



Znaczenie biofilmów w utrzymaniu higieny w środowisku produkcyjnym branży mleczarskiej

Elżbieta Rosiak

Katedra Technologii Gastronomicznej i Higieny Żywności

Instytut Nauk o Żywieniu Człowieka, SGGW w Warszawie

elzbieta_rosiak@sggw.edu.pl

Wprowadzenie

Zabiegi mycia i dezynfekcji w branży spożywczej muszą być prowadzone w sposób racjonalny i systemowy, a bez ich wdrożenia żaden zakład przemysłu spożywczego nie spełnia postanowień wynikających z ustawodawstwa polskiego i Unii Europejskiej, nie jest też możliwa produkcja żywności o właściwej jakości zdrowotnej oraz zapobieganie zagrożeniom zdrowotnym żywności [12, 16].

Skład i odczyn preparatu myjącego i dezynfekującego wywołują zróżnicowany mechanizm działania na drobnoustroje. Związki fenolowe, aldehydy oraz związki metaloorganiczne mogą denaturować białka i rozrywać kompleksy nukleoproteinowe; czwartorzędowe sole amoniowe oraz aminotlenki alifatyczne uszkadzają błonę cytoplazmatyczną; z kolei związki utleniające, chlorowce i sole metali ciężkich utleniają grupy sulfhydrylowe w cysteinie i koenzymie A do mostków disiarczkowych, powodując zakłócenia procesów metabolicznych w komórkach drobnoustrojów [8]. Wobec powyższych mechanizmów drobnoustroje wykształciły własne systemy obronne. Jednym ze skuteczniejszych jest organizacja komórek w biofilm, czyli trójwymiarową strukturę o grubości od kilku do kilkunastu nanometrów składającą się z mikroorganizmów, którą po raz pierwszy zaobserwował Antoni Van Leeuwenhoek w latach 70. XVII wieku [7, 13, 14].

Czym jest biofilm i jak powstaje?

Biofilm definiuje się jako złożone zbiorowisko mikroorganizmów, które przylegają do biotycznych i abiotycznych powierzchni, są zamknięte w wytworzonej przez siebie matrycy zewnątrzkomórkowych substancji polimerowych (EPS-extracellular polymeric substances), nazywanej śluzem lub glikokaliksem. Glikokaliks sprawia, że biofilm jest układem nieruchomym, stanowi fizyczną i strukturalną barierę przed niekorzystnymi czynnikami mechanicznymi, chemicznymi i fizycznymi (np. wysuszenie, ogrzewanie, warunki beztlenowe, obecność antybiotyków, zmienne pH, działanie fizycznej i chemicznej dezynfekcji) oraz sprzyja ochronie genotypu drobnoustrojów [15]. Przylegając do różnych powierzchni: tkanek, powierzchni roboczych, elementów maszyn urządzeń, drobnego sprzętu (powierzchni wykonanych z tworzyw sztucznych, szkła i metali) biofilm stwarza ryzyko zanieczyszczeń/zakażeń krzyżowych w przemyśle spożywczym oraz w medycynie. Z danych Centers for Disease Control and Prevention (CDC) wynika, że ponad 65% wszystkich zakażeń szpitalnych można przypisać biofilmom [11].



