

УДК 579.24+579.262

ОСОБЕННОСТИ ФОРМИРОВАНИЯ БИОПЛЕНОК МИКРООРГАНИЗМАМИ *LISTERIA*, *SALMONELLA* И *PSEUDOMONAS* ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ И РОЛЬ ИХ СИНЕРГИЧЕСКОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ БИОПЛЕНОЧНОГО СООБЩЕСТВА

© 2024 г. Ю. К. Юшина^{а, *}, Е. В. Зайко^а, М. А. Грудистова^а, А. А. Семенова^а,
А. А. Махова^а, Д. С. Батаева^а, Е. В. Демкина^б, Ю. А. Николаев^б

^аФедеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова РАН, Москва, 109316, Россия

^бФедеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН, Институт
микробиологии им. С.Н. Виноградского, Москва, 119071, Россия

*e-mail: yu.yushina@fneps.ru

Поступила в редакцию 24.01.2024 г.

После исправления 07.02.2024 г.

Принята к опубликованию 13.02.2024 г.

Образование биопленок на абиотических поверхностях в пищевом секторе является серьезной проблемой для общественного здравоохранения. Фактически, биопленки представляют собой постоянный источник патогенов, таких как *Listeria monocytogenes* и бактерии рода *Salmonella* sp. Способность к образованию поливидовых биопленок патогенами и микроорганизмами порчи представляет серьезную опасность при производстве безопасной продукции и является одной из причин устойчивой циркуляции микроорганизмов в условиях мясоперерабатывающих предприятий. В ходе работы 46 выделенных из объектов производственной среды и пищевых продуктов штаммов микроорганизмов были протестированы на способность к формированию биопленок при различных температурах. Проанализированные патогенные штаммы (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp.) и микроорганизмы порчи (*Pseudomonas* sp.) обладали адгезией на абиотической поверхности с последующим формированием стойкой биопленки. Низкая положительная температура не являлась ограничивающим фактором в способности образовывать биопленки. Через 24 ч инкубирования представители бактерий родов *Listeria* и *Salmonella* sp. формировали стойкие биопленки при (4°C). Показана способность формировать биопленки на различных абиотических поверхностях, представленных в мясной промышленности (кафель, стекло, пластик). Было изучено синергетическое взаимодействие представителей родов *Listeria*, *Salmonella* и *Pseudomonas* при формировании смешанных биопленок при 4°C. Комбинации патогенного микроорганизма и представителя рода *Pseudomonas* значительно отличались по интенсивности формирования биопленок по сравнению с комбинациями из двух патогенов. Это указывает на значимость этого вида в синергетическом взаимодействии среди микроорганизмов.

Ключевые слова: биопленки, *Listeria monocytogenes*, объекты производственной среды, *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp.

DOI: 10.31857/S0026365624050072

Одной из форм выживания микроорганизмов является их способность к формированию биопленок. Активное изучение проблемы началось в конце XX века, когда стало понятно, что многие заболевания вызваны полимикробными биопленками. До сих пор это направление активно развивается главным образом только в медицине. Биопленки представляют собой сложные экосистемы, обычно состоящие из более чем одного вида микроорганизмов, погруженных во множество внеклеточных

полимеров, в зависимости от взаимодействия между микробными клетками, поверхности фиксации и условий окружающей среды (Ferreira et al., 2014). По зарубежным оценкам перекрестное заражение в результате развития биопленок является риском, вызывающим 25% вспышек пищевых отравлений. Тем не менее до сих пор применяемые санитарные подходы на предприятиях по переработке продуктов питания не только позволяют биопленкам формироваться и созревать, но также

не могут обеспечить их удаление с поверхностей, контактирующих с пищевыми продуктами. Такие структуры обеспечивают защиту, адаптивность и устойчивость микроорганизмов, состоящих в этой матрице, становясь источником загрязнения окружающей среды на пищевых предприятиях и продуктов питания (Kadam et al., 2013; Lee et al., 2017). Бактерии в биопленках, как правило, хорошо защищены от воздействия окружающей среды и антимикробных веществ, таких как антибиотики (Hoiby et al., 2010), дезинфицирующие средства, и, как следствие, их чрезвычайно трудно уничтожить (Burmolle et al., 2010). Особую устойчивость представляют поливидовые биопленки (Wicaksono et al., 2022). Это связано с тем, что они генерируют межвидовые взаимодействия для обмена метаболитами, производства сигнальных молекул и генетического обмена, которые повышают устойчивость (Burmolle et al., 2014; González-Rivas et al., 2018).

Образование биопленок патогенами пищевого происхождения представляет серьезную проблему в пищевой промышленности. Патогенные микроорганизмы способны образовывать биопленки и сохраняться в течение длительного времени, способствуя загрязнению пищевых продуктов. *Salmonella* sp. и *Listeria monocytogenes* являются одними из наиболее важных возбудителей болезней пищевого происхождения во многих странах (Margas et al., 2014). Биопленки *L. monocytogenes* на поверхностях, контактирующих с пищевыми продуктами, были идентифицированы как важный путь персистенции патогенов и последующего загрязнения продукта (Pažin et al., 2018; Rodríguez-Campos et al., 2019). Иногда в сообществах биопленок присутствуют ключевые виды, которые, независимо от их доли, часто участвуют в стимулировании образования биопленки у других видов, а также в защите других членов сообщества от внешних стрессоров (Parijs, Steenackers, 2018; Karki et al., 2021). Бактерии, вызывающие порчу, такие как представители рода *Pseudomonas*, образуют биопленки, которые обеспечивают защитную матрицу для выживших патогенных клеток, и могут перекрестно загрязнять поверхности на различных этапах производства пищевых продуктов (Lindsay et al., 2002). Важным аспектом, который пока еще не до конца изучен, являются межвидовые взаимодействия в биопленках, распространенных в пищевой промышленности. В этой связи углубленное изучение природы образования, обнаружения и синергетического взаимодействия между микроорганизмами имеет высокую значимость для снижения риска возникновения вспышек болезней пищевого происхождения, влияющих на здоровье населения (Jahid, Ha, 2012).

Большинство исследований, проведенных ранее, были сосредоточены на формировании

биопленок патогенами при оптимальных для их роста температурах, которые не являются типичными для производственных помещений на пищевых предприятиях. Однако до сих пор недостаточно информации о способности микроорганизмов формировать биопленки при низких положительных температурах, характерных для пищевых производств, а также о синергетическом взаимодействии различных видов при таких условиях.

Целью исследования было оценить способности бактерий родов *Salmonella*, *Pseudomonas* и *Listeria* (в том числе патогенных *L. monocytogenes*) формировать биопленки на абиотических поверхностях при различных температурах, а также оценить роль синергетического взаимодействия исследуемых штаммов в формировании биопленочного сообщества.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. В качестве объектов исследований были выбраны 46 штаммов различных видов микроорганизмов, выделенных с объектов производственной среды мясоперерабатывающего и птицеперерабатывающего предприятий и мясных продуктов. Из них 22 представителя рода *Pseudomonas*, 15 штаммов *Listeria* sp. (из них 12 штаммов *Listeria monocytogenes*, 2 штамма *Listeria welshimeri* и 1 штамм *Listeria innocua*), 9 штаммов бактерий рода *Salmonella*. Подробное описание источников выделения штаммов представлено в таблице.

Все штаммы были протестированы на их способность образовывать биопленки в монокультуре на полистирольных поверхностях. Образование биопленки бактериями рода *Salmonella* и *Listeria* оценивали при 37°C, оптимальной температуре роста исследуемых микроорганизмов, а также при 4°C – низкой положительной температуре, характерной для помещений на пищевых предприятиях. Образование биопленки бактериями рода *Pseudomonas* оценивали при 4°C.

