



## Ülevaade: BOKIRME KUI OLULINE TEGUR PIIMA JA PIIMATOODETE SAASTES TERMOTOLERANTSETE BAKTERITEGA

### Review: BIOFILM AS A MAJOR FACTOR IN CONTAMINATION OF MILK AND DAIRY PRODUCTS WITH THERMODURIC BACTERIA

Priit Elias, Epp Songisepp, Andre Veskioja, Kadi Rammul

OÜ Tervisliku Piima Biotehnoloogiaste Arenduskeskus  
Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu

Saabunud:	01.06.17	<p><b>ABSTRACT.</b> The primary source of thermophilic bacteria for contamination of milk and dairy products is raw milk. Contamination sources of raw milk are the surface of udder, milking-, cooling- and storage equipments. Inadequate cleaning and storage of milking equipment may cause formation of biofilm on the surfaces which are in contact with milk.</p> <p>Thermophilic bacteria are divided on the basis of their physiological characteristics from thermophilic, mesophilic and psychrophilic bacteria. Thermophilic bacteria in biofilm have favourable conditions for reproduction. Bacteria in biofilm are much more resistant to temperatures and chemicals used on cleaning of equipment.</p> <p>Characteristics of bacteria cells, the cell-surface properties and the properties of fluid suspending bacteria influenced binding of bacteria in biofilm formed on the surface of the equipment.</p> <p>Outgrowth of thermophilic bacteria and contamination of processed milk take place from biofilm formed on the surfaces of regeneration and cooling sections of pasteurizers and from biofilms formed on the surfaces of separators and buffer tanks, which were in contact with milk.</p> <p>Thermophilic bacteria in raw milk undergo the necessary heat treatment and after it, reproducing in biofilms which formed on the surfaces of equipment, they can turn now to the product. Thermophilic bacteria have often negative impact quality of dairy products.</p>
Received:		
Aktsepteeritud:	20.06.17	
Accepted:		
Avaldatud veebis:	20.06.17	
Published online:		
Vastutav autor:	Priit Elias	
Corresponding author:		
e-mail: priit.elias@tptak.ee		
Keywords: biofilm, thermophilic bacteria, milk and dairy products.		
Link: <a href="http://agrt.emu.ee/pdf/2017_1_elias.pdf">http://agrt.emu.ee/pdf/2017_1_elias.pdf</a>		
DOI: <a href="http://dx.doi.org/10.15159/jas.17.05">http://dx.doi.org/10.15159/jas.17.05</a>		

© 2017 Akadeemiline Põllumajanduse Selts. Kõik õigused kaitstud. 2017 Estonian Academic Agricultural Society. All rights reserved.

#### Sissejuhatus

Termotolerantseid baktereid nagu *Bacillus* spp., *Microbacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Clostridium* spp. jt võib leida paljudest piimatoodetest nagu joogipiim, koor, juust, piima- ja vadaku pulbrid. Kui nende kõrge arv esineb toodete valmistamisel kasutatavates lisandites, milleks võivad olla näiteks suhkur, jahu, maitseained, tõstavad needki veel lisaks olemasolevatele termotolerantsete bakterite arvu toodetes.

Termotolerantseteks bakteriteks nimetatakse mikroorganisme, mis jäävad ellu pastöriseerimisel, kuid ei kasva pastöriseerimistemperatuuril (Frank jt, 1993).

Termotolerantsete bakterite hulgas on nii eoseid moodustavaid kui ka eoseid mittemoodustavaid liike. Oma termoresistentsuse tõttu on nad vastupidavad toor-

me kuumtöötlemisprotsessides, moodustades toiduainetega kokkupuutuvate seadmete pindadel biokirmeid ja võivad nendes koguni paljuneda. Kuna nad on kuumtöötlemisele suhteliselt hästi vastupidavad, siis teatud arv neist läbib toodete valmistamisel toorme töötlemisprotsessi ja nii lähevad nad sageli märkimisväärses hulgas edasi ka valmistoodetesse.

Termotolerantsed bakterid võivad kõrge saastatuse korral kutsuda esile toidu riknemisi, kuid üldjuhul ei kutsu esile haigestumisi ega produtseeri toksine (välja arvatud mõned erandid). Toodete nõuetekohasel säilitamisel ja käsitlemisel nad üldjuhul ei paljune ja pikemaajalisel säilitamisel nende arv järk-järgult väheneb.

Käesolevas artiklis antakse ülevaade termotolerantsete bakterite olemusest, nende jaotuvusest vastavalt kasvu temperatuurile, võimest moodustada piimaga

kokkupuutuvate seadmete pindadel biokirmet. Lisaks toodule kirjeldatakse veel bakterite paljunemist biokirmes ning bakterite sattumist sealt erinevatesse piimatoodetesse.

### Ülevaade kirjandusest

Termotolerantsete bakterite esmaseks allikaks piimatoodetesse sattumisel on toorpiim. Aseptiliselt lüpsitud piim sisaldab keskmiselt  $< 10^3$  pmü ml<sup>-1</sup> mikroobi ja kui piim puutub kokku pärast lüpsi jahutusel ja säilitusel saastunud keskkonnaga, võib mikroobide sisaldus tõusta  $> 10^5$  pmü ml<sup>-1</sup>, mis on kindlasti ebapiisava hügieenitaseme näitaja (Şenel, Gürsoy, 2014). Saastumine võib toimuda piimanäärmes, udara ja nisade pindadelt, lüpsi- ja jahutuseadmetelt ning säilitustankist. Paljudele saastest pärit olevatele bakteritele on piim soodsaks toite- ja kasvukeskkonnaks. Piimast saavad nad vastavalt toitumistüübile kasutada ainevahetuseks ja paljunemiseks vajalikke valke, rasvu, karbohidraate, mineraalaineid, vitamiine jne.