W powstawaniu biofilmu wyróżnia się cztery fazy. Faza pierwsza to adhezja odwracalna – bakterie pod wpływem ruchów Browna, sił grawitacyjnych i sił przyciągania van der Waalsa przenoszone są na powierzchnię i pokrywają zasiedlaną powierzchnię. W fazie drugiej (adhezja nieodwracalna) bakterie zwiększają syntezę EPS, w kolejnym etapie (etap trzeci: dojrzewanie biofilmu) dochodzi do namnażania drobnoustrojów oraz ich różnicowania w wyniku aktywacji lub hamowania ekspresji genów. W dojrzałym biofilmie można wyróżnić wiele mikrośrodków, które różnią się pod względem stężenia tlenu, pH, dostępności składników odżywczych i gęstości komórek [2]. Dojrzały biofilm niekorzystnie wpływa na warunki higieniczne w przemyśle spożywczym i prowadzi do zanieczyszczenia krzyżowego produktów. Zanieczyszczenie krzyżowe jest najczęstszym (91,7%) czynnikiem wśród przyczyn wystąpienia infekcji pokarmowych [9]. Mleko i produkty mleczne należą do produktów łatwo psujących się oraz podatnych na zanieczyszczenie mikrobiologiczne. Ze środowiska zakładów mleczarskich izoluje się bakterie z rodzajów m.in. *Enterobacter*, *Listeria*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Pseudomonas* i *Staphylococcus*. Powstanie biofilmu, złożonego m. in. z wymienionych drobnoustrojów, w tym ich gatunków/szczepów chorobotwórczych może doprowadzić do ich rozprzestrzenienia się w środowisku produkcyjnym i okołoprodukcyjnym, co stanowi źródło zanieczyszczenia produktu gotowego i ryzyko infekcji pokarmowych [3]. Rozprzestrzenienie się bakterii z biofilmu jest związane z ostatnią fazą w rozwoju biofilmu, którą jest oderwanie komórek od błony biologicznej oraz ich rozproszenie w środowisku. Mechanizmy działające na tym etapie dzielą się na aktywne (związane są z mechanizmami inicjowanymi przez bakterie, które potrafią aktywnie oderwać się od biofilmu, by rozpocząć nowy cykl kolonizacji) oraz pasywne (dyspersja biofilmu ma miejsce, gdy do oderwania komórek przyczyniają się siły zewnętrzne, takie jak zwiększone naprężenia ścinające, brak składników odżywczych lub wewnętrzne zmiany biochemiczne w komórkach bakterii) [2]. Oderwanie komórek od zasiedlanej powierzchni oraz ich rozproszenie w środowisku może mieć miejsce już po kilku, czy kilkunastu godzinach. Zjawisko to może być przyczyną okresowego pogorszenia jakości mikrobiologicznej żywności mimo prawidłowo prowadzonych zabiegów mycia i dezynfekcji i mieć kluczowe znaczenie dla bezpieczeństwa produktu.

Proces tworzenia biofilmu zależy od czynników środowiskowych, gatunku a nawet szczepu mikroorganizmów, budowy komórek bakterii (wicie, curli i fimbrie umożliwiające i przyspieszające adhezję komórek bakterii do powierzchni) oraz właściwości fizyko-chemicznych kolonizowanych materiałów [1, 4]. Temperatura ma duży, ale niejednoznaczny wpływ na produkcję biofilmu. Nie zawsze zjawisko to zachodzi zgodnie z reakcją pierwszego rzędu, czyli jego tempo nie zawsze rośnie wraz ze wzrostem temperatury. Wiadomo także, że przejście komórek bakterii z fazy planktonowej do trójwymiarowej struktury biofilmu jest procesem dynamicznym, zależnym od czynników środowiskowych i biochemicznych.

Jak walczyć z biofilmami w przemyśle?

Niezwykle ważne jest rozpoznanie czynników środowiskowych odpowiedzialnych za tworzenie biofilmu aby zapobiegać jego powstawaniu na powierzchni. Pozwala to na opracowanie skutecznego planu higienizacji zakładu, dobór skutecznych środków zapobiegających powstawaniu i usuwaniu biofilmu. Ponadto zapobieganie powstawaniu oporności drobnoustrojów, ogranicza koszty przeznaczane na dezynfekcję oraz zmniejsza chemizację środowiska. Mazaheri i wsp. [10] wykazali skuteczność dezynfekcji chemicznej oraz chemiczno-enzymatycznej w przypadku biofilmu tworzonego przez *L. monocytogenes*. Najsilniejsze oddziaływanie wykazywały preparaty odpowiednio: zasadowy (mieszanina wodorotlenku sodu i potasu) o temperaturze 40°C, kwaśny (mieszanina kwasu fosforowego i tlenku C12-14alkilodimetyloaminy) o temperaturze 20°C, enzymatyczny (preparat zawierający m.in. proteazę, alfa-amylazę oraz olejek tymiankowy i cynamonowy) o temperaturze 50°C oraz chlorowy (preparat zawierający wodorotlenek sodu i podchloryn sodu) o temperaturze 20°C.