Для изучения синергетического взаимодействия были сформированы многовидовые биопленки: *Pseudomonas tolaasii* + *Salmonella* sp., S31; *Pseudomonas tolaasii* + *Listeria monocytogenes* 12; *Listeria monocytogenes* 12 + *Salmonella* sp., S31; *Pseudomonas tolaasii* + *Listeria monocytogenes* 12 + *Salmonella* sp., S31.

Определение способности образовывать биопленки. Способность к образованию биопленок изучали *in vitro* в микротитровальных планшетах. Для этого ночную бульонную культуру бактерий разводили в соотношении 1: 100 в LB бульоне (“Becton Dickinson”, США) и вносили по 150 мкл в лунки 96-луночного плоскодонного полистиролового планшета (“Corning”, США). После инкубации в термостате (“Binder”, Германия) при 37°C

Таблица. Характеристика объектов выделения штаммов микроорганизмов, использованных в исследовании

Тип предприятия/ пищевой продукт	Производственное помещение	Объект выделения	Микроорганизм
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Лента транспортера	<i>Listeria monocytogenes</i> (L1)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Внутрицеховая тара	<i>Listeria welshimeri</i> (L2)
Мясоперерабатывающее	Машинное отделение	Клипсатор	<i>Listeria monocytogenes</i> (L3)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Напольная тележка № 1	<i>Listeria monocytogenes</i> (L4)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Напольная тележка № 2	<i>Listeria monocytogenes</i> (L5)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Напольная тележка № 3	<i>Listeria monocytogenes</i> (L6)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Конвейер	<i>Listeria monocytogenes</i> (L7)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Конвейер	<i>Listeria monocytogenes</i> (L8)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Конвейер	<i>Listeria monocytogenes</i> (L9)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Конвейер	<i>Listeria monocytogenes</i> (L10)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Стол из нержавеющей стали (боковая поверхность)	<i>Listeria welshimeri</i> (L11)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Стол из нержавеющей стали (боковая поверхность)	<i>Listeria monocytogenes</i> (L12)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Колесо напольной тележки № 1	<i>Listeria monocytogenes</i> (L13)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Колесо напольной тележки № 2	<i>Listeria monocytogenes</i> (L14)
Мясоперерабатывающее	Сырьевой цех	Колесо напольной тележки № 3	<i>L. innocua</i> (L15)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из свинины (фарш)	<i>Salmonella</i> sp. (S3)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из свинины (фарш)	<i>Salmonella</i> sp. (S10)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из свинины (фарш)	<i>Salmonella</i> sp. (S12)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из свинины и говядины (пельмени)	<i>Salmonella</i> sp. (S17)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из мяса птицы (голень)	<i>Salmonella</i> sp. (S22)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из мяса птицы (филе куриное)	<i>Salmonella</i> sp. (S24)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из свинины (котлета)	<i>Salmonella</i> sp. (S30)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из мяса птицы (голень)	<i>Salmonella</i> sp. (S31)
Пищевой продукт	Цех реализации	Полуфабрикат из свинины (стейк)	<i>Salmonella</i> sp. (S38)
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Внутрицеховая тара	<i>Pseudomonas gessardii</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Металлическая цепь конвейера	<i>Pseudomonas azotoformans</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Лента конвейера упаковочной линии	<i>Pseudomonas mandelii</i>
Птицекомбинат	Цех уоя и первичной обработки тушек, участок потрошения	Цепь конвейера субпродуктов	<i>Pseudomonas marginalis</i>
Птицекомбинат	Цех уоя и первичной обработки тушек, участок удаления пера	Кафельная стена на участке удаления пера	<i>Pseudomonas mendocina</i>

Продолжение таблицы

Тип предприятия/ пищевой продукт	Производственное помещение	Объект выделения	Микроорганизм
Птицекомбинат	Цех убоя и первичной обработки тушек,	Кафельная стена на участке удаления пера	<i>Pseudomonas mosselli</i>
Птицекомбинат	Участок охлаждения парных тушек	Внутрицеховая тара	<i>Pseudomonas orientalis</i>
Птицекомбинат	Участок охлаждения парных тушек	Металлическая цепь конвейера	<i>Pseudomonas proteolytica</i>
Птицекомбинат	Цех убоя и первичной обработки тушек	Участок потрошения, машина перенавески (станина)	<i>Pseudomonas putida</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Лента конвейера упаковочной линии	<i>Pseudomonas savastanoi ssp savastanoi</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Машина для обвалки бедра (конденсат с поверхности машины, не контактирую- щей с продуктом)	<i>Pseudomonas synxantha</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Машина для обвалки бедра (конденсат с поверхности машины, не контактирую- щей с продуктом)	<i>Pseudomonas tolaasii</i>
Птицекомбинат	Цех убоя и первичной обработки тушек	Кафельная стена на участке удаления пера	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Птицекомбинат	Участок охлаждения парных тушек	Внутрицеховая тара	<i>Pseudomonas azotoformans</i>
Птицекомбинат	Участок охлаждения парных тушек	Стена рядом с ванной охлаждения	<i>Pseudomonas brenneri</i>
Птицекомбинат	Участок охлаждения парных тушек	Колесо напольной тележ- ки для транспортирования сырья	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Машина для обвалки бедра (станина)	<i>Pseudomonas fragi</i>
Птицекомбинат	Участок охлаждения парных тушек	Стена рядом с ванной охлаждения	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Лента конвейера упаковочной линии	<i>Pseudomonas gessardii</i>
Птицекомбинат	Участок охлаждения парных тушек	Металлическая цепь конвейера	<i>Pseudomonas grimonti</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Машина для обвалки бедра (конденсат с поверхности машины, не контактирую- щей с продуктом)	<i>Pseudomonas koreensis</i>
Птицекомбинат	Цех разделки и упаковки мяса птицы	Машина для обвалки бедра (конденсат с поверхности машины, не контактирую- щей с продуктом)	<i>Pseudomonas libanensis</i>

во влажной камере, интенсивность роста культуры оценивали в фотометре (Multiskan FC, “Thermo Scientific”, США) при длине волны 540 нм. Затем удаляли планктонные клетки и в лунки вносили по 150 мкл 0.1% раствора кристаллического фиолетового (“Servicebio”, Китай) с экспозицией 1 ч для

окраски сформировавшихся биопленок. После окраски биопленки трижды промывали дистиллированной водой с последующим внесением 150 мкл 96% этанола для экстракции связанного с биопленками красителя. По истечении 1 ч оптическую плотность красителя, экстрагированного спиртом,

измеряли на фотометре при длине волны 540 нм. Контролем служили лунки, заполненные стерильным бульоном. Превышение оптической плотности кристаллического фиолетового над контролем свидетельствовало об образовании бактериями биопленок. Способность штаммов к образованию биопленок (соответственно, и штаммы как продуценты биопленок) классифицировали с использованием следующей шкалы: нет биопленкообразования ($OD_{540} = 0$) → очень слабое ($0 < OD_{540} < 0.2$) → слабое ($0.2 < OD_{540} < 0.4$) → сильное ($0.4 < OD_{540} < 1.0$) → очень сильное ($OD_{540} > 1.0$).

