

Борьба с биопленками на молочных предприятиях

Канд. техн. наук **Б.В.МАНЕВИЧ**, д-р техн. наук **Ж.И.КУЗИНА**,
Е.Б.ХАРИТОНОВА
 ВНИИ молочной промышленности
Т.В.ОРЛОВА
 Мытищинский молочный завод

В соответствии с требованиями ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» любое пищевое предприятие обязано разработать, внедрить и поддерживать безопасные технологии производства продукции, основанные на принципах ХАССП. Работа предприятия по этой предупреждающей системе безопасности является управленческим инструментом защиты процессов производства пищевой (молочной) продукции от микробиологических, химических, физических и других рисков загрязнения. Микробиологическая опасность наступает в результате попадания и (или) развития в продукте патогенных микроорганизмов на всех стадиях производства и напрямую связана с безопасностью и качеством выпускаемой пищевой продукции.

В конце XIX в. рядом ученых-микробиологов разработан метод чистой культуры для выделения индивидуальных штаммов бактерий. Эти научные подходы и по сей день широко используются в микробиологии и дезинфектологии, но рост отдельных клеток «планктонных» бактерий в среде, богатой питательными веществами, значительно отличается от их существования в естественных условиях. С появлением в конце XX в. специальных методов микроскопии получены новые знания о жизнедеятельности микроорганизмов и сформировалось представление об организованном взаимодействующем сообществе микроорганизмов, получившем определение «биопленка». С развитием новейших визуальных методов молекулярного анализа, электронной и лазерной микроскопии теория биопленок, существовавших миллионы лет назад, сегодня получила научное подтверждение. Что же касается «планктонного» фенотипа бактерий, то он встречается преимущественно транзиторно, в минимальных количествах при перемещениях микробных клеток от одной поверхности к другой [1–3].

Известно, что 95–98 % всех бактерий существует в форме биопленок, образование которых представляет сложный биологический процесс. Формирование биопленок (или бактериальное обрастание) отмечено у большинства бактерий в природных, клинических и промышленных условиях. Считается, что основным условием (помимо присутствия самих микроорганизмов) для образования биопленки является наличие относительно твердой и увлажненной поверхности неорганического или органического происхождения. Биопленки развиваются на границе двух различных средовых фаз: жидкой и твердой (вода–твердая фаза), жидкой и газовой (вода–воздух), твердой и газовой. Биопленки обнаруживают преимущественно на твердых субстратах, погруженных в жидкости [1, 4].

Кроме бактерий одного вида, в биопленке могут содержаться разные типы микроорганизмов, например простейшие, грибы и водоросли. При этом каждый из микроорганизмов выполняет специализированные метаболические функции. Зрелые, уже сформированные биопленки могут содержать также покоящиеся или некультивируемые формы бактерий [4–6].

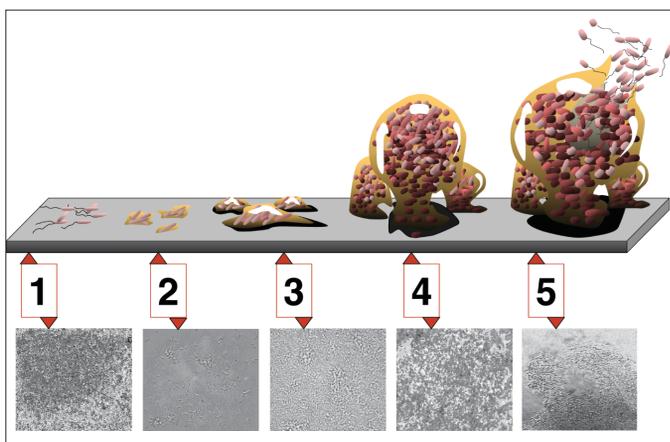
Биопленки – самая распространенная форма существования микроорганизмов, представляющая собой высокоадгезионное поверхностно-ассоциированное микробное сообщество, связанное защитным внеклеточным экзополимерным полисахаридным и гликопротеиновым матриксом. Способность формировать биопленки является составной частью жизненного цикла большинства микроорганизмов и успешной стратегией выживания и защиты микробов от неблагоприятных факторов среды [2].