Podsumowanie

Nasze dotychczasowe badania z zakresu wiedzy o biofilmach bakteryjnych poświęcone były opracowaniu metod oceny obecności oraz tempa tworzenia biofilmu na powierzchniach i materiałach użytkowych (np. stal nierdzewna, polipropylen, PVC), określeniu wpływu wybranych czynników środowiskowych (temperatura, gęstość inokulum, czas) oraz ocenie skuteczności różnych metod i preparatów pozwalających na eliminację biofilmu. Analizę oceny czynników determinujących powstawanie biofilmu wykonano z użyciem wielowymiarowej analizy PCA. Wykazano, że w temperaturze 25°C tworzenie biofilmu przez testowane izolaty bakteryjne *Klebsiella* spp., *Bacillus* spp., *Pantoea* spp., *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter cloacae* było determinowane głównie przez temperaturę a inne czynniki, takie jak wielkość inokulum i czas, były mniej istotne [4, 5]. Jednak w temperaturze 37°C czas był głównym czynnikiem tworzenia biofilmu [4]. Ponadto opracowano matematyczne modele predykcyjne do wyjaśnienia zjawiska powstawania biofilmu na badanych powierzchniach. Najbardziej przydatną funkcją do opracowania modelu powierzchni odpowiedzi prognozującego wpływ dwóch zmiennych na powstawanie biofilmu okazała się nieliniowa funkcja regresji Extreme Value Single Width, która uzyskiwała niskie wartości błędów SE i MSE oraz dobre (n=2) i bardzo dobre (n=4) współczynniki dopasowania do danych empirycznych. Zmienne niezależne - gęstość inokulum i czas - były odpowiedzialne za tworzenie biofilmu na powierzchniach stali nierdzewnej, medycznego PVC oraz polipropylenu [5].

Literatura

1. Bordi C., de Bentzmann S. 2011. Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. *Annals of Intensive Care* 1, 1-8.
2. Bridier A., Sanchez-Vizueté P., Guilbaud, M., Piard, J. C., Naitali, M., Briandet R. 2015. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology* 45, 167-178.
3. Gemba M. 2023. Bakteryjne miasta śluzu, *Akademia* 2, 74.
4. Gemba M., Rosiak E., Nowak-Życzyńska Z., Kałęcka P., Łodykowska E., Kołożyn-Krajewska D. 2022. Factors influencing biofilm formation by *Salmonella enterica* sv. Typhimurium, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *Pantoea* spp. and *Bacillus* spp. isolated from human milk determined by PCA analysis, *Foods* 30, 11(23), 3862.
5. Gemba M., Rosiak E., Kołożyn-Krajewska D. 2025. Development of predictive models of biofilm formation by *C. sakazakii*, *E. cloacae* on work surfaces used in the food industry and medicine, *International Journal of Food Microbiology* 434, 111131.
6. Gupta T.B., Mowat E., Brightwell G., Flint S.H. 2018. Biofilm formation and genetic characterization of New Zealand *Cronobacter* isolates. *Journal of Food Safety* 38, 1-13.
7. Jamal M., Ahmad W., Andleeb S., Jalil F., Imran M., Nawaz M. A., ... & Kamil M. A. 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association* 81(1), 7-11.
8. Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. 2013. *Mikrobiologia Techniczna*, Wydawnictwo Naukowe PWN Warszawa.
9. Londero A., Costa M., Galli L., Brusa V., Linares L., Prieto M., Leotta G. 2019. Characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* strains from butcher shops, *LWT - Food Science and Technology* 113, 108363.
10. Mazaheri T., Cervantes-Huamán B. R.H., Turitich L., Ripolles-Avila C., Rodríguez-Jerez J.J. 2022. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces through conventional and alternative cleaning solutions, *International Journal of Food Microbiology*, 381.
11. Percival S. L. 2017. Importance of biofilm formation in surgical infection. *Journal of British Surgery* 104(2), 2017.
12. Rozporządzenie (WE) nr 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie higieny środków spożywczych, Dz.U.UE.L.2004.139.1.
13. Slavkin H.C. 1997. Biofilms, microbial ecology and Antoni van Leeuwenhoek. *The Journal of the American Dental Association* 128(4), 495.
14. Sedarat Z., Taylor-Robinson A.W. 2019. A Consideration of antibacterial agent efficacies in the treatment and prevention of formation of *Staphylococcus aureus* biofilm. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases* 9(04), 167-172.
15. Tango C. N., Akkermans S., Hussain M. S., Khan I., Van Impe J., Jin Y. G., Oh D. H. 2018. Modeling the effect of pH, water activity, and ethanol concentration on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology* 76, 287-295.
16. Ustawa z 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia, Dz. U. 2006 Nr 171 poz. 1225.