Изучение способности формировать биопленки на различных абиотических поверхностях. Для изучения *in vitro* способности микроорганизмов формировать биопленки на твердых поверхностях заранее подготавливали стерильные образцы подложек (кафель, сталь, серый пластик и белый пластик) размером 0.05×0.05 мм и переносили в стерильные пробирки. Ночную бульонную культуру исследуемых бактерий разводили в соотношении 1: 100 LB бульоне (“Becton Dickinson”, США) и вносили в пробирки с подложками в таких объемах, чтобы жидкость полностью покрывала образцы подложек; инкубирование проводили в термостате (ХТ-3/70; ЗАО “Пять Океанов”, Россия) при 4°C . Для визуализации подложки с бактериями, после инкубации и промывания несколько раз физиологическим раствором, окрашивали флуоресцентными красителями Live/Dead Biofilm Viability Kit (“Thermo Fisher”, США) согласно инструкции и проводили микроскопию на микроскопе с флуоресцентным объективом (BX43F; “Olympus”, Япония). Живые

клетки выявляли по флуоресценции зеленого цвета, а мертвые – красного.

Статистический анализ. Все исследования проводили в двукратной повторности; каждый повтор включал два параллельных опыта. При измерении значения оптической плотности средние значения и экспериментальные ошибки определяли, используя среднее отклонение экспериментальных значений от функции среднего значения с помощью Microsoft Office Excel 2010. Различия между значениями считались значимыми, если они превышали уровень экспериментальной ошибки (обычно 20% или менее), в соответствии с *t*-критерием Стьюдента для $p = 0.05$. Результаты были рассчитаны как “среднее значение \pm стандартная ошибка”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В общей сложности 46 бактериальных штаммов, циркулирующих в мясной и птицеперерабатывающей промышленности на объектах производственной среды и различных пищевых продуктах, были протестированы на их способность образовывать биопленки в монокультуре на полистирольных поверхностях. Образование биопленки изолятами оценивали при 37°C – оптимальной температуре роста исследуемых микроорганизмов. В результате оценки биопленкообразующей способности при температуре 37°C среди представителей бактерий рода *Listeria* установлено, что все штаммы *Listeria* sp. формировали слабые или сильные биопленки в течение 24 ч культивирования (рис. 1). Такой способностью обладали не только непатогенные виды

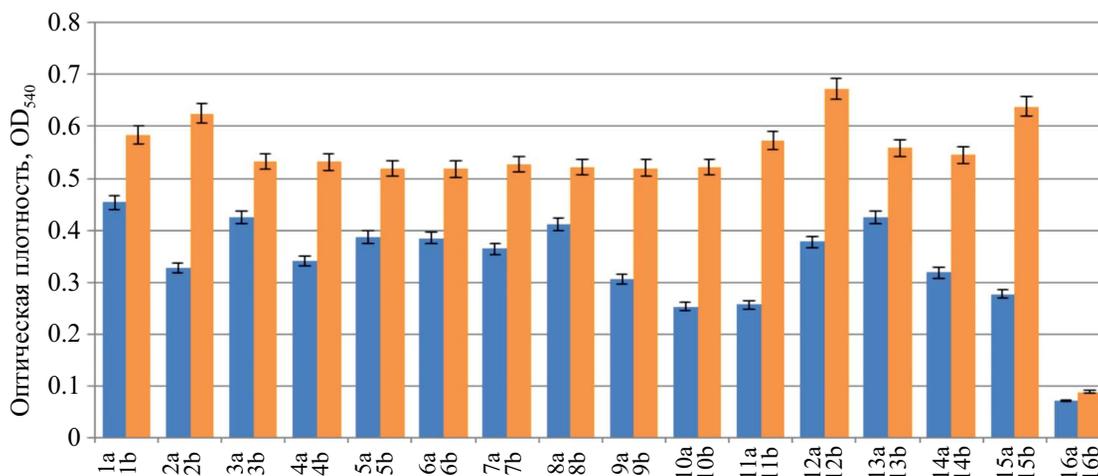


Рис. 1. Формирование биопленок при температуре 37°C бактериями рода *Listeria*, циркулирующими в мясной промышленности: а – 24 ч инкубирования, б – 72 ч инкубирования; 1 – *Listeria monocytogenes* (L1), 2 – *L. welshimeri* (L2), 3 – *L. monocytogenes* (L3), 4 – *L. monocytogenes* (L4), 5 – *L. monocytogenes* (L5), 6 – *L. monocytogenes* (L6), 7 – *L. monocytogenes* (L7), 8 – *L. monocytogenes* (L8), 9 – *L. monocytogenes* (L9), 10 – *L. monocytogenes* (L10), 11 – *L. welshimeri* (L11), 12 – *L. monocytogenes* (L12), 13 – *L. monocytogenes* (L13), 14 – *L. monocytogenes* (L14), 15 – *L. innocua* (L15), 16 – контроль.

листерий, такие как *Listeria welshimeri* и *Listeria innocua*, но и патогенные – *L. monocytogenes*.

Было отмечено, что при 37°C время инкубирования напрямую влияло на интенсивность формирования биопленок. Адгезия микроорганизмов увеличивалась с увеличением времени культивирования. По истечении 72 ч все 15 штаммов листерий продемонстрировали сильную способность к образованию биопленок.

Salmonella sp. являются одним из наиболее важных возбудителей болезней пищевого происхождения во многих странах, включая Россию. Биопленкообразующая способность штаммов *Salmonella* sp. также зависела от времени инкубирования (рис. 2). При скрининге 9 штаммов *Salmonella* sp. в планшетах для микротитрования было обнаружено, что значения OD_{540} варьировало через 24 ч от 0.292 до 0.490, через 48 ч от 0.351 до 0.634 и через 96 ч – от 0.489 до 1.512.

Увеличение времени инкубирования приводило к большему накоплению биомассы культуры. Среди сальмонелл были выделены 3 штамма S10, S12 и S22 с очень сильной биопленкообразующей способностью (оптическая плотность через 96 ч выращивания – более 1.0). Было отмечено, что среди большинства штаммов *Salmonella* sp. максимальный скачок в накоплении биомассы биопленок происходил после 48 ч культивирования.

Влияние температуры на скорость формирования биопленки. Немаловажное значение в формировании биопленок играет температура. Обычно температура в производственных цехах по переработке мяса, в том числе мяса птицы, составляет не выше 12°C. На многих предприятиях, в целях увеличения сроков годности конечной продукции, в производственных помещениях, где проводятся операции

по переработке сырья, температура воздуха снижена до 4–8°C. Изучение возможности формирования биопленок при низких положительных температурах вносит вклад в понимание механизмов выживания и распространения патогенных микроорганизмов по цепочке производства пищевой продукции. В этой связи способность к образованию биопленки у исследуемых микроорганизмов была оценена при температуре 4°C, имитируя условия окружающей среды на мясоперерабатывающих предприятиях и птицекомбинатах.

Низкая положительная температура (4°C) не являлась ограничивающим фактором в способности образовывать биопленки. Через 24 ч инкубирования представители бактерий рода *Listeria*, в том числе патогенные *Listeria monocytogenes*, формировали стойкие биопленки при низкой положительной температуре (рис. 3).

В первые сутки культивирования при 4°C все штаммы формировали слабые или сильные биопленки, при этом 4 штамма показали себя сильными продуцентами биопленок, в соответствии с выше представленной шкалой. У трех штаммов *Listeria monocytogenes* 10, *L. monocytogenes* 11 и *L. monocytogenes* 15 скорость формирования биопленки была выше при 4°C, чем при 37°C.