Kõrgekvaliteedilise toorpiima mikroobide sisaldus peaks olema  $< 10^4$  pmü ml<sup>-1</sup>. Pastöriseerimisel enamus mikroobe häviv, kuid osa neist jäävad eluvõimelisteks ja neid nimetataksegi termotolerantseteks. Eeldatakse (Angula jt, 1989), et ligikaudu 4% piima üldarvust moodustavad termotolerantsete bakterid. Võttes aluseks mikroobide füsioloogilisi omadusi võidakse termotolerantseid baktereid jaotada järgmistesse kategooriatesse (Gleeson jt, 2013), (tabel 1):

1. Termofiilsed termotolerandid. Nende kasvu optimaalne temperatuur on 50–55 °C, kuid nad võivad kasvada ka temperatuuril 40–60 °C. Nad võivad kasvada toorme töötlemise eelkuumutuse astmetes ja nende arv võib suurendada nii järgneval töötlusel kui ka pärast töötlust toodete valmistamisel.

2. Mesofiilsed termotolerandid. Nende kasvu optimaalne temperatuur on ~30 °C, kuid nad võivad kasvada ka vahemikus 5–50 °C. Nende kasvu võib esineda nii farmis piima ebapiisaval jahutusel kui ka hilisemal töötlusel. Esineb nii spore moodustavaid kui ka spore mitte moodustavaid baktereid, mille hulka kuulub *Bacillus*'te, *Micrococcus*'te, *Microbacterium*'i, *Enterococcus*'te, *Streptococcus*'te ja *Arthrobacter*'i esindajaid (tabel 2).

3. Psührofiilsed termotolerandid. Nad võivad paljudena piimas alates külmumistemperatuurist kuni temperatuurini 25 °C. Seega termotolerantset psührofiilid on võimelised taluma pastöriseerimist, kasvama piima külmumisele lähedastel temperatuuridel nii toorpiima tankis kui ka töödeldud tootes ja produtseerima piima kui neile sobivasse keskkonda proteolüütilisi ja lipolüütilisi ensüüme. Nad osalevad näiteks pastöriseeritud piima säilivusaja vähenemises või põhjustavad juustude hilist paisumist ja kibedat ebameeldivat maitset (Megha, Annadurai, 2014; Hantsis-Zacharov, Halpern, 2007).

Piimast isoleeritud termotolerantsete bakterite hulka kuuluvad spore moodustavatest liikidest *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. *Sporolactobacillus* spp. jt ning spore mittemoodustavatest *Micrococcus* spp., *Streptococcus*

spp., *Microbacterium*'i jt liigid (Chambers, 2002; Frank jt, 1993; Yangida jt, 1987).

**Tabel 1.** Termotolerantsete termofiilsete, mesofiilsete ja psührofiilsete bakterite kasvu temperatuuride vahemikud (Gleeson jt, 2013)

**Table 1.** Growth temperature intervals of thermotolerant thermophilic, mesophilic and psychrophilic bacteria

Bakterite grupp Group of bacteria	Kasvu temperatuur, °C Growth temperature, °C		
	miinimum minimum	maksimum maximum	optimum optimum
Termofiilsed (soojalembelised) <i>Thermophilic</i>	40	60	50–55
Mesofiilsed (möödukad) <i>Mesophilic</i>	5	50	30–37
Psührofiilsed (külmalembelised) <i>Psychrophilic</i>	0 või vähem	25	≤ 20

Kõikides toorpiima proovides jäid Chambers'i (2002) järgi elulevateks pastöriseerimisel *Microbacterium lacticum* ja bakterite spoorid. *Micrococcus* spp. olid vähem vastupidavamad ja ainult 1–10% *Alcaligenes tolerantsi* tüvedest jäid eluvõimelisteks (Chambers, 2002).

**Tabel 2.** Mikroobide perekonnad, mis taluvad pastöriseerimist temperatuuril 63 °C, 30 min (Chambers, 2002)

**Table 2.** Genera of microbes which withstand pasteurization at 63 °C, 30 min. (Chambers, 2002)

Termotolerantsete bakterite perekonnad <sup>1</sup> Genera of thermotolerant bacteria	Psührofiilsete termotolerantsete bakterite perekonnad <sup>2</sup> Genera of psychrophilic thermotolerant bacteria
<i>Microbacterium</i>	<i>Acinetobacter-Moraxella</i>
<i>Micrococcus</i>	<i>Flavobacterium</i>
<i>Bacillus spores</i>	<i>Enterobacter</i>
<i>Clostridium spores</i>	<i>Alcaligenes</i>
<i>Alcaligenes</i>	<i>Bacillus</i>
	<i>Arthrobacter</i>

<sup>1</sup> Elulevad pärast pastöriseerimist 63 °C, 30 min / Living after pasteurization 63 °C, 30 min.

<sup>2</sup> Nähtav kasv temperatuuril 5–7 °C, kasul 7–10 päeva / Visible growth at 5–7 °C, 7–10 days

Marth ja Steele (2001) märgivad oma uuringutes samuti, et piimatoodetes esinevatest termotolerantsetest moodustavad enamiku *Bacillus*'te, *Microbacterium*'i, *Micrococcus*'te, *Enterococcus*'te, *Lactobacillus*'te ja *Corynebacterium*'i liigid. Piimatoodete valmistajad pööravad erilist tähelepanu sulfiteid redutseerivatele klostriididele, psührofiilsetele termotolerantidele, *Bacillus cereus*'ele ja *Bacillus licheniformis*'ele, kui olulistele toodete riknemist põhjustavatele mikroobidele. Samas osa neist võivad olla ka potentsiaalsed toidupatogeenid. Angula jt (1989) järgi oli kõige sagedasem esineja piimas ja piimatoodetes *Bacillus licheniformis*. Märkimisväärselt harvem märgiti aga eelkõige tootmisriistadelt pärinevat *Bacillus cereus*'t. Samas mikrokokkide ja *Microbacterium*'i liikide arv seadmetele moodustunud biokirmes võib ületada  $5 \times 10^4$  pmü/cm<sup>2</sup>. Angula jt (1989) eeldavad, et ligikaudu 4% piima mikroobide üldarvust moodustavad termotolerantsete bakterid.