Процесс формирования биопленки подразделяется на несколько этапов (см. рисунок). На первом этапе продолжительностью всего несколько минут происходит первоначальное закрепление (адгезия) того или иного микроорганизма (бактерии). Второй этап характеризуется окончательной адгезией (фиксацией) этого микроорганизма или разных их видов в течение 2–4 ч. На третьем этапе, протекающем 6–12 ч, происходят созревание, накопление питательных веществ и продуктов жизнедеятельности сообщества микроорганизмов, их деление. Четвертый этап может длиться 1 сут, в течение которых наблюдаются рост и образование зрелой биопленки в белково-полисахаридном каркасе. На пятом этапе наблюдаются дисперсия, выброс бактерий или их отделение (деление) [2, 4, 5].

Все больше накапливается доказательств, что выделенная чистая культура бактерий совпадает с биопленкой только по небольшому числу свойств. Когда бактерии переходят к формированию биопленки, процессы их биосинтеза радикально меняются. Клетки начинают синтезировать полимеры, защищающие их и связывающие между собой и с поверхностью. Кроме того, клетки (даже разных видов) обмениваются между собой информацией с помощью феромонов и других сигнальных молекул [4, 5, 7].

Сами бактерии составляют лишь 5–35 % биопленки, остальная часть – межбактериальный матрикс. Основная часть биопленки (65–85 %) представляет собой межбактериальный матрикс, состоящий из различных экзополисахаридов (декстрана, гиалуроновой кислоты, целлюлозы и др.), липидов, белков и нуклеиновых кислот, который защищает микроорганизмы от неблагоприятных физических, химических и биологических воздействий [1, 4, 7]. Химический состав матрикса неодинаков у разных групп микроорганизмов, но преимущественно представляет собой анионный полимер [7, 8].

Различные представления об отдельном («планктонном») существовании бактерий и в форме сообществ-биопленок безусловно определяют новые подходы к проведению санитарно-гигиенических мероприятий, использованию высоко-



Этапы формирования биопленок: 1 – первоначальное закрепление, адгезия; 2 – окончательная адгезия, фиксация; 3 – созревание, накопление питательных веществ, деление; 4 – рост и образование зрелой биопленки в белково-полисахаридном каркасе; 5 – дисперсия (выброс бактерий или отделение) [6]

эффективных способов и средств санитарной обработки. Возможно, этим объясняются расхождения в эффективности определенных дезинфектантов *in vitro* (тестирование с чистыми культурами микроорганизмов при проведении лабораторных исследований) и практических испытаний *in vivo* (дезинфекция в реальных производственных условиях, то, с чем часто мы сталкиваемся на практике). Биопленки – микроскопические структуры, но в некоторых случаях, когда есть возможность расти беспрепятственно в течение продолжительного времени, становятся настолько плотными, что их можно увидеть невооруженным глазом [5, 9].

У специалистов молокоперерабатывающей отрасли не вызывает сомнений тезис, что безопасность и качество выпускаемой пищевой продукции – главные потребительские требования, напрямую связанные с микробиологической опасностью и потенциально с санитарно-гигиеническим состоянием производства. При этом важен комплексный подход, под которым подразумеваются не только правильно организованная мойка, очистка и дезинфекция поверхностей технологического оборудования, но и использование гигиенических принципов зонирования и разделения потоков персонала и продукции с применением санпропускников и дезбарьеров, санитарная обработка всех поверхностей производственных и подсобных помещений, соблюдение требований, предъявляемых к применяемой воде, воздушной среде, использование специализированной одежды, личная гигиена и прочее. Все, что сопровождает технологический процесс производства продукции, контактирует с сырьем, ингредиентами, готовым продуктом, потенциально несет риск его микробиологического обсеменения и заражения. Для размножения микроорганизмов и образования биопленок нужны влага, питательная среда, комнатная температура и время. Все эти факторы есть на молочном предприятии.

Как же бороться с биопленками? Бороться с биопленками после их появления очень сложно, поэтому основная задача – остановить их формирование на начальной стадии. Очень важно минимизировать начальную адгезию микроорганизмов. Важнейшую роль при этом играет санитарная обработка, в частности процесс мойки. Мойку на молокоперерабатывающем предприятии можно определить как комплексный физико-химический процесс удаления органических загряз-

нений, состоящий из смачивания обрабатываемой поверхности, эмульгирования и омыления жиров, пептизации белков, диспергирования, растворения, комплексообразования и солюбилизации, предотвращающих повторную контаминацию из рабочего раствора. Необходимо подчеркнуть, что все эти этапы нельзя полностью обеспечить, используя такие примитивные моющие (чистящие реагенты, как каустическая сода и азотная кислота).