Listeria monocytogenes, один из основных патогенов пищевой промышленности, вызывает озабоченность в отношении безопасности пищевых продуктов из-за его способности образовывать биопленку и сохраняться как на объектах пищевой промышленности, так и в пищевых продуктах. Способность *L. monocytogenes* формировать биопленки при низких температурах, соответствующих условиям внешней среды при переработке и хранении пищевых продуктов, повышает вероятность

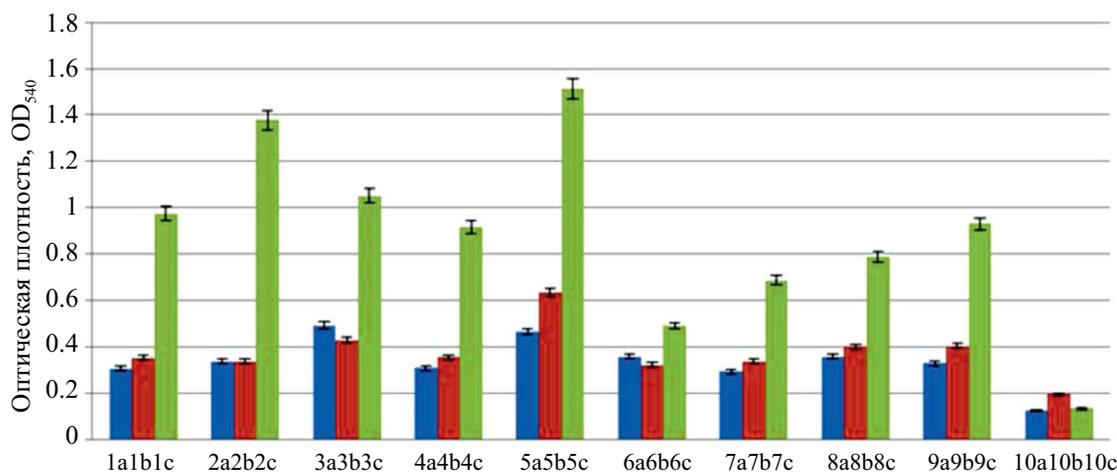


Рис. 2. Формирование биопленок при температуре 37°C бактериями рода *Salmonella*, циркулирующими в мясной промышленности: а – 24 ч инкубирования, б – 48 ч инкубирования, с – 96 ч инкубирования; 1 – *Salmonella* sp. (S3), 2 – *Salmonella* sp. (S10), 3 – *Salmonella* sp. (S12), 4 – *Salmonella* sp. (S17), 5 – *Salmonella* sp. (S22), 6 – *Salmonella* sp. (S24), 7 – *Salmonella* sp. (S30), 8 – *Salmonella* sp. (S31), 9 – *Salmonella* sp. (S38), 10 – контроль.

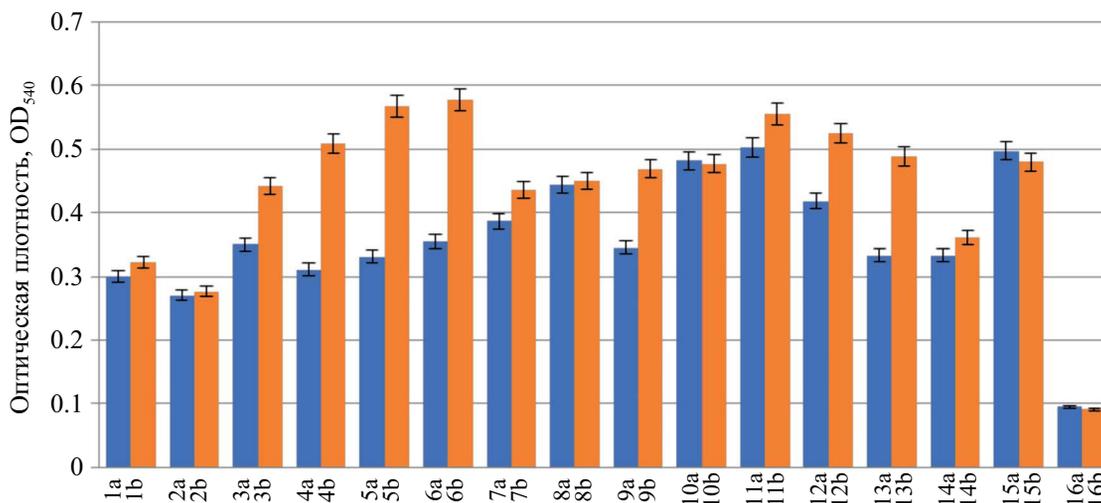


Рис. 3. Формирование биопленок при температуре 4°C бактериями рода *Listeria*, циркулирующими в мясной промышленности: а – 24 ч инкубирования, б – 48 ч инкубирования; 1 – *Listeria monocytogenes* (L1), 2 – *L. welshimeri* (L2), 3 – *L. monocytogenes* (L3), 4 – *L. monocytogenes* (L4), 5 – *L. monocytogenes* (L5), 6 – *L. monocytogenes* (L6), 7 – *L. monocytogenes* (L7), 8 – *L. monocytogenes* (L8), 9 – *L. monocytogenes* (L9), 10 – *L. monocytogenes* (L10), 11 – *L. welshimeri* (L11), 12 – *L. monocytogenes* (L12), 13 – *L. monocytogenes* (L13), 14 – *L. monocytogenes* (L14), 15 – *L. innocua* (L15), 16 – контроль.

перекрестного загрязнения. Фенотип биопленки листерий характеризуется повышенной устойчивостью к воздействию окружающей среды, включая устойчивость к антибиотикам и другим дезинфицирующим средствам, что вызывает ряд проблем в здравоохранении, пищевой промышленности и других областях. Проведенные исследования показали, что *L. monocytogenes* способна формировать биопленки уже за сутки при температуре всего 4°C.

На предприятиях пищевой промышленности потенциальными источниками загрязнения *L. monocytogenes* являются абиотические поверхности производственной среды, такие как стены и пол, системы очистки воздуха, вспомогательное оборудование (Ciccio et al., 2012). На формирование биопленки *L. monocytogenes* влияет множество условий: температура окружающей среды (Bonaventura et al., 2008; Moltz, Martin, 2005), характер адгезионной поверхности и ее гидрофобность (Midelet et al., 2006). В аналогичном исследовании Di Bonaventura et al. (2008) проанализировали образование биопленки 44 различными изолятами *L. monocytogenes* на разных поверхностях при четырех температурах (4, 12, 22 и 37°C). Согласно полученным результатам, *L. monocytogenes* были способны образовывать биопленки при 4 и 12°C с более высокой интенсивностью на стекле по сравнению с более гидрофобной нержавеющей сталью и полистиролом. С другой стороны, Bonsaglia et al. (2014) наблюдали образование биопленки при температурах, подобных температуре холодильных камер (4°C) на разных поверхностях, с более высоким уровнем биопленкообразования на нержавеющей стали

и стекле по сравнению с полистиролом. Также Norwood, Gilmour (2001) сообщили о двух изолятах *L. monocytogenes*, которые обладали одинаковой способностью к адгезии при 4 и 30°C.

Исследованные штаммы бактерий рода *Salmonella* sp. обладали способностью формировать биопленки при 4°C, в целом, незначительно уступавшей способности, продемонстрированной при 37°C (рис. 4).

Способность к образованию биопленки *Salmonella* sp. в зависимости от времени инкубирования варьировала от слабой до сильной. Через 48 ч инкубирования только два штамма – *Salmonella* sp. S12 и *Salmonella* sp. S22 – были отнесены к сильным продуцентам биопленок. Однако к 96 ч инкубирования только один штамм S30 оставался слабым продуцентом биопленки. Оставшиеся штаммы продемонстрировали прирост биомассы и являлись сильными и очень сильными продуцентами биопленок. Было отмечено, что для формирования биопленок бактериями рода *Salmonella* необходимо более длительное время. Снижение температуры инкубации может уменьшить рост бактерий, но также может способствовать образованию биопленки, поскольку штаммы способны экспрессировать компоненты, которые не были продуцированы в других благоприятных условиях, однако для этого может быть необходимо более длительное время (Stepanović et al., 2003; Lianou, Koutsoumanis, 2012).