*Bacillus cereus* on grampositiivne, kepikujuline, spore moodustav, peritrihiidne liikuv bakter, mis võib kasvada aeroobses või fakultatiivselt anaeroobses

keskkonnas ning talub pastöriseerimist. Suhteliselt raskesti üksteisest eristuvatest kuid *Bacillus cereus*'ga samasse gruppi kuuluvad veel *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. weihenstephanensis*, *B. pseudomycooides* ja *B. anthracis*. Nende kõigi optimaalne kasvutemperatuur on 30–37 °C, kuid nad on võimelised kasvama ka temperatuuril vahemikus 4,5–50 °C. Kõik sellesse gruppi kuuluvad, kaasa arvatud *B. cereus*, bakterid on potentsiaalsed toidupatogeenid ja võimelised produtserima peensooles enterotoksiini, kutsudes esile toidumürgistusi. Kõhulahtisus ilmneb üldjuhul siis, kui toit sisaldab 10<sup>5</sup>–10<sup>7</sup> pmü/g/ml või kui sinna on varem moodustunud toksine (Granum, 2005). Reinemann jt (2003) märgivad et piimatoodete ohutuse seisukohalt lähtudes, peaks näiteks *B. cereus*'e arv toorpiimas jääma alla 10 pmü ml<sup>-1</sup>.

Sulfiteid redutseerivad klostriidid on grampositiivsed, anaeroobsed spoore moodustavad bakterid. Klostriidide 12–14 üksteisest raskesti eristuvat erinevat liiki võivad kasvada sõltuvalt liigist temperatuuril vahemikus 3,3–80 °C. Neist sagedamini esinevaks on *Clostridium perfringens*, mida võib leida nii inimese kui ka looma väljaheidetest, mullast, taimedelt kui ka toortoidust. Toorpiim võib saastuda nendega lüpsil nii silost kui ka väljaheidetest. Kõhulahtisuse, iivelduse ja oksendamise põhjuseks võib olla *Clostridium perfringens*'e poolt produtseeritav tsütotoksiline enetroksiin, mis ärritab epiteeli rakkude membraane (Aurel, Franciosa, 2002).

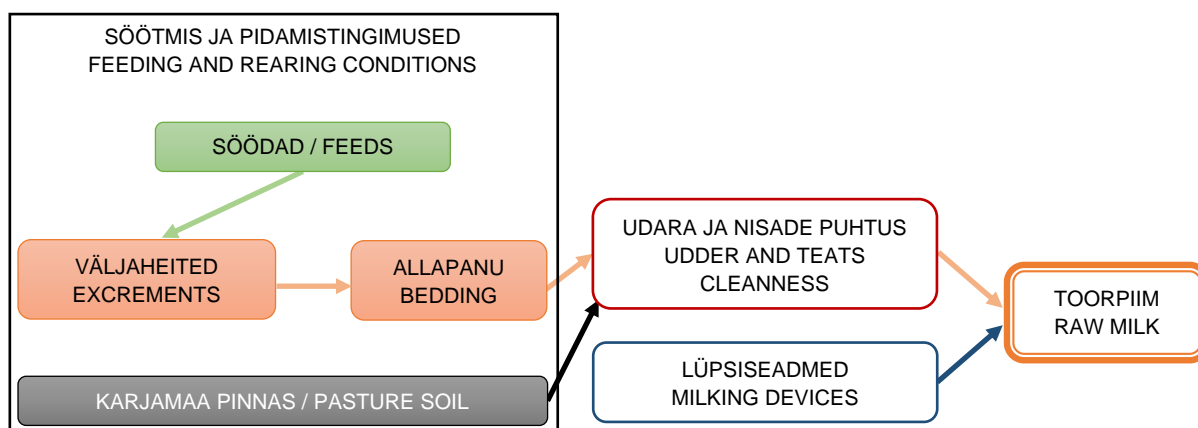
*Bacillus licheniformis* on grampositiivne, mesofiilne kepi kujuline anaeroobne spoore moodustav bakter ja tema optimaalne kasvu temperatuur on 30 °C (Burgess jt, 2010). Ta on võimeline paljunema ka madalamal temperatuuril kui 15 °C (näiteks 6 °C) ja temperatuuril 55 °C Burgess jt (2010) järgi on ka tema võimeline produtserima inimese tervisele ohtlikke toksine.

Leitakse (Reinemann jt, 2003), et termotolerantsete bakterite arv peaks toorpiimas jääma alla 100–200 pmü ml<sup>-1</sup> ning piima tootmise seadmetel alla 10 pmü cm<sup>-2</sup>

White'i jt, (2001) järgi tekib toorpiima termotolerantsete bakterite arvu tõusul üle 500 pmü ml<sup>-1</sup> probleeme selle väärindamisel piimatoodeteks.

Toorpiima termotolerantsete bakterite saasteallikateks võivad olla muld, allapanu, sööt, õhus leviv tolm, vesi; seega kõik, millega võib saastuda eelkõige udar ja selle pind.

