

О. Ю. Шинкарук¹, М. Д. Кухтин¹, О. І. Вічко¹, О. В. Швед², Н Г. Марінцова²

¹Тернопільський національний технічний університет імені Івана Пулюя,
кафедра харчової біотехнології і хімії,

²Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук,
фармації та біотехнології

ХАРАКТЕРИСТИКА МИЙНОГО ЗАСОБУ “ЕНЗИМИЙ” ЗА ЗДАТНІСТЮ РУЙНУВАННЯ МІКРОБНИХ БІОПЛІВОК

© Шинкарук О. Ю., Кухтин М. Д., Вічко О. І., Швед О. В., Марінцова Н. Є., 2018

Наведено результати досліджень впливу різних концентрацій робочих розчинів ензимного засобу “Ензимий” на мікробні біоплівки *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Bacillus cereus*. Проведені дослідження вказують на те, що найоптимальніша дія засобу на біоплівки проявляється за концентрації 0,01 %, при цьому із підвищенням температури розчинів засобу “Ензимий” до 60 °С та експозиції 60 хв відбувається збільшення його ефективності щодо руйнування бактерій у біоплівках.

Ключові слова: мікробні біоплівки, ензими, деградація, оптична щільність, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*.

O. Shynkaruk¹, M. Kukhtyn¹, O. Vichko¹, O. Shved², N. Marintsova²

CHARACTERIZATION OF THE “ENZYMNYI” DETERGENT ACCORDING TO ABILITY OF MICROBIAL BIOFILMS DISRUPTION

© Shynkaruk O., Kukhtyn M., Vichko O., Shved O., Marintsova N., 2018

The article contains the results of the research on the influences of different concentrations of working solutions of the enzyme product “Enzymnyi” on microbial biofilms *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. Research showed that the optimal effect of the detergent on the biofilm is visible with a concentration of 0.01 %, at the same time, with the increasing of the temperature of the “Enzymnyi” detergent to 60 °C and the exposition of 60 minutes there is the increasing of its effectiveness in terms of the bacteria disruption in biofilms.

Key words: microbial biofilms, enzymes, degradation, optical density, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*.

Постановка проблеми. Виробництво високоякісних продуктів у молочній промисловості чітко залежить від мікробіологічної якості сировини та належної гігієни виробництва [1].

Бактерії, які присутні на поверхні технологічного обладнання, здатні адгезуватися і формувати мікробні біоплівки. У зв'язку з цим молекулярні механізми формування біоплівки у харчовій промисловості останніми роками привертають все більшу увагу. По-перше, патогенні мікроорганізми у біоплівках є основним джерелом забруднення молочних продуктів, які можуть

спричинити їх псування та знизити термін зберігання, що, своєю чергою, становить небезпеку для здоров'я людей. По-друге, наявність біоплівки у деяких випадках призводить до виробництва органічних кислот як продуктів розкладу, які викликають корозію металів [2].

Біоплівки є мікробними асоціаціями, що формуються із мікроорганізмів одного або кількох родів чи видів, які можуть перебувати в активному стані або спокої. Загальновідомо, що мікробні клітини, які обплутані матриксом біоплівки, характеризуються загальними закономірностями розвитку для кращої адгезії до поверхні та різняться функціональною активністю генів, що зумовлено спільним існуванням, на відміну від планктонних бактерій. Формування біоплівки дає можливість одноклітинним організмам приймати тимчасовий багатоклітинний спосіб життя, у якому “групова поведінка” полегшує виживання у несприятливих умовах, внаслідок чого збільшується стійкість до навколишнього середовища. Для адгезії мікроорганізмів до поверхні та утворення мікробних біоплівок необхідні певні умови, зокрема, наявність гідратного середовища і мінімальної кількості поживних речовин, відповідна температура, тиск рН-середовища, гідрофобні або гідрофільні властивості поверхні та відповідні бактеріальні структури (джгутики, фімбрії, пілі). Дослідженню біоплівок приділяється велика увага вчених різних галузей, зокрема і дослідників які займаються дезінфекцією технологічного обладнання молокопереробних підприємств. Це пов'язано з тим, що здатність технічно шкідливих і патогенних мікроорганізмів до формування біоплівок створює значні проблеми у молочній промисловості – зростає стійкість до дії антимікробних та дезінфекційних засобів під час проведення санітарної обробки [3, 4].