Несмотря на медленное формирование биопленочных сообществ штаммами *Salmonella* sp., другими авторами также была установлена

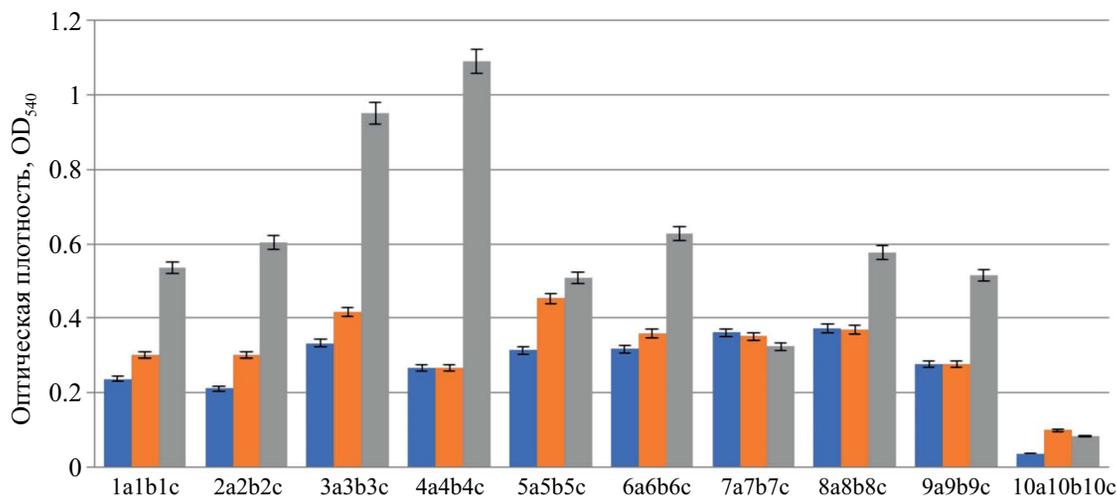


Рис. 4. Формирование биопленок при температуре 4°C бактериями рода *Salmonella*, циркулирующими в мясной промышленности: а – 24 ч инкубирования, б – 48 ч инкубирования, с – 96 ч инкубирования; 1 – *Salmonella* sp. (S3), 2 – *Salmonella* sp. (S10), 3 – *Salmonella* sp. (S12), 4 – *Salmonella* sp. (S17), 5 – *Salmonella* sp. (S22), 6 – *Salmonella* sp. (S24), 7 – *Salmonella* sp. (S30), 8 – *Salmonella* sp. (S31), 9 – *Salmonella* sp. (S38), 10 – контроль.

способность сальмонелл образовывать биопленки при низких положительных температурах. Так, показана возможность формирования биопленки у 39.5% исследуемых штаммов при 3°C – температуре, соответствующей холодильному хранению пищевых продуктов (Borges et al, 2018).

Способность к адгезии на различных поверхностях проявляют не только патогенные микроорганизмы, но и условно-патогенные, например, представители рода *Pseudomonas*. Бактерии рода *Pseudomonas* легко образуют биопленки на различных типах поверхностей (Masák et al., 2014). В проведенном исследовании все штаммы *Pseudomonas* sp. проявляли сильную способность к адгезии на абиотической поверхности через 48 ч (рис. 5). Значение OD₅₄₀ варьировало от 0.495 до 0.997. Увеличение времени культивирования проводило к дальнейшему формированию и нарастанию биопленки. После 72 ч инкубирования 4 представителя *Pseudomonas* показали способность к очень сильному образованию биопленок (OD₄₅₀ > 1.0).

Увеличение времени инкубирования до 72 ч не у всех исследуемых штаммов сопровождалось увеличением биомассы. У 9 видов *Pseudomonas gessardii*, *P. mandell*, *P. marginalis*, *P. mendocina*, *P. mosselli*, *P. orientalis*, *P. proteolytica*, *P. putida*, *P. savastanoi* spp., *P. synxantha*, *P. tolaasii*, *P. aeruginosa*, *P. azotoformans*, *P. brenneri*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. fuscovaginae* с 48 до 72 ч культивирования прирост биомассы происходил не более, чем на 0.1 единицу оптической плотности. В то же время у двух штаммов *P. aeruginosa* и *P. azotoformans* значение оптической плотности увеличилось более, чем в 2 раза,

что свидетельствовало об интенсивном формировании биопленок. Тем не менее все исследуемые представители *Pseudomonas* sp. были отнесены к сильным продуцентам биопленок.

Для подтверждения формирования биопленок были сформированы биопленки при 4°C на стеклянной поверхности с дальнейшим окрашиванием флуоресцентными красителями, позволяющими дифференцировать живые и мертвые клетки. С помощью флуоресцентной микроскопии было подтверждено, что изучаемые микроорганизмы формировали биопленки на стеклянной поверхности (рис. 6).

Поскольку биопленки могут присутствовать на абиотических поверхностях пищевых производств, была изучена способность формирования биопленки (на примере патогенной *Listeria monocytogenes* 12) на материалах, разрешенных для производственной среды предприятий и широко применяемых для изготовления разделочных досок, столешниц, раковин, технологического и вспомогательного оборудования и пр. В качестве таких материалов были выбраны кафель, нержавеющей сталь и два вида пластика (белый и серый). Снимки, полученные с помощью флуоресцентной микроскопии и подтверждающие формирование биопленок, представлены на рис. 7.

Как показано на рис. 7, биопленки, сформированные *Listeria monocytogenes* 12, демонстрировали зеленую флуоресценцию, что свидетельствовало о наличии “живых” микроорганизмов. Клетки равномерно распределялись на различных абиотических поверхностях через 24 ч после начала образования биопленки.