Piima bakterite spooride arv karjatamisperioodil sõltub eelkõige udara ja nisade saastumisest mullaga. Mullas veesisalduse suurenemisega kaasneb märkimisväärselt udara saastatus ja seega bakterite spooride sisalduse võimalik suurenemine piimas. Nisade saastumisel mullaga, sisaldas Vissers jt (2007) järgi 33% piimast üle 1000 termotolerantse bakteri spoori liitris, samas söödaga saastumise korral oli ainult 2% piimal selline kõrge spooride arv. Laudaperioodil oli Vissers jt (2007) järgi piima termotolerantsete bakterite oluliseks saasteallikaks söötadest silo, mille bakterite spooride sisaldus võiks kvaliteetse piima tootmisel olla väiksem kui 1000 pmü g<sup>-1</sup> ja pH väärtus alla 5,0. Julien jt (2008) kasutades toorpiimast leitud spooride liikide määramisel DNA analüüse leidis, et samu liike oli nii piimas kui ka lehmadele söödavas maisi silos ja tuli järeldusele, et sööt on üks olulisemaid piima spooridega saastumise allikaid. Udara saastumist mõjutab veel allapanu ja sellest tulenev võimalik tolm. Miller jt (2015) leidsid, et mesofiilsete spoore moodustavate termotolerantsete bakterite arv oli madalam saepuru ja liiva allapanul võrreldes põhu või taaskasutusel oleva kuivsõnnikuga, kuna saepuru ja liiv on bakteritele ebasoodsamad keskkonnad võrreldes põhu ja taaskasutusel oleva sõnnikuga. McGuiggan jt (2002) järgi pärinevad siiski enamus toorpiimas leiduvatest termofiilsetest ja mesofiilsetest bakterite spooridest farmist, seal söödetaavast silost, allapanust ja sõnnikust. Olulisteks võimalikeks piima saastajateks tuleb pidada ka lüpsi- ja kogumisseadmeid (Prakash jt, 2007; Gleeson jt, 2013) (joonis 1) lüpsjate hügieenialast vähest koolitust ja tööl nõuetele mittevastavat sanitaarietust.



**Joonis 1.** Toorpiima saasteallikad termotolerantsete bakteritega (Gleeson jt, 2013 järgi)  
**Figure 1.** Contamination sources of raw milk with thermotolerant bacteria (by Gleeson et al., 2013)

### Biokirme tootmiseseadmete pindadel ja bakterite eraldumine sellest

Biokirme tekkel roostevabast terasest või mõnest muust materjalist seadmete piimaga kokkupuutuvatele pindadele on oluline pöörata tähelepanu lüpsi- ja piima säilitusseadmete puhastamisele ning nende hoidmisele tööst vabal ajal. Hood ja Zottola (1995) järgi võivad bakterid kinnistuda piima tootmise ja töötlemise keskkonnas piimaga kontaktis olevatele pindadele, kus nad võivad paljuneda, kasutada piimast vajalikke toitaineid, eralduda pindadelt töödeldavasse piima või piimatootesse ja paljuneda seal edasi. Bakteritest pindadel moodustunud biokirme ei koosne ainult bakteritest vaid ka bakterite poolt pinnale produtseeritud rakuvälisest materjalist. Tekib nii ühtlaselt pinda katvaid pakse biokirmeid, mille areng on kestnud päevi või nädalaid, kui ka mikroobidest koosnevaid üksikuid laike või pesi, mille areng on kestnud minuteid või tunde (Lawrence jt, 1995).

Üksikult seostunud bakter on pinnal paljunemise faasis, samas tütarakk, mis on algselt veel küll seotud

pinnale kleepunud emarakuga, eraldub pärast paljunemist mööda pinda voolavasse vedelikku. Nii toimivad näiteks *Rhizobium*'i, *Caulobacter*'i, *Pedomicrobium*'i jt bakterite perekondadesse kuuluvad liigid (Lawrence jt, 1995). Pindadel kasvavaks vormiks võivad olla ka nn pesad. Pärast pinnale kleepunud bakterite mitmeid paljunemisi moodustuvad lõpuks bakterite pesad, mis levides pinnal, katavad kogu pinna ning moodustubki kogu pinda kattev biokirme.

Lawrence jt (1995) märgivad, et bakterite ladestust biokirmesse iseloomustab sigmoidaalne kõver, kus võib eristada kasvu lag faasi, akumulatsiooni faasi ja kasvu püsivat faasi. Bakterite paljunemisega ja nende arvu suurenemisega biokirmes toimub biokirmest ka rakkude eraldumise suurenemine. Biokirme moodustumise kiirus sõltub moodustumisel tekkinud olukorrast. Varustatus toitainetega, bakterite tüüp ja keskkonna voolu kiirus on olulised tegurid biokirme arengul ning bakterite eraldumisel sellest (tabel 3).

**Tabel 3.** Seadmete pinna ja bakterite elukeskkonna omaduste mõju biokirme tekkele (Hinton, 2003)  
**Table 3.** Influence of equipment surface and environment of bacteria to formation biofilm (Hinton, 2003)

Pinna omadus, bakterite keskkond <i>Property of surface, environment of bacteria</i>	Mõju biokirme tekkele <i>Influence to biofilm formation</i>
Karedus <i>Roughness</i>	Soodustab bakterite kinnistumist ja sadestumist pinnale <i>Promotes bacterial binding and deposition on the surface of equipment</i>
Hüdrofoobsus <i>Substratum hydrophobicity</i>	Kinnistumine sõltub bakterite liigist ja tüvest ning pinna ettevalmistusest <i>Binding of bacteria depends on the species, strains and the preparation of equipment surface</i>
Temperatuur <i>Temperature of the surface</i>	Kinnistumine on kõige aktiivsem kasvu optimaalsel temperatuuril 20–55 °C <i>Binding is most active at the optimum temperature of growth, 20–55 °C</i>
Pinna tüüp <i>Type of substratum</i>	Desinfitseerivate ainete mõju kummil arenevatele biokiledele on väiksem kui roostevaba terasel <i>The efficacy of disinfectants to biofilms developed on rubber is much lower than on stainless steel</i>
Piima koostisosade sade pinnal <i>Precipitate of milk components on the surface</i>	Piimast pinnale sadestunud koostisosad võivad nii inhibeerida kui ka suurendada kinnistumist sõltuvalt bakterite liigist ja piimavalkude olemusest <i>Precipitate of milk components on the surface can inhibit or enhance the attachment of bacteria to surface depending on bacterial species and the nature of the milk protein</i>
Toitained <i>Nutrients</i>	Toitainete piiratud tingimustes suureneb bakterite kinnistumine pinnale / kinnistumine pinnale <i>Under conditions where nutrient concentrations are low, increased attachment to surfaces</i>
Bakterite arv <i>Count of bacteria</i>	Suurem bakterite arv piimas põhjustab ka suurema kinnistunud bakterite arvu pinnal <i>Higher count of bacteria in the milk causes a greater adhered population to the surface</i>
Voolurežiim ehk nihkepinge <i>Flow regime or shear stress</i>	Kinnistumise efektiivsus on pöördvõrdeline nihkepingega <i>Efficiency of binding is inversely proportional to the fluid shear stress</i>
Toor- või pastöriseeritud piim <i>Raw or pasteurized milk</i>	Bakterite kinnistumine toorpiimas on väiksem kui pastöriseeritud piimas, sest toorpiim sisaldab termolabiilseid inhibeerivaid immunoglobuliine <i>Binding to surfaces from raw milk is less than that from pasteurized milk</i>