Аналіз останніх досліджень публікацій. Багатьма експериментальними дослідженнями встановлено, що найпоширенішими і найнебезпечнішими мікроорганізмами, які здатні утворювати мікробні біоплівки на поверхні технологічного устаткування молокопереробних підприємств, є: *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* [5, 6]. Формування біоплівки термофільних мікроорганізмів роду *Bacillus* у галузі молочної промисловості є однією з можливих причин забруднення молочних продуктів такими мікроорганізмами. У межах біоплівки *Bacillus cereus* існує у різних фізіологічних станах і здатний генерувати високостійкі і адгезивні спори, які підвищують резистентність бактерій до антимікробних препаратів або процедур очищення [7]. За останнє десятиріччя кількість захворювань, які викликані *Staphylococcus aureus* та їх асоціаціями, значно зросла, що також пов'язано із здатністю формувати біоплівки на поверхні молочного обладнання [8]. *Pseudomonas aeruginosa* завдяки своїй здатності до своєрідного формування біоплівки на поверхні деталей апаратів, які постійно контактують з молоком, надзвичайно стійкі до впливу мийно-дезінфікуючих засобів у прийнятних концентраціях. *Pseudomonas aeruginosa* можна вважати модельним організмом для вивчення розвитку біоплівки та її регуляції за допомогою детекції кворуму [9].

Наукові дослідження останніх років доводять неабияку актуальність ензимних засобів, які здатні спричинити деградацію бактерій у біоплівках [10].

Ми сконструювали ензимний мийний засіб, який дістав назву “Ензимий” для санобробки СІР-установок молокопереробних підприємств. Діючою речовиною засобу є ензими, стабілізатори та комплексоми.

Мета роботи – дослідити вплив різних концентрацій мийного засобу “Ензимий” на мікробні біоплівки, утворені штамами *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa*.

Виклад основного матеріалу і обговорення результатів. Визначення щільності утворення біоплівок проводили з використанням стерильних одноразових пластикових чашок Петрі з 5 см³ м'ясо-пептонного бульйону і 1 см³ добової культури мікроорганізмів. Вирощували протягом доби за

температури 37 °С. Після закінчення інкубації чашки тричі відмивали від планктонних (неприкріплених) клітин стерильним фосфатним буфером та висушували їх.

Для вивчення дії ензимного засобу на мікробні біоплівки після висушування вносили засіб у концентраціях 0,1, 0,07, 0,05, 0,03, 0,01, 0,008 % і витримували за температури 20, 40, 60 °С і часу 15, 30, 60, 70 хв. У контролі використовували стерильну дистильовану воду.

Потім відмивали фосфатним буфером. Чашки з біоплівками висушували та фіксували протягом 10 хв 96 ° спиртом етиловим та фарбували 0,1 % розчином кристалічного фіолетового. Потім ще раз промивали фосфатним буфером, далі висушували та додавали 5 см³ – 96° етилового спирту і визначали оптичну густину за довжини хвилі за спектрофотометрії – 570 нм.

За оптичної густини промивного розчину до 0,5 од. щільність одержаних біоплівок вважали низькою, від 0,5 до 1,0 од. — середньою і за густини більше як 1,0 од. щільність біоплівки вважали високою [6].

Для статистичної обробки результатів використовували варіаційну статистику (StatSoft Inc., USA). Застосовували непараметричні методи досліджень (критерії Уїлкоксона, Манна–Уїтні). Визначали середнє арифметичне (\bar{x}), стандартну похибку середньої величини (SE). Різницю між порівнюваними величинами вважали достовірною за $P < 0,05$.

Для того, щоб дослідити активність засобу “Ензимий” щодо руйнування біоплівок бактеріями *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* та *Bacillus cereus*, на першому етапі досліджень вивчали вплив засобу за 0,01 % концентрацій розчинів за температури 20, 40 та 60 °С і часу його дії упродовж 15, 30 і 60 хв. Результати показано на рис. 1.