Основной движущей силой в данном процессе является химизм, т.е. то, чем осуществляется мойка (очистка) оборудования, чтобы провести гидролиз и эмульгирование белково-жировых фракций молочного загрязнения. От полноты его удаления зависит следующий этап санитарной обработки – дезинфекция. Даже минимальные следы белково-жировых отложений значительно снижают доступ дезинфицирующих растворов к поверхности оборудования, провоцируя моментальную адгезию вездесущих бактерий. Поэтому важно обеспечить 100 %-ное удаление органических загрязнений перед дезинфекцией, чего можно достигнуть, используя лишь высокоэффективное многокомпонентное щелочное моющее средство с определенным значением pH рабочих растворов. Этому требованию отвечают композиции моющих средств на основе сильнощелочных электролитов (гидроксидов натрия, калия). А поскольку водные растворы щелочей обладают высоким поверхностным натяжением, они плохо смачивают твердые поверхности оборудования, что значительно снижает моющий эффект. Для снижения поверхностного натяжения моющих растворов и, соответственно, увеличения их смачивающей способности, частичного диспергирования органического загрязнения, более полного эмульгирования жиров и масел в растворы щелочных электролитов необходимо вводить ПАВ – смачиватели и диспергаторы.

Рост объемов производства обогащенных, молочных составных и молокосодержащих продуктов переработки молока на эмульсионной жировой основе с комбинированным составом с использованием натуральных и (или) модифицированных растительных масел, стабилизаторов структуры, эмульгаторов, ароматизаторов, красителей, пробиотиков, пребиотиков и пищевых добавок создает предпосылки к образованию на поверхностях технологического оборудования специфических трудноудаляемых загрязнений. Это обуславливает повышенные требования к проведению санитарных обработок. В составах моющих (чистящих) и дезинфицирующих средств должны присутствовать 2–4 вида ПАВ, обладающих не только смачивающими и диспергирующими свойствами, но и выраженным эмульгирующим действием по отношению к химическому составу жиров и масел, присутствующих в подобных загрязнениях. В этих случаях необходим подбор ПАВ с различной углеродной цепочкой от C₄–C₆ до C₁₆–C₁₈, позволяющих в то же время контролировать пенообразование рабочих растворов.

Использование в процессах мойки воды с высокой карбонатной жесткостью существенно затрудняет процесс очистки, способствует образованию точечных, а чаще сплошных органических отложений, «цементированных» минеральными комплексами кальция, магния и железа. При этом ожидать качественного эффекта их удаления с помощью нативных растворов кислот не приходится, так как им также присуще высокое поверхностное натяжение. Согласно результатам ранее проведенных исследований растворение отложений типа молочного камня может быть достигнуто только

при наличии в кислотном растворе ПАВ. А в щелочных растворах, кроме ПАВ, необходимы комплексоны, связывающие соли жесткости воды в водорастворимые комплексы.

В контексте борьбы с биопленками особого внимания заслуживает баромембранное оборудование с использованием микро-, ультра-, нанофильтрационных и обратноосмотических мембран. Конструкции мембранных установок довольно сложны, а мембранные элементы, входящие в их состав, имеют большую площадь пористой поверхности, которая легко доступна для закрепления и развития микроорганизмов. Мембранные установки особенно склонны к микробиологическому загрязнению, в первую очередь из-за неполной доступности органических и минеральных отложений в порах мембран.

При регенерации и проведении санитарной обработки нельзя рассчитывать только на применение даже особо чистого гидроксида натрия с минимальным содержанием примесей. Выбор ПАВ и комплексообразователей строго индивидуален. Рядом специалистов для очистки предлагается использовать растворы гидроксида натрия в смеси с гипохлоритом натрия. Безусловно, этот технологический прием значительно повышает степень очистки (регенерации) мембран за счет образования атомарного кислорода и активного хлора, воздействующих на органические загрязнения не только на поверхностях мембран, но и в порах в процессе рециркуляции моющего раствора под давлением в системе установки. Подчас даже в присутствии ПАВ доступ моющего дезинфицирующего раствора к этим отложениям затруднителен.

Для эффективного удаления загрязнений и предотвращения образования биопленок на мембранах требуется периодическое применение энзимных (ферментных) препаратов. Это подтверждает практика эксплуатации мембранного оборудования.

Бактерии, как и все живые организмы, реагируя на внешние угрозы, отвечают ростом резистентности по отношению к часто используемым дезинфектантам и биоцидам. Биопленка, образованная бактериями, является средством защиты от дезинфицирующих средств. Микроорганизмы отличаются повышенной выживаемостью даже в присутствии агрессивных действующих веществ. Приводятся данные, что микроорганизмы, входящие в состав биопленок, оказались значительно более устойчивы к воздействию ультрафиолетового излучения, ряду химических средств дезинфекции, дегидратации, антибиотикам и факторам иммунной защиты [4, 6].