Hinton (2003) märgib, et bakterid võivad eralduda biokirmest nii erosioonil, kestumisel kui ka abrasioonil. Erosioon on biokirme osakeste pidev kadu ja see toimub põhiliselt vedeliku põikejõu mõjul. Paksude biokirmete juures esineb peamiselt kestumine ja siis on osakeste kadu tunduvalt suurem kui erosioonil. Abrasioonil tekib biokirmest osakeste eraldumine põhiliselt osakeste kokkupõrkest ja seda täheldatakse näiteks keevkiht kuivatis. Nii ühel kui teisel juhul toimub pärast bakterite biokirmes paljunemist nende ülekannet tagasi ja sageli juba töödeldud keskkonda. Bakterite eraldumine on aga otseselt seotud biokirme kasvu kiirusega ja tegurid, mis piiravad kasvu, piiravad ka eraldunud bakterite arvu.

Bakterite erinevate liikide interaktsioon biokirmes võib olla kooperatiivne s.o üksteisele kasulik koos eksisteerimine või konkurents kus ühtede suhteline edu tähendab teistele ebaedu. Kooperatiivses suhtes olevatest bakteritest ühed produtseerivad aineid (vitamiine, kasvuaktivaatoreid jt), mis on teistele kasulikud ja kasutatavad (Lawrence jt, 1995). Bakterite vaheline konkurents ressursside ja kleepumiskoha pärast pinnal annab biokirmes ühtedele eelise võrreldes teistega. Domineerivateks osutuvad harilikult kiirema kasvuga ja liikumisvõimega liigid (Hinton, 2003). Biokirmes, mis koosnevad kas bakterite populatsioonide segust või ainult ühest populatsioonist, erinevad üksteisest tiheduse ja püsivuse poolest, kusjuures keskkonna samadel tingimustel on esimesed tihedamad ja püsivamad kui teised (Hinton, 2003).

### Tootmiseseadmete pinna ja bakterite elukeskkonna mõju biokirme tekkele

Oluline on teada, milline on seos bakterite biokirme ja seadme pinna vahel, et hinnata kinnistunud ja biokirmes paljunenud bakterite sattumist toiduainetesse. Hintoni järgi (2003) mõjutavad bakterite seostumist seadme pinnale moodustuvasse biokirmesse raku omadused, seadme pinna omadused ja baktereid suspenderiva vedeliku omadused (tabel 3). Parkar jt (2001) leidsid, et termofiilsete streptokokkide raku pinna valkudel oli oluline osa nende kinnitumisvõimes roostevabast terasest seadmete pindadele. Samas termotolerantsete batsillide ja nende spooride hüdrofoobsusel, pinna laengul ja eksopolüsahhariididel ei olnud üksikult võetuna kindlat seost rakkude kinnistumisega seadmete pindadele, kuid koos toimivana seda siiski märgiti (Parkar jt, 2001). *Streptococcus thermophilus*'e juures on üheks kinnistumist seadmete piimaga kokkupuutuvatele pindadele soodustavaks teguriks bakterite poolt produtseeritav bio-pindaktiivne aine (Parkar jt, 2001).

Paksemates biokirmetes kinnistunud bakterite kasv aeglustub, sest vähenevad nii toitainete kui ka hapniku sisaldus. Biokirmeks kinnistunud bakterid on aga vastupidavamad termilisele töötlusele, antibiootikumidele ja desinfitseerivatele ainetele, võrreldes keskkonnas vabalt olevate mikroobidega. Flint jt, (1997) uuringutest selgus, et vabalt elavate *S. thermophilus*'e rakkude täielikuks inaktiveerimiseks kulus 20 ppm naatriumhüpokloriit, kuid kinnistunud bakterid jäid eluvõimelisteks veel 400 ppm juures. Desinfitseerivatele ainetele resistentsust bakteritele mõjutab nii nende kinnistumisel olev seadme pind kui ka moodustunud biokirme vanus. Kummile või plastikule kinnistunud mikroobid vajavad 5–10 korda kõrgemat desinfitseerivate aine kontsentratsiooni võrreldes roostevaba terasest pinnaga (Krysinski jt, 1992) ja vanemates biokirmetes ilmneb lisaks veel ka eksopolüsahhariidide kaitsev toime (Kumar, Anand, 1998).

### Biokirme ja termotolerantsete bakterid piima töötlusel toodeteks

Toorpiima saastumine termotolerantsete bakteritega on kindlasti üheks esmaseks teguriks, mis piima järgnevatel töötlemise etappidel bakteritele eluks ja paljunemiseks soodsates tingimustes võib suurendada nende arvu, vähendades samas toodete säileaega ja mõjudes negatiivselt toodete kvaliteedile. Piima töötlusel on pastörisaatori regeneratsiooni või jahutussektiooni pindadele moodustunud biokirme samuti tähtsaks termofiilsete bakterite väljakasvu ja töödeldava piima saastumise allikaks vaatamata sellele, et temperatuur seal on vahemikus 45–60 °C. Töödeldava piima saastumine biokirmest eraldunud bakteritega on seda suurem ja kiirem, mida rohkem on töötlemisele suunatud piimas eelnevalt baktereid ja mida pikem on seadme pidev töö tsükkel (Rademacher jt, 1996).