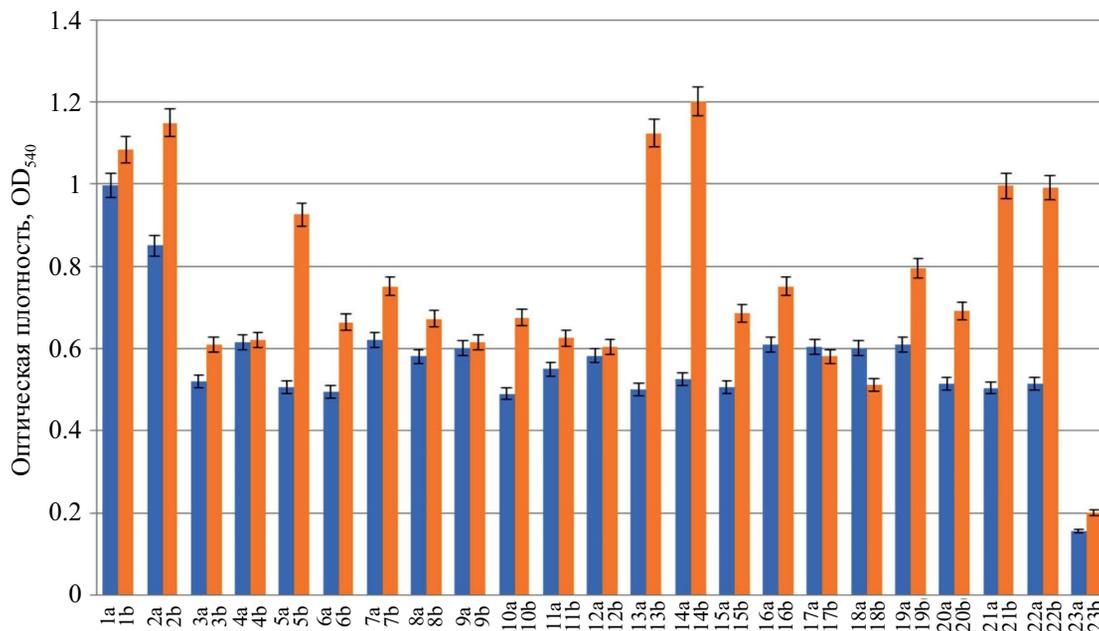


Рис. 5. Формирование биопленок при температуре 4°C бактериями рода *Pseudomonas*, циркулирующими в мясной промышленности: а – 48 ч инкубирования, б – 72 ч инкубирования; 1 – *Pseudomonas gessardii*, 2 – *P. azotoformans*, 3 – *P. mandell*, 4 – *P. marginalis*, 5 – *P. mendocina*, 6 – *P. mosselli*, 7 – *P. orientalis*, 8 – *P. proteolytica*, 9 – *P. putida*, 10 – *P. savastanoi* spp, 11 – *P. synxantha*, 12 – *P. tolaasii*, 13 – *P. aeruginosa*, 14 – *P. azotoformans*, 15 – *P. brenneri*, 16 – *P. fluorescens*, 17 – *P. fragi*, 18 – *P. fuscovaginae*, 19 – *P. gessardii*, 20 – *P. grimonti*, 21 – *P. koreensis*, 22 – *P. libanensis*, 23 – контроль.

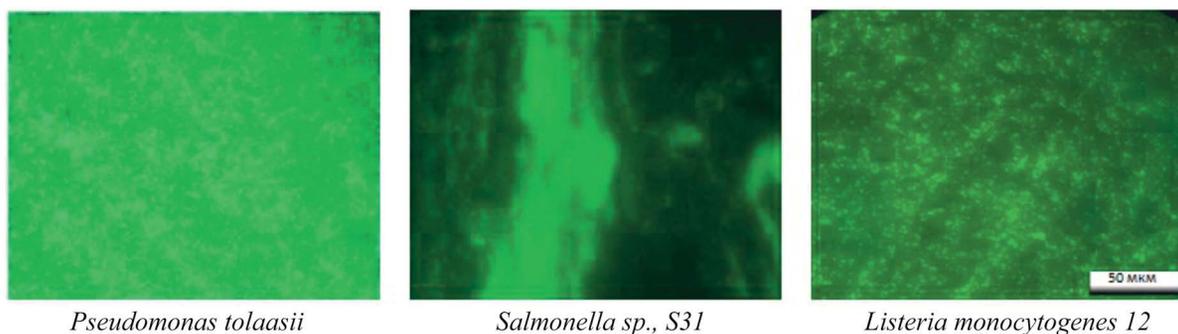


Рис. 6. Биопленки микроорганизмов на поверхности стекла, сформированные в течение 24 ч при 4°C. Флуоресцентная микроскопия, краситель SYTO® 9. Масштабная линейка – 50 мкм.

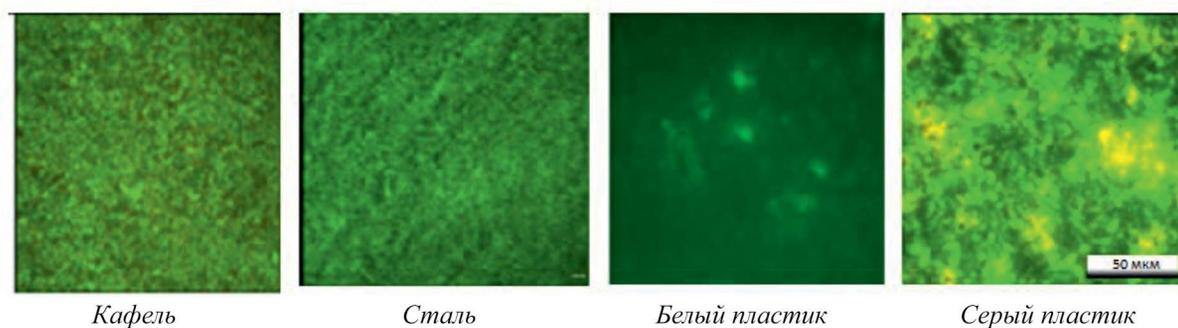


Рис. 7. Биопленки *Listeria monocytogenes* 12, сформированные на различных абиотических поверхностях в течение 24 ч при 4°C. Масштабная линейка – 50 мкм.

Роль синергического взаимодействия различных штаммов в формировании биопленочного сообщества. В природе биопленки обычно состоят из нескольких видов бактерий, включая как патогены пищевого происхождения, так и условно-патогенные микроорганизмы. Лучшее понимание синергического взаимодействия между видами и того, как эффективно удалять биопленки смешанных видов с абиотических поверхностей на предприятиях пищевой промышленности, может помочь снизить риск загрязнения пищевых продуктов. Было изучено образование биопленок смешанных видов представителей родов *Listeria* (b), *Salmonella* (c) и *Pseudomonas* (a) при 4°C (рис. 8).

Развитие биопленки при совместном культивировании представителей родов *Pseudomonas* и *Salmonella* значительно усиливалось, особенно через 48 ч (рис. 8). Вероятнее всего, это связано с более интенсивной способностью *Pseudomonas* как к росту, так и к формированию биопленки. Смешанные биопленки, в состав которых входит *Pseudomonas* sp., развивались быстрее и достигали больших значений OD₅₄₀, чем моновидовые биопленки патогенных микроорганизмов. Через 24 ч инкубирования наибольшая синергия (увеличение массы биопленки) в биопленках наблюдалась в комбинации АВ, АС и АВС, в состав которых входил *Pseudomonas tolaasii*, который был способен быстро образовывать сильную биопленку в монокультуре. При увеличении времени инкубирования до 48 ч, по-прежнему наибольший синергический эффект наблюдался в тех же комбинациях. Смешанная биопленка *Salmonella* sp., S31 + *Listeria*

monocytogenes 12 обладала наименьшей синергией, как через 24, так и через 48 ч культивирования. Биопленка из комбинации двух патогенных микроорганизмов была более интенсивна по сравнению с их монобиопленками, однако комбинации патогенного микроорганизма и представителя рода *Pseudomonas* значительно отличались по интенсивности формирования биопленок. Это указывает на значимость этого вида в синергическом взаимодействии среди микроорганизмов в процессе образования биопленок.

Изучение синергических и негативных взаимодействий в биопленках ведется постоянно. Недавние исследования показали, как присутствие определенных видов бактерий в сообществе значительно влияет на потенциал формирования биопленки или на рост других видов либо в результате кооперативного, либо конкурентного взаимодействия. Например, было показано, что присутствие антагонистических веществ, продуцируемых штаммами *B. cereus*, негативно влияло на рост *Listeria monocytogenes* в двухвидовых биопленках (Alonso et al., 2020). В другом исследовании сообщалось, что *Pseudomonas putida*, вид бактерий, обитающий в системах питьевой воды на птицефермах, ингибирует рост и образование биопленки *Salmonella java* в смешанной культуре (Maes et al., 2020). Штаммы *L. monocytogenes* пищевого происхождения демонстрируют значительные различия в конкурентном росте в различных условиях биопленки со смешанными видами (Heir et al., 2018). Наши результаты показали, что синергические взаимодействия в многовидовых биопленках зависят от видового состава. Sadiq