Основное действие биоцидов направлено на проницаемость через мембрану микробных клеток действующих веществ и ее разрушение, воздействие на энзимосистемы микроорганизмов. Но в случае с биопленкой сначала надо разрушить ее оболочку, растворить сложносоставной матрикс и обеспечить проникновение активно действующего вещества к цели.

Для успешной реализации необходимо использовать высокоэффективные препараты, содержащие полиэлектролиты и модифицированные полимеры в качестве смачивателей, эмульгаторов, солюбилизаторов, диспергаторов и комплексообразователей совместно с современными ПАВ (этоксилатами, алкоксилатами, полиглюкозидами, полиакрилатами и акриламидами) и субстанциями на основе нитрилтриуксусной, этилендиаминтетрауксусной, гидроксипентилэтилендиаминтриуксусной, диэтилентриаминпентауксусной, метилглициндиуксусной кислоты, глюконеоптонатов и др.

Таким образом, наиболее перспективны следующие направления борьбы с биопленками:

- для предотвращения первичной контаминации и минимизации начальной адгезии микробных клеток проводить санитарную обработку непосредственно (немедленно!) по окончании технологического процесса (опорожнения) и осуществлять системный микробиологический экспресс-мониторинг;
- использовать высокоэффективные многокомпонентные средства санитарной обработки направленного действия с обязательным набором функциональных компонентов в виде ПАВ, комплексонов и комплексонов, диспергаторов и солюбилизаторов для удаления сложносоставных специфических загрязнений, провоцирующих образование биопленок;
- предъявлять повышенные требования к оборудованию: использовать гладкие поверхности из полированной высококачественной нержавеющей стали с титаном, применять гидрофобные материалы (тефлон, полиуретан и др.), минимизировать контакты с такими материалами, как латекс, силикон, ПВХ;
- применять различные действующие вещества в составе многокомпонентных химических средств дезинфекции, т.е. соблюдать ротацию;
- разрабатывать новые методы проникновения через матрикс биопленки различных действующих веществ дезинфектантов с целью подавления активности и уничтожения бактерий внутри биопленок с использованием ферментных (энзимных) комплексов и в будущем – с синтезированными бактериофагами.

В заключение необходимо отметить, что современные исследования, посвященные целевой эффективности дезинфекционных средств, не могут основываться на традиционных концепциях микробиологии и должны учитывать новые сведения о биопленках с учетом специфики пищевых производств.



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Мальцев, С.В.** Что такое биопленки? / С.В.Мальцев, Г.Ш.Мансурова // *Практическая медицина. Педиатрия*. 2011. № 5 (11). С. 5–10.
2. **Ильина, Т.С.** Биопленки как способ существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина: феномен, генетический контроль и системы регулирования их развития / Т.С.Ильина [и др.] // *Генетика*. 2004. Т. 40. № 11. С. 1445–1456.
3. **Чернявский, В.И.** Бактериальные биопленки и инфекции / В.И.Чернявский // *Annals of Mechnikov Institute*. 2013. № 1. С. 86–90.
4. **Сироткин, А.С.** Агрегация микроорганизмов: флоккулы биопленки, микробные гранулы / под ред. А.С.Сироткина, Г.И.Шагинурова, К.Г.Ипполитова. – Казань: Акад. наук Республики Татарстан, 2007. – 151 с.
5. **Николаев, Ю.А.** Биопленка – «город микробов» или аналог многоклеточного организма / Ю.А.Николаев, В.К.Плакунов // *Микробиология*. 2007. Т. 76. № 2.
6. **Monroe, D.** Looking for Chinks in the Armor of Bacterial Biofilms. *PLoS Biology* 5 (11, e307). [Электронный источник]. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050307>, дата обращения: 02.10.2018.
7. **Смирнова, Т.А.** Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок / Т.А.Смирнова // *Микробиология*. 2010. Т. 79. № 4. С. 435–446.
8. **Xavier, J.B.** Biofilm – control strategies based on enzymic disruption of the extracellular polymeric substance matrix – a modeling study / J.B.Xavier [et. al.] // *Microbiology*. 2005. № 151. P. 3817–3832.
9. **Rosche, B.** Microbial biofilms: a concept for industrial catalysis? / B.Rosche [et. al.] // *Trends in Biotechnology*. 2009. № 27. P. 636–643.