Piimatoodete termotolerantsete bakterite sisalduse uuringutest selgus (Mane, Gandhi, 2010), et pastöri-

seeritud piim, kohupiim ja lassi (jogurti baasil valmistatud piimatooded) sisaldasid termotolerantseid psührotroofseid baktereid vastavalt  $93 \times 10^3$  pmü ml<sup>-1</sup>,  $59 \times 10^3$  pmü g<sup>-1</sup> ja  $41 \times 10^3$  pmü ml<sup>-1</sup>, kusjuures nende sisaldus sõltus aastaajast ja piimas oli nende arv kõrgem talvel. Samas kõikide isolaatide optimaalne kasvu temperatuur oli 25 °C (7–37 °C), pH 7 (6–8) ja keedusoola taluvus 0,5–4,0%. Isoleeritustest enamuse moodustasid *Macrococcus*'e *Exiguobacterium*'i ja *Arthrobacter*'i liigid, mis produtseerisid temperatuuril 7 °C proteaase ja hüdroliüüsisid piima valke osaledes seega piimatoodete ebapuhta, kibeda, rääsunud, roiskunud ning pärimi maitse ja lõhna moodustumisel kui ka säileaaja vähenemises (Mane, Gandhi, 2010). Tadesse ja Berhanu (1990) uuringutest selgus samuti, et domineerivateks termotolerantsetest psührotroofsetest piimas olid kokid võrreldes kepikujuliste vormidega. Pastöriseeritud piima mikrofloora koosneb peamiselt toorpiima termotolerantsetest bakteritest, bakteritest toorpiima kokkupuutest saastunud tootmisriistadelt ja saastest pärast pastöriseerimist (Mane, Gandhi, 2010; Tadesse, Berhanu 1990). Termotolerantsete psührofiilsete bakterite kasv jätkub soodsas jahutatud keskkonnas, mõjutades oluliselt joogipiima kui toote säilivust. Moodustub "magus kalgend", kibekas, "pärmine", ebapuhhas, ja rääsunud lõhn (Prakash jt, 2007; Meer jt, 1991). On leitud (Lee Wong, 1998), et termotolerantsete bakterite ja nende spooride arv väheneb töödeldavas piimas, kui alandada separeeritava piima temperatuuri 55 °C-lt 40 °C-ni ning tõsta seadme puhastuse sagedust.

Termofiilsete termotolerantide kasvu ja paljunemist esineb ka membraanidel näiteks piima ultrafiltratsiooni tsedari juustu valmistamisel või vadaku ultrafiltratsiooni vadakuvalkude kontsenteerimisel, kus temperatuur on vahemikus 50–55 °C (Lehmann, 1992). Uurides juustu katkematut valmistamist tsükli leiti (Lehmann jt, 1990), et termotolerantsete bakterite kasvu esines piima pastörisaatori plaatidel, ultrafiltratsiooni seadmes, retentaadi säilitamise puhvertankis (temperatuur 50 °C) ja sooja toorpiima vahetankis (temperatuur 30 °C). Retentaadi vahune pind temperatuuriga <50 °C ja seadmete pindadele tekkinud biokirme on seal termotolerantidele kasvu soodustavaks keskkonnaks. Termotolerantsete bakterite paljunemise pidurdamiseks ja arvu minimeerimiseks, tuleks tõhustada seadmete puhastust ja vähendada vahustust. Termotolerantsete bakterid, läbides juustude valmistamise tsükli ja sattudes juustu, võivad tekitada juustudes varajast paisumist, pehmet konsistentsi ja ebameeldivat lõhna ning maitset (Lehmann jt, 1990).

Piima või vadaku koostisosade sadestumine ja biokirme teke pulbrite valmistamisel võib toimuda ka temperatuuril 50–60 °C soojusvahetusseadmete eelsoojenduse, aurustuse ja kontsentratsiooni soojenduse etappidel. Toorme põhiline saastumine termofiilsete termotolerantsete bakteritega toimub eelsoojendussektiooni pindadele moodustunud biokirmest. Hiljem toote vee aktiivsuse vähenedes nende areng pidurdub ja

inhibeerub. Seega toorme töötlemise protsessides toimub termofiilsete termotolerantsete kasv ja pulbrites on nad olemas, kuid kasvu ei toimu (Watterson jt, 2014).

Võidakse arvata, et mikroobid saastest ja nende ensüümid on piima baasil valmistatud pulbrites inaktiivsed, siis nüüd on leitud, et pulbrite riknemist põhjustavad lisaks keemilistele muutustele ka mikroobide termoresistentsete ensüümide baasil toimuvad ensümaatilised reaktsioonid (Chen jt, 2003).

Hintoni (2003) järgi on saastumist termotolerantsete bakteritega piima töötlemisel toodeteks võimalik vähendada kui:

- kasutatav tootmiseseade oleks võimalikult vähe kontaktis tootega,
- minimeerida töötlemisel kasutatava soojusseadme kontaktpindu tootega, kasutades alternatiivseid kuumutustehnoloogiaid;
- vähendada toorpiima termotolerantsete arvu, optimeerida töötlemisprotsessi tingimusi, parandada tööstusseadmete hügieeni ja teha kindlaks kas piim või selle baasil valmistatud toore sobib üldse töötlemiseks;
- tõhustada kontrolli tööstuses tootmistsükli alustamisel, pöörates tähelepanu seadmete disainile.

Termotolerantsed bakterid sattudes piima tootmisel toorpiima, läbivad toodete valmistamisel vajaliku termotötluse, säilitavad eluvõime, paljunevad seadmete pindadel tekkivates biokirmetes ja satuvad sealt erinevatesse piimatoodetesse, kus soodsatel tingimustel edasi arenedes võivad kutsuda esile toodete riknemisi.