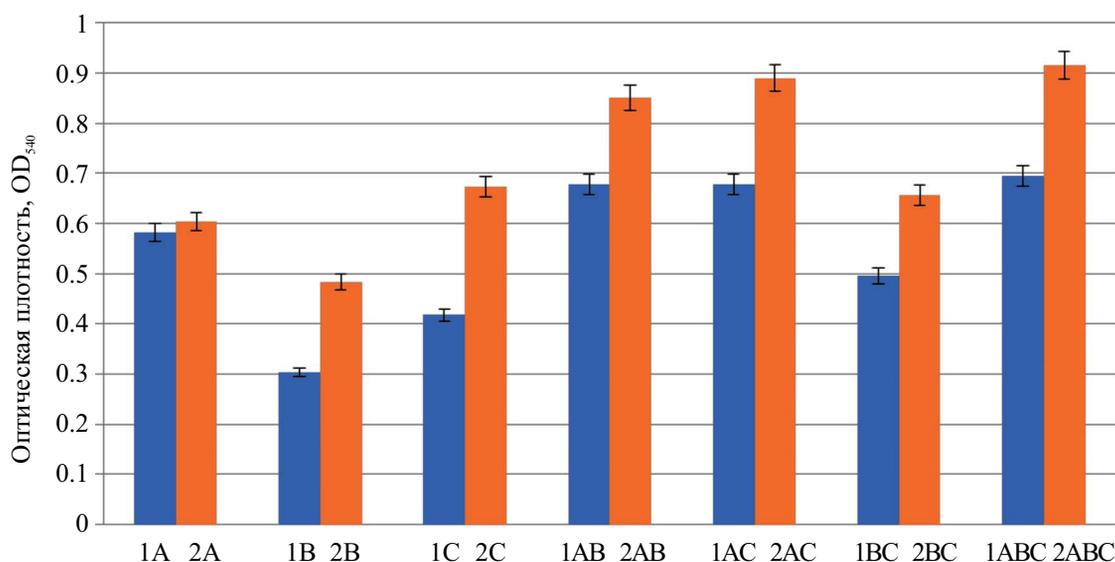


Рис. 8. Синергические взаимодействия при формировании биопленок трех видов штаммов при температуре 4°C: 1 – 24 ч инкубирования, 2 – 48 ч инкубирования; А – *Pseudomonas tolaasii*; В – *Salmonella* sp. (S31); С – *Listeria monocytogenes* (L12).

et al. (2023) при исследовании многовидовых биопленок, образованных изолятами, полученными из производственной среды мясоперерабатывающих предприятий, установили, что *P. azotoformans* способствовал образованию синергетической биопленки чаще, чем другие, поскольку он являлся частью всех четырех видовых комбинаций биопленок, демонстрирующих более высокий синергизм (Sadiq et al., 2023).

Выявленная способность к формированию биопленок у всех исследуемых штаммов может привести к усилению патогенности и провоцировать проблемы с безопасностью пищевых продуктов. В проведенном исследовании было отмечено, что на образование биопленки исследуемыми микроорганизмами влияли как температура инкубации, так и время. Биопленки патогенных *Salmonella* sp. и *Listeria monocytogenes* с $OD_{540} > 0.4$ могут быть получены при 4°C уже через 24 ч инкубации. *L. monocytogenes* и представители бактерий рода *Salmonella* способны образовывать биопленки и сохраняться в течение длительного времени, способствуя загрязнению пищевых продуктов (Doijad et al., 2015; Borges et al., 2018). Смешанные биопленки, включая патогенные и непатогенные виды, проявляют большую устойчивость к воздействию физических и химических факторов (Li et al., 2021). Для контроля присутствия и образования такой устойчивой формы патогенов должны применяться эффективные стратегии предотвращения или уничтожения биопленок.

Помимо использования оптических методов, в данном исследовании были использованы и микроскопические методы (флуоресцентная микроскопия) оценки возможности формирования биопленок на нержавеющей стали, стекле и пластике. Таким образом, в результате двух подходов была показана возможность формирования биопленок на абиотических поверхностях из различных материалов, применяемых в пищевой промышленности.

Все комбинации биопленок, продемонстрировавшие заметную синергию, имели в составе представителя рода *Pseudomonas*, что может указывать на наличие ключевых отраслевых видов бактерий, которые стимулируют синергию или антагонизм, и это может иметь значение для контроля биопленок в соответствующих отраслях пищевой промышленности.

Полученные данные по способности исследованных штаммов к формированию биопленок в течение 24 ч при низкой положительной температуре показали, что для объективной характеристики микробного сообщества производственной среды пищевых предприятий необходимо, наряду с отбором и изучением планктонной микрофлоры, проводить отбор и исследование биопленочных форм.

В результате исследований подтверждено образование биопленок всеми штаммами родов

Listeria, *Salmonella* и *Pseudomonas*, выделенными из производственной среды мясоперерабатывающих и птицеперерабатывающих предприятий, а также из мясной продукции. Определено влияние времени инкубирования при низких положительных температурах на скорость образования и оптическую плотность биопленок у исследованных штаммов микроорганизмов. Показано, что *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp. и *Pseudomonas* sp. способны формировать биопленки в монокультуре при низкой положительной температуре (4°C). Установлена значимость представителя рода *Pseudomonas* в синергетическом взаимодействии микроорганизмов при формировании многовидовых биопленок. Результаты проведенных исследований имеют высокую значимость для пересмотра гигиенических планов предприятий и повышения микробиологической безопасности мясной продукции, в том числе, изготовленной из мяса птицы.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит результатов исследований, в которых в качестве объектов использовались люди или животные.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alonso V.P.P., Harada A.M.M., Kabuki D.Y. Competitive and/or cooperative interactions of listeria monocytogenes with *Bacillus cereus* in dual-species biofilm formation // Front. Microbiol. 2020. V. 11. Art. 177. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00177>
- Bonsaglia E.C.R., Silva N.C.C., Fernandes J.A., Araújo Júnior J.P., Tsunemi M.H., Rall V.L.M. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures // Food Control. 2014. V. 35. P. 386–391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.023>
- Borges K.A., Furian Th.Q., Souza S.N., Menezes R., Ton-do E.C., Salle C.T.P., Moraes H.L.S., Nascimento V.P. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions // Pesq. Vet. Bras. 2018. V. 38. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-4928>
- Burmölle M., Ren D., Bjarnsholt T., Sørensen S.J. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? // Trends Microbiol. 2014. V. 22. P. 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.004>
- Burmölle M., Thomsen T.R., Fazli M., Dige I., Christensen L., Homøe P., Tvede M., Nyvad B., Tolker-Nielsen T.,