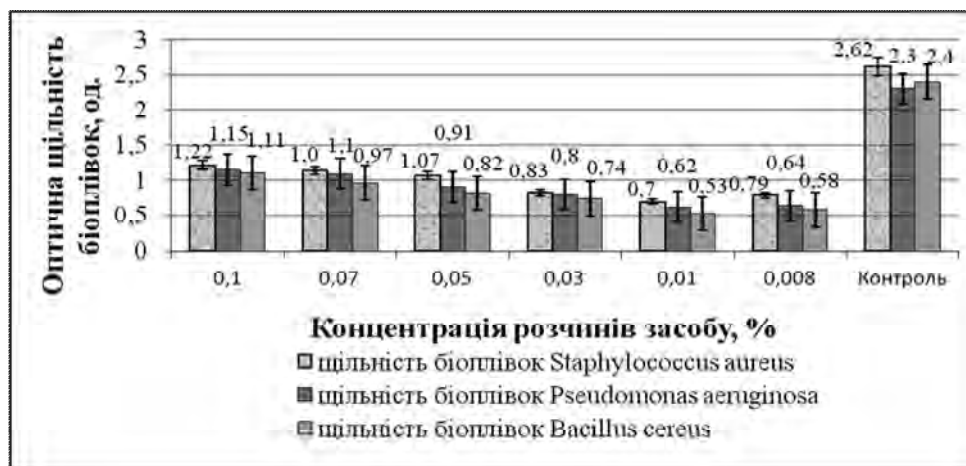


Рис. 1. Вплив засобу “Ензимий” за різних концентрацій розчинів за температури 40±1 °С, часу дії – 30 хв на мікробні біоплівки *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Bacillus cereus*

Як бачимо, мийний засіб “Ензимий” руйнує мікробні біоплівки *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Bacillus cereus* і ефективність цієї деградації залежить від концентрації розчинів. Найоптимальніша дія засобу на біоплівки проявляється за концентрації 0,01 %, за якої оптична щільність біоплівок знижується в 3,7 раза ($P < 0,05$) у *Staphylococcus aureus* і у *Pseudomonas aeruginosa*, в 4,5 раза ($P < 0,05$) у *Bacillus cereus* порівняно з контролем і знаходиться у межах 0,7–0,53 од., відповідно.

Отже, ензимний мийний засіб “Ензимий” щодо руйнування мікробних біоплівок бактерій, найефективніший за концентрації 0,01 %. Тому для подальших досліджень з метою визначення оптимальної температури та часу його застосування використовували 0,01 % концентрацію. Використання засобу “Ензимий” у низькій концентрації зумовлено тим, що ензими, додані до

засобу, є біокатализаторами, тобто, це коли самі ензими не споживаються під час процесу очищення, а один ензим викликає численні хімічні реакції [10].

Дані рис. 2 показали, що за температури 20 °С дія засобу сприяла руйнуванню біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* і її щільність знижувалася у 3,7 раза ($P < 0,05$), порівняно з контролем за такої самої температури. Використання засобу за температури 40 °С підвищило його ефективність і, як наслідок, щільність біоплівки знижувалася до 0,62 од. і відносилася до середньої щільності. Підвищення температури розчину мийного засобу до 60 °С призводить до найбільшої деградації біоплівки і її щільність зменшувалася в 4,4 раза ($P < 0,05$) і вона ставала слабкою. Подальше підвищення температури розчину “Ензимію” до 70 °С не спричиняло руйнування біоплівки, що пов’язано з тим, що висока температура інгібує ензим, наявний у складі мийного засобу “Ензимий” [10].

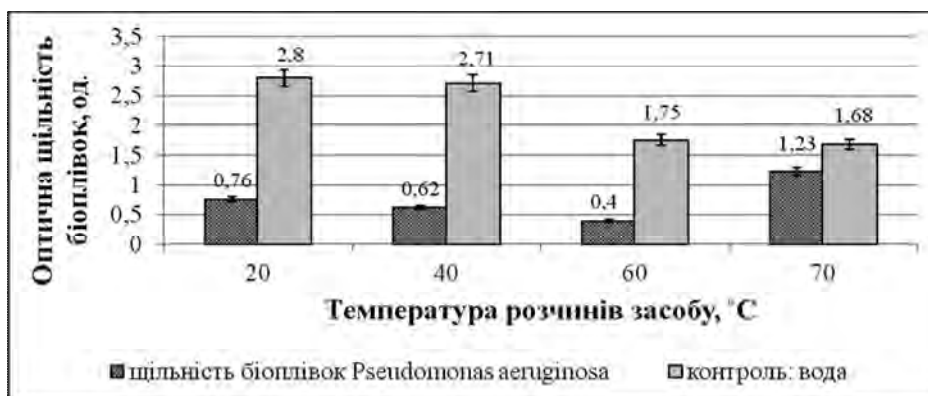


Рис. 2. Вплив 0,01 % концентрації розчинів засобу “Ензимий” за різних температур використання та часу дії 30 хв на мікробні біоплівки *Pseudomonas aeruginosa*

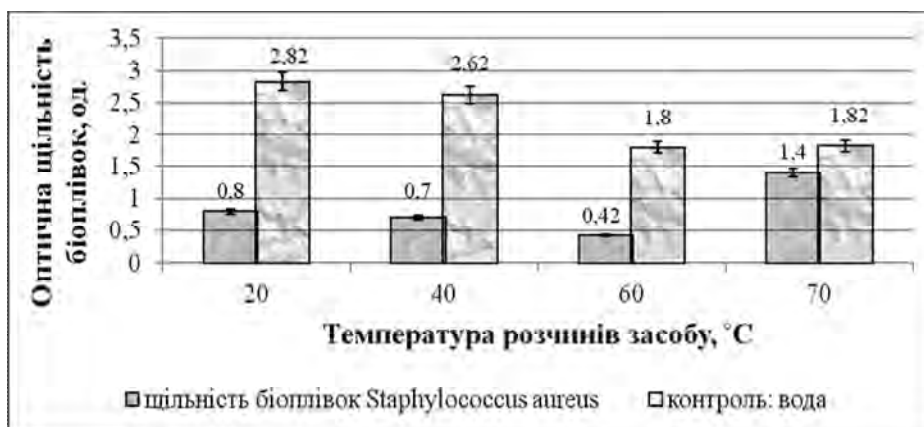


Рис. 3. Вплив 0,01 % концентрації розчинів засобу “Ензимий” за різних температур використання та часу дії 30 хв на мікробні біоплівки *Staphylococcus aureus*

Результати досліджень рис. 3 засвідчили, що золотистий стафілокок формував біоплівки високої щільності. За температури засобу “Ензимий” 20 °С оптична щільність біоплівок *Staphylococcus aureus* була у 3,5 раза ($P < 0,05$) меншою порівняно з контролем, але біоплівки за цієї температури руйнувалися слабо. Найкращою була температура розчину засобу “Ензимий” 60 °С, за якої щільність становила 0,42 од., що у 4,2 раза ($P < 0,05$) менше порівняно з контролем за такої самої температури.

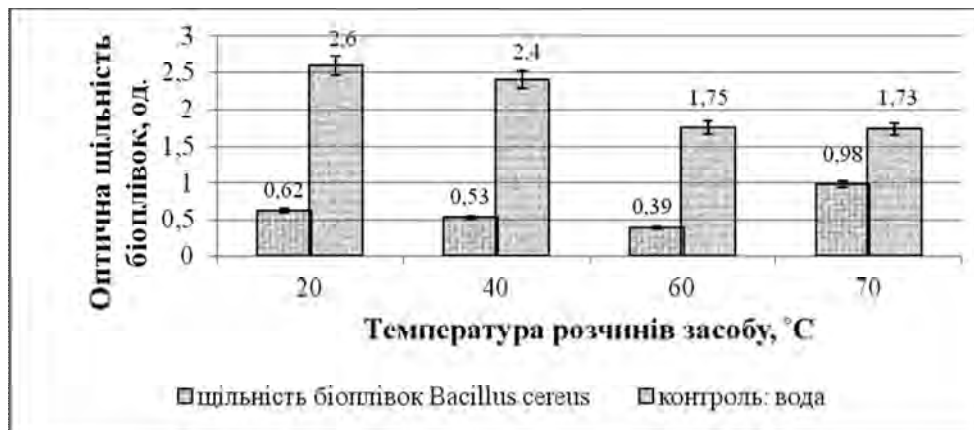


Рис. 4. Вплив 0,01 % концентрації розчинів засобу “Ензимий” за різних температур використання та часу дії 30 хв на мікробні біоплівки *Bacillus cereus*

Дані рис. 4 показали, що за температури засобу “Ензимий” 20 і 40 °C спорові форми мікроорганізмів у біоплівках *Bacillus cereus* руйнувалися, але були середньої щільності. За збільшення температури розчину засобу “Ензимий” до 60 °C щільність біоплівки становила 0,39 од., що у 4,5 раза ($P < 0,05$) менше порівняно із контролем. За температури 70 °C 0,01 % розчин засобу не впливав на біоплівки, що вказує на те, що високі температури роблять ензимний засіб неактивним [10].

Отже, бачимо, що із підвищенням температури розчинів засобу “Ензимий” відбувається збільшення його ефективності щодо руйнування мікробних біоплівки. Із наведених досліджень випливає, що оптимальна температура, за якої найефективніше руйнуються біоплівки *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* та *Bacillus cereus* 0,01 % розчином засобу “Ензимий”, становить 60 °C.