### Kokkuvõte

Termotolerantsete bakterite piimatootesse sattumisel on esmaseks allikaks toorpiim. Selle saastumine võib toimuda alates piimanäärdest, udara ja nisade pindadelt, lüpsi- ja jahutuseseadmetelt ning lõpetades säilitustanki ja transpordiga. Termotolerantsete bakterite füsioloogilistest omadustest lähtuvalt jaotatakse nad termofiilseteks, mesofiilseteks ja psührofiilseteks. Piimatoodete valmistajate erilise tähelepanu all on piimatööstuses esinevatest termotolerantsetest bakteritest sulfiteid redutseerivad klostriidid, psührofiilsed termotolerandid, *Bacillus cereus* ja *Bacillus licheniformis* jt.

Biokirme teket roostevabast terasest või mõnest muust materjalist seadmete piimaga kokkupuutuvatele pindadele võib põhjustada lüpsiseadmete ebapiisav puhastamine ja desinfitseerimine ning pikaajaline säilitamine. Biokirmes on termotolerantsetel bakteritel soodsad tingimused kasvuks ja paljunemiseks ning sealt eraldumiseks tagasi uuesti piima. Bakterid biokirmes on palju vastupidavamad nii seadmete puhastamisel kasutatavatele temperatuuridele kui ka desinfitseerimisel kasutatavatele kemikaalidele. Lüpsiseadmete regulaarne puhastamine mineraalsest sademest koos kaasneva nõuetekohase desinfitseerimisega aitab vähendada biokirme teket.

Bakterite raku omadused, raku pinna omadused ja baktereid suspendeeriva vedeliku omadused on märkimisväärsed tegurid, mis mõjutavad bakterite seostumist seadmete pindadele moodustuvatesse biokirmetes.

Termotolerantsete bakterite väljakasv ja töödeldava piima saastumine leiab aset enamasti pastörisaatori regeneratsiooni ja/või jahutussekttsiooni pindadele moodustunud biokirmest. Oluline osa, sõltuvalt piimatoodete valmistamisel kasutatavatest tehnoloogilistest protsessidest, on siin ka separaatori, filtratsiooni ja puhvermahutite piimaga kokku puutuvatel pindadel tekkinud biokirmetel.

Termotolerantsed bakterid sattudes piima tootmisel toorpiima, läbivad toodete valmistamisel vajaliku termilise tötluse. Piima töötlemisel toodeteks moodustub sageli selleks kasutatavatel seadmete pindadel biokirme, millest bakterid pärast paljunemist eralduvad ja satuvad toodetesse ning mõjutavad negatiivselt nende kvaliteeti.

### Tänuavaldus

Töö on teostatud Tervisliku Piima Biotehnoloogiarenduskeskuse OÜ poolt projekti HEALTH FOOD nr EU 48686 raames.

### Huvide konflikt / Conflict of interests

Autor kinnitab artikliga seotud huvide konflikti puudumist. *The author declares that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.*

### Autorite panus / Author contributions

Kõigil autoritel oli võrdne panus artikli tegemisel ja koostamisel. *All authors had an equal contribution to making and compilation of the article.*

### Kasutatud kirjandus

- Angula, L., Lorenzo, A., Riveiro, M. 1989. Isolation and identification of termoduric flora of raw cow's milk from the province of Pontevedra. Modern microbiological Methods for Dairy Products. – IDF special issue 8901, Brussels, pp. 122–128.
- Aureli, P., Franciosa, G. 2002. *Clostridium* spp. In: Encyclopaedia of Dairy Sciences (eds. H. Roginski, J.W. Fuquay and P.F. Fox). – London, United Kingdom, pp. 456–463.
- Burgess, S.A., Lindsay, D., Flint, S.H. 2010. Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. – International Journal of Food Microbiology, 144:215–225.
- Chambers, J.V. 2002. The microbiology of raw milk. In: Dairy microbiology handbook, 3<sup>rd</sup> ed. (ed. R.K. Robinson). – USA, pp. 39–90.
- Chen, L., Daniel, R.M., Coolbear, T. 2003. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. – International Dairy Journal, 13:255–275.

- Frank, J.F., Christen, G.L., Bullerman, L.B. 1993. In Standard Methods for the examination of Dairy Products, 16th ed. (ed. R.J. Marshall). – American Public Health Association, Washington DC, pp. 271–286.
- Granum, P.E. 2005. *Bacillus cereus*. In: Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology (eds. P. Fratamico, A. Bhunia and J. Smith). – Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom, pp. 409–420.
- Gleeson, D., O’Connell, A., Jordan, K., 2013. Review of potential sources and control of thermophilic bacteria in bulk-tank milk. – Irish Journal of Agricultural and Food Research, 52:217–227.
- Flint, S., Brooks, J., Van Den Elzen, H., Bremer, P. 1997. Biofilms in dairy manufacturing plant – a threat to product quality. – Food Technologist, 27:61–64.
- Hantsis-Zacharov, E., Halpern, M. 2007. Culturable Psychrotrophic Bacterial Communities in Raw Milk and Their Proteolytic and Lipolytic Traits. – Applied and Environmental Microbiology, pp. 7162–7168.
- Hinton, A.R. 2003. Thermophiles and Fouling Deposits in Milk Powder Plants. – Dissertation of PhD, New Zealand p. 195.
- Hood, S.K., Zottola, E.A. 1995. Biofilms in food processing. – Food Control, 6:9–18.
- Julien, M.-C., Dion, P., Lafreniere, C., Antoun, H., Drouin, P. 2008. Sources of *Clostridia* in raw milk on farms. – Appl. Environ. Microbiol., 74:6348–6357.
- Krysinski, E.P., Brown, L.J., Marchisello, E.J. 1992. Effect of cleaners and sanitises on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. – Journal of Food Protection, 55:246–251.
- Kumar, C.K., Anand, S.K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: A review. – International Journal of Food Microbiology, 42:9–12.
- Lawrence, J.R., Korber, D.R., Wolfaardt, G.M., Caldwell, D.E. 1995. Behavioural Strategies of Surface-Colonizing Bacteria. – Advances in Microbial Ecology, 14:1–75.
- Lee Wong, A.C. 1998. Biofilms in food processing environments. – Journal of Dairy Science, 81:2765–2770.
- Lehmann, F.L. 1992. Thermophilic-thermophilic bacteria in continuous cheesemaking. – Australian Journal of Dairy Technology, 47:94–96.
- Lehmann, F.L., Solomon, L.S., Russell, P.S., Murphy, K.D., Hull, R.R. 1990. Thermophilic bacteria in pasteurised and ultrafiltration plants. – XXII International Dairy Congress, p. 428.
- Mane, N.V., Gandhi, M.B. 2010. Studies on proteolytic thermophilic psychrotrophic bacteria in milk and fermented milk products. – Journal of Environmental Research and Development, Vol. 5, 2:384–392.
- Marth, E.H., Steele, J.L. 2001. Applied Dairy Microbiology, 2<sup>nd</sup> ed. – Marcel Dekker, New York, p. 1–8.
- McGuiggan, J.T.M., McCleery, D.R., Hannan, A., Gilmour, A. 2002. Aerobic sporeforming bacteria in bulk raw milk: Factors influencing the numbers of psychrotrophic, mesophilic and thermophilic *Bacillus* spores. – Int. J. Dairy Technol., 55:100–107.
- Meer, R.R., Baker, J., Bodyfelt, F.W., Griffiths, M.W. 1991. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products. – A review of J. Food Prot., 54(2), 969–979.
- Megha, S.V., Annadurai, B. 2014. Isolation and Identification of Proteolytic Bacteria from Raw Milk Samples, 3:391–397.
- Miller, R.A., Kent, D.J., Boor, K.J., Martin, N.H., Wiedmann, M. 2015. Different management practices are associated with mesophilic and thermophilic spore levels in bulk tank raw milk. – J. Dairy Sci. 98:4338–4351.
- Parkar, S.G., Flint, S.H., Brooks, J.D. 2001. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. – Journal of Applied Microbiology, 90:901–908.
- Prakash, M., Rajasekar, K., Karmegam, N. 2007. Bacterial population of raw milk and their proteolytic and lipolytic activity. – Res. J. Agr. Biol. Sci., 3(6):848–851.
- Rademacher, B., Walenta, W., Kessler, H.G. 1996. Contamination during pasteurization by biofilms of thermophilic streptococci. – Heat treatments and alternative methods. Proceedings, Brussel, Belgium: International Dairy Federation. p. 26–33.
- Reinemann, D.J., Wolters, G.M., Billon, P., Lind, O., Rasmussen, M.D. 2003. Review of practices for cleaning of milking machines. – International Dairy Federation Bulletin, 381:32–50.
- Şenel, E., Gürsoy, A. 2014. Microbiology of Processed Liquid Milk. – Dairy Microbiology and Biochemistry: Recent Developments, p. 95.
- Sorhaug, T., Stepaniak, L. 1997. Psychrotrophs and their enzymes in milk and dairy products Quality Aspects. – Trends Food Sci. Tech., Cambridge, 8(2):35–41.
- Tadesse M., Berhanu A.G. 1990. A survey of the microflora of raw and pasteurized milk and the source of contamination in a milk processing plant in Addis Ababa, Ethiopia. – J. Dairy Res., 57(2):233–238.
- Vissers, M.M., Te Giffel, M.C., Driehuis, F., De Jong, P., Lankveld, G.J.L. 2007. Predictive modelling of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk during grazing and housing periods. – Journal of Dairy Science, 90:281–29.
- Watterson, M., Kent, D., Boor, K., Wiedmann, M., Martin, N. 2014. Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. – Journal of Dairy Science. 97:2487–2497.
- White, C., Marth, E., Steele, J. 2001. Testing of milk and milk products. – Applied dairy microbiology, ed. 2, 645–680.
- Yangida, F., Suzuki, K-I., Kaneko, T., Kozaki, M., Komagata, K. 1987. Morphological, biochemical and physiological characteristics of spore-forming lactic acid bacteria. – J. Gen. Appl. Microbiol., 33:33–45.

## **Review: Biofilm as a major factor in contamination of milk and dairy products with thermophilic bacteria**

Priit Elias, Epp Songisepp, Andre Veskioja, Kadi Rammul  
*Bio-Competence Centre of Healthy Dairy Products  
Kreutzwaldi 1, 51014 Tartu, Estonia*

### **Summary**

The primary source of thermophilic bacteria for contamination of dairy products is raw milk. Contamination sources of raw milk are the surface of udder, milking-, cooling- and storage equipments.

Thermophilic bacteria are divided on the basis of their physiological characteristics from thermophilic, mesophilic and psychrophilic bacteria.

Special attention in dairy industry are given to *Clostridium* spp., psychrophilic thermophilic bacteria, *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*. Inadequate cleaning and storage of milking equipment may cause formation of biofilm on the surfaces which are in contact with milk.

Thermophilic bacteria in biofilm have favourable conditions for reproduction and returning back to the milk. Bacteria in biofilm are much more resistant to temperatures and chemicals used on cleaning of equipment. Regular cleaning of milking equipment with disinfectants helps to minimize formation of biofilm.

Characteristics of bacteria cells, the cell-surface properties and the properties of fluid suspending of bacteria influenced binding of bacteria in biofilm formed on the surface of the equipment.

Outgrowth of thermophilic bacteria and contamination of processed milk take place from biofilm formed on the surfaces of regeneration and cooling sections of pasteurizers and from biofilms formed on the surfaces of separators and buffer tanks, which were in contact with milk.

Thermophilic bacteria in raw milk undergo the necessary heat treatment and reproducing in biofilms which formed on the surfaces of equipment, they can turn now to the product. Thermophilic bacteria have often negative impact quality of dairy products.