- Givskov M., Moser C., Kirketerp-Møller K., Johansen H.K., Høiby N., Jensen P.Ø., Sørensen S.J., Bjarneholt T. Biofilms in chronic infections – a matter of opportunity – monospecies biofilms in multispecies infections // FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2010. V. 59. P. 324–336.
- Di Bonaventura G., Piccolomini R., Paludi D., D’Orio V., Vergara A., Conter M., Ianieri A. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity // J. Appl. Microbiol. 2008. V. 104. P. 1552–1561.
- Di Ciccio P., Conter M., Zanardi E., Ghidini S., Vergara A., Paludi D., Festino A.R., Ianieri A. *Listeria monocytogenes*: biofilms in food processing // Ital. J. Food Sci. 2012. V. 24. P. 203–213.
- Doijad S.P., Barbudde S.B., Garg S., Poharkar K.V., Kalorey D.R., Kurkure N.V., Rawool D.B., Chakraborty T. biofilm-forming abilities of *Listeria monocytogenes* serotypes isolated from different sources // PLoS One. 2015. V. 10. Art. e0137046.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137046>
- Ferreira V., Wiedmann M., Teixeira P., Stasiewicz M.J. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health // J. Food Protect. 2014. V. 77. P. 150–170.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>
- González-Rivas F., Ripolles-Avila C., Fontecha-Umaña F., Ríos-Castillo A.G., Rodríguez-Jerez J.J. Biofilms in the spotlight: detection, quantification, and removal methods // Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. 2018. V. 17. P. 1261–1276.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12378>
- Heir E., Møretrø T., Simensen A., Langsrud S. *Listeria monocytogenes* strains show large variations in competitive growth in mixed culture biofilms and suspensions with bacteria from food processing environments // Int. J. Food Microbiol. 2018. V. 275. P. 46–55.
- Høiby N., Bjarneholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms // Int. J. Antimicrob. Agents. 2010. V. 35. P. 322–332.
- Jahid I.K., Ha S. A review of microbial biofilms of produce: future challenge to food safety // Food Sci. Biotechnol. 2012. V. 21. P. 299–316.
<https://doi.org/10.1007/s10068-012-0041-1>
- Kadam S.R., den Besten H.M., van der Veen S., Zwietering M.H., Moezelaar R., Abee T. Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin // Int. J. Food Microbiol. 2013. V. 165. P. 259–264.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.025>
- Karki A.B., Ballard K., Harper C., Sheaff R.J., Fakhr M.K. *Staphylococcus aureus* enhances biofilm formation, aerotolerance, and survival of campylobacter strains isolated from retail meats // Sci. Rep. 2021. V. 11. Art. 13837.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-91743-w>
- Lee B.H., Hébraud M., Bernardi T. Increased adhesion of *Listeria monocytogenes* strains to abiotic surfaces under cold stress // Front. Microbiol. 2017. V. 8. Art. 2221.
- Li Q., Liu L., Guo A., Zhang X., Liu W., Ruan Y. Formation of multispecies biofilms and their resistance to disinfectants in food processing environments: a review // J. Food Protect. 2021. V. 84. P. 2071–2083.
<https://doi.org/10.4315/JFP-21-071>
- Lianou A., Koutsoumanis K.P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions // Int. J. Food Microbiol. 2012. V. 160. P. 171–178.
- Lindsay D., Brözel V.S., Mostert J.F., von Holy A. Differential efficacy of a chlorine dioxide-containing sanitizer against single species and binary biofilms of a dairy-associated *Bacillus cereus* and a *Pseudomonas fluorescens* isolate // J. Appl. Microbiol. 2002. V. 92. P. 352–361.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01538.x>
- Maes S., De Reu K., Van Weyenberg S., Lories B., Heyndrickx M., Steenackers H. *Pseudomonas putida* as a potential biocontrol agent against salmonella Java biofilm formation in the drinking water system of broiler houses // BMC Microbiol. 2020. V. 20. Art. 373.
- Margas E., Meneses N., Conde-Petit B., Dodd C.E., Holah J. Survival and death kinetics of *Salmonella* strains at low relative humidity, attached to stainless steel surfaces // Int. J. Food Microbiol. 2014. V. 187. P. 33–40.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.027>
- Masák J., Čejková A., Schreiberová O., Rezanka T. *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control // FEMS Microbiol. Ecol. 2014. V. 89. P. 1–14.
- Midelet G., Kobilinsky A., Carpentier B. Construction and analysis of fractional multifactorial designs to study attachment strength and transfer of *Listeria monocytogenes* from pure or mixed biofilms after contact with a solid model food // Appl. Environ. Microbiol. 2006. V. 72. P. 2313–2321.
- Moltz A.G., Martin S.E. Formation of biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions // J. Food Protect. 2005. V. 68. P. 92–97.
- Norwood D.E., Gilmour A. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature // Lett. Appl. Microbiol. 2001. V. 33. P. 320–324.
- Parijs I., Steenackers H.P. Competitive inter-species interactions underlie the increased antimicrobial tolerance in multispecies brewery biofilms // ISME J. 2018. V. 12. P. 2061–2075.
<https://doi.org/10.1038/s41396-018-0146-5>
- Pažin V., Jankuloski D., Kozačinski L., Dobranić V., Njari B., Cvrtić Ž., Lorenzo J.M., Zdolec N. Tracing of *Listeria monocytogenes* contamination routes in fermented sausage production chain by pulsed-field gel electrophoresis typing // Foods (Basel). 2018. V. 7. Art. 198.
<https://doi.org/10.3390/foods7120198>
- Rodríguez-Campos D., Rodríguez-Melcón C., Alonso-Calleja C., Capita R. Persistent *Listeria monocytogenes*

- isolates from a poultry-processing facility form more biofilm but do not have a greater resistance to disinfectants than sporadic strains // *Pathogens* (Basel). 2019. V. 8. Art. 250.
<https://doi.org/10.3390/pathogens8040250>
- Sadiq F.A., De Reu K., Burmølle M., Maes S., Heyndrickx M. Synergistic interactions in multispecies biofilm combinations of bacterial isolates recovered from diverse food processing industries // *Front. Microbiol.* 2023. V. 14. Art. 1159434.
- Stepanović S., Ćirković I., Mijač V., Švabić-Vlahović M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp // *Food Microbiol.* 2003. V. 20. P. 339–343.
- Wicaksono W.A., Erschen S., Krause R., Müller H., Cerna-va T., Berg G. Enhanced survival of multi-species biofilms under stress is promoted by low-abundant but antimicrobial-resistant keystone species // *J. Hazard. Mater.* 2022. V. 422. Art. 126836.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126836>

EXPERIMENTAL ARTICLES

Patterns of Biofilm Formation by Members of *Listeria*, *Salmonella*, and *Pseudomonas* at Various Temperatures and the Role of Their Synergistic Interactions in the Formation of Biofilm Communities

Yu. K. Yushina¹*, E. V. Zaiko¹, M. A. Grudistova¹, A. A. Semenova¹,
 A. A. Makhova¹, D. S. Bataeva¹, E. V. Demkina², and Yu. A. Nikolaev²

¹Federal Scientific Center for Food Systems named after V.M. Gorbatov RAS, Moscow, 109316, Russia

²Federal Research Center “Fundamentals of Biotechnology” RAS, Winogradsky Institute of Microbiology, Moscow, 119071, Russia

*e-mail: yu.yushina@fneps.ru

Abstract. Biofilm formation on abiotic surfaces in the food sector is a major public health concern. In fact, biofilms represent a constant source of pathogens such as *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. The ability for the formation of multispecies biofilms by pathogens and spoilage microorganisms poses a serious danger in the production of safe products and is one of the reasons for the stable circulation of microorganisms in meat processing plants. During the work, 46 strains of microorganisms isolated from industrial environments and food products were tested for the ability to form biofilms at different temperatures. The analyzed pathogenic strains (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp.) and spoilage microorganisms (*Pseudomonas* sp.) had adhesion to the abiotic surface with subsequent formation of a persistent biofilm. Low positive temperature was not a limiting factor in the ability to form biofilms. After 24 hours of incubation, representatives of bacteria of the genera *Listeria* and *Salmonella* sp. formed persistent biofilms at (4°C). The ability to form biofilms on various abiotic surfaces found in the meat industry (tiles, glass, plastic) has been demonstrated. The synergistic interaction of representatives of the genera *Listeria*, *Salmonella* and *Pseudomonas* during the formation of mixed biofilms at 4°C was studied. Combinations of a pathogen and a member of the genus *Pseudomonas* differed significantly in the intensity of biofilm formation compared to combinations of two pathogens. This indicates the importance of this species in synergistic interactions among microorganisms.

Keywords: biofilms, *Listeria monocytogenes*, industrial environment objects, *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp.