів його застосування.

Література

1. Antibiotikorezistentnost' bioplenochnyh bakterij / I. V. Chebotar', A. N. Majanskij, E. D. Konchakova [et al.] // Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. – 2012. – V. 14, № 1. – P. 51–58.
2. Кухтин М. Д. Формування мікробних біоплівок на поверхнях різних матеріалів мікроорганізмами, які виділені з технологічного устаткування / М. Д. Кухтин, Ю. Б. Перкій, Н. В. Крушельницька // Вет. біотехнологія. – 2013. – № 22. – С. 292–297.
3. Flemming H. C. The biofilm matrix / H. C. Flemming, J. Wingender // Nat. Rev. Microbiol. – 2010. – № 8. – P. 623–33.
4. Donald R. M. Biofilm: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms / R. M. Donald, J. W. Costerton // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – № 5 (2). – P. 167–193.
5. Kolter R. Microbial sciences: the superficial life of microbes / R. Kolter, E. P. Greenberg // Nature. – 2006. – Vol. 441. – P. 300–302.
6. Yung-Hua Li. Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms / Yung-Hua Li, Xiaolin Tian // Sensors. – 2012. – № 12. – P. 19–38.
7. Davey M. E. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics / M. E. Davey, G. O'Tool // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2000. – 64, № 9. – P. 847–867.
8. Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry / Yannick Lequette, Gauthier Boels, Martine Clarisse, Christine Faille // Biofouling. – 2010. – Vol. 26, № 4. – P. 421–431.
9. 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.
10. Шинкарук О. Ю. Фізико-хімічні властивості дослідного варіанту рідкого ензимного мийного засобу для санітарної обробки устаткування у молочній промисловості / О. Ю. Шинкарук, М. Д. Кухтин, О. С. Покотило // Вісн. Херсонського нац. техн. ун-ту. – 2016. – Вип. 1. – С. 136–140.