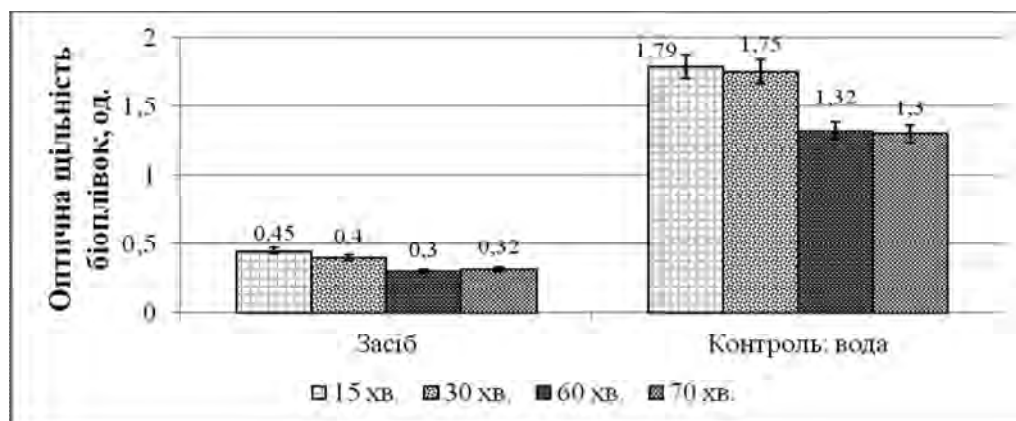


Рис. 5. Вплив 0,01 % концентрації розчинів засобу “Ензимий” за температури 60 °C протягом різного часу дії на мікробні біоплівки *Pseudomonas aeruginosa*

Як бачимо із рис. 5, протягом 15 хв дії засобу “Ензимий” на біоплівки *Pseudomonas aeruginosa* щільність біоплівки була в 1,02 раза більша, ніж протягом дії 30 хв та в 1,5 раза більша порівняно з дією протягом 60 хв. Щільність біоплівки за температури засобу 60 °C була найменшою і становила 0,3 од., що вказує на здатність руйнування вже утворених біоплівки.

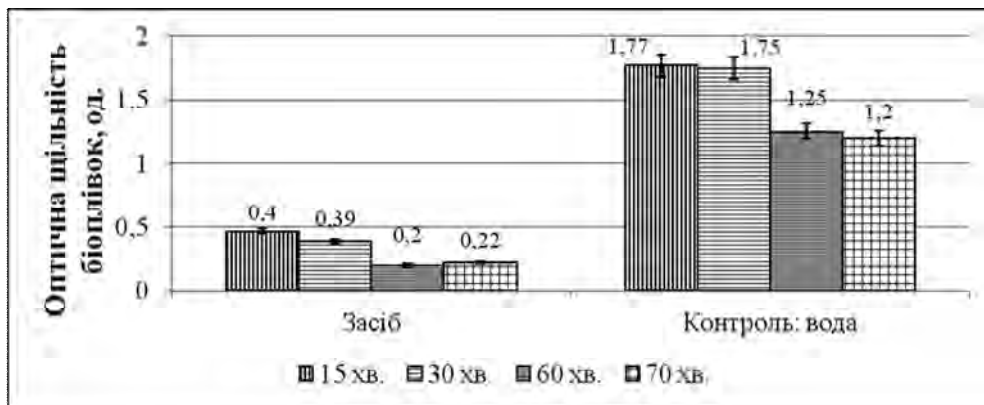


Рис. 6. Вплив 0,01 % концентрації розчинів засобу “Ензимий” за температури 60 °С протягом різного часу дії на мікробні біоплівки *Bacillus cereus*

Як бачимо з даних рис. 6, під час експозиції 60 хв відбувається істотне зменшення біоплівки *Bacillus cereus* і щільність становить 0,36 од., що у 1,4 раза менше порівняно з експозицією 15 хв. Після проведення впливу засобу “Ензимий” протягом 70 хв щільність біоплівок зменшується незначно, тому збільшення часу є недоцільним.

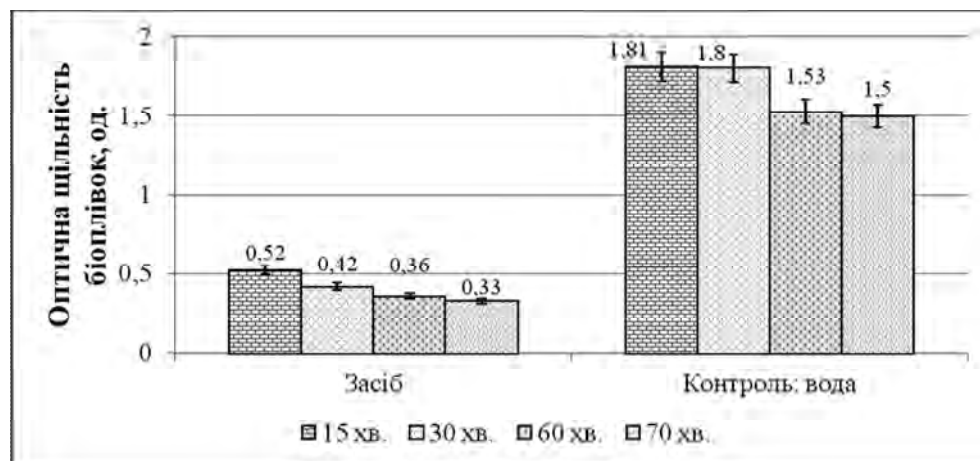


Рис. 7. Вплив 0,01 % концентрації розчинів засобу “Ензимий” за температури 60 °С протягом різного часу дії на мікробні біоплівки *Staphylococcus aureus*

Дані рис. 7 показують, що за дії засобу “Ензимий” за експозиції 30–60 хв, біоплівки руйнувалися краще, ніж за експозиції 15 хв, і їх оптична щільність знаходилася у межах 0,42–0,36 од. У той самий час за збільшення часу до 70 хв щільність мікробних біоплівок зменшилася неістотно, тому для збереження енерговитрат доцільно застосовувати час витримки 60 хв.

Отже, оптимальний час дії мийного засобу “Ензимий” на мікробні біоплівки, сформовані *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* та *Bacillus cereus*, становить 60 хв.

Висновки. Встановлено, що “Ензимий” найефективніше руйнує мікробні біоплівки, сформовані *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Bacillus cereus*, за концентрації розчинів 0,01 %, температури 60 °С і експозиції протягом 60 хв.

1. Дегтерев Г. П. Качество молока в зависимости от санитарного состояния доильного оборудования / Г. П. Дегтерев // Молочная промышленность. – 2000. – № 5. – С. 23–26.
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 // *Ветеринарна біотехнологія*. – Ніжин: ПП Лисенко М. М., 2013. – № 22. – С. 292–297.

3. Yung-Hua Li, Xiaolin Tian. *Quorum Sensing and Bacterial Social Interactions in Biofilms* // *Sensors*. – 2012. – N 12. – P. 19–38.

4. Davey M. E. *Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics [Text]* / M. E. Davey, G. O. O'Tool // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2000. – 64, N 9. – P. 847–867.

5. *Formation of biofilms on dairy equipment and the influence of disinfectants on them* / M. Kukhtyn, O. Berhilevych, K. Kravcheniuk, O. Shynkaruk, Y. Horiuk, N. Semaniuk // *Eastern-European Journal of Enterprise Technologies*. – 2017. – Vol. 5/11. – P. 26–33.

6. *The influence of disinfectants on microbial biofilms of dairy equipment* / M. Kukhtyn, O. Berhilevych, K. Kravcheniuk, O. Shynkaruk, Y. Horiuk, N. Semaniuk // “EUREKA: Life Sciences”. – 2017. – Vol. 5. – P. 11–17.

7. *Involvement of a pasteurizer in the contamination of milk by Bacillus cereus in a commercial dairy plant* / B. Svensson, A. Eneroth, J. Brendehaug, G. Molin, A. Christiansson // *J. Dairy Res.* – 2000. – Vol. 67. – P. 455–460.

8. *Quantitative analysis of survival of Staphylococcus aureus or Listeria innocua on two types of surfaces: Polypropylene and stainless steel in contact with three different dairy products* / N. Oulahal, W. Brice, A. Martial, P. Degraeve // *Food Cont.* – 2008. – Vol. 19. – P. 78–185.

9. *Alginate overproduction affects Pseudomonas aeruginosa biofilm structure and function* / M. Hentzer, G. M. Teitzel, G. J. Balzer, A. Heydorn, S. Molin, M. Givskov and M. R. Parsek // *J. Bacteriol.* – 2001. – Vol. 183 (18). – P. 5395–5401.

10. *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, N 4. – P. 421–431.