

DOI 10.7251/VETJSR2401072G

UDK 636.52/.58.082.47:579.68

Оригинални научни рад

МИКРОБИОЛОШКИ СТАТУС ВОДЕ ЗА ПИЋЕ СА БРОЈЛЕРСКИХ ФАРМИ И СПОСОБНОСТ СТВАРАЊА БИОФИЛМА ИЗОЛОВАНИХ ПАТОГЕНИХ БАКТЕРИЈА

Бојан ГОЛИЋ^{1*}, Александра ШМИТРАН², Љиљана БОЖИЋ², Драган КНЕЖЕВИЋ¹, Дејана КРНЕТА¹, Горан ВАСИЛИЋ¹, Дејан ЛАУШЕВИЋ³, Жељко ЦВЕТНИЋ⁴, Драго Н. НЕДИЋ⁵

¹Јавна установа Ветеринарски институт Републике Српске „Др Васо Бутозан“, Бања Лука, Босна и Херцеговина

²Универзитет у Бањој Луци, Медицински факултет, Бања Лука, Босна и Херцеговина

³Специјалистичка ветеринарска лабораторија, Подгорица, Црна Гора

⁴Хрватска академија знаности и умјетности, Загреб, Хрватска

⁵Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине, Београд, Србија

*Коресподентни аутор: Бојан Голић, bojan.golic@virs-vb.com

Сажетак

Вода је есенцијална хранлива материја у развоју бројлерских пилића, који је конзумирају у великим количинама. Обезбјеђење безбједне и квалитетне воде кључно је у очувању здравља јединке. Биофилм представља заштитни механизам бактерија да се групишу и преживе неповољне услове у спољашњој средини. Најчешће се формира на преласку између водене средине и ваздуха или водене средине и чврстог супстрата у природи. Истраживање је вршено током 2023. године и обухвата 150 узорака воде поријеклом са фарми бројлерских пилића. Лабораторијско испитивање воде вршено је методама BAS EN ISO 6222, BAS EN ISO 9308 и BAS EN ISO 7899-2. Циљ истраживања је утврђивање микробиолошког статуса воде поријеклом са фарми живине, као и испитивање способности продукције биофилма изолованих патогених бактерија из воде, који бактерије врло лако и ефикасно стварају у воденом екосистему, а који значајно може допринијети стварању антимикробне резистенције. Микробиолошким испитивањем утврђено је 64,67% задовољавајућих и 35,33% незадовољавајућих узорака воде за пиће. Вода за пиће на фармама бројлерских пилића има веома неповољан микробиолошки статус, посебно са становишта неповољног утицаја патогених бактерија на ову осјетљиву категорију живине. Поступак дезинфекције воде потребно је преиспитати и значајно побољшати, посебно имајући у виду значајну употребу бунарске и изворске воде, те повољне услове за стварање биофилма у системима за напајање. Сојеви *Escherichia coli* показали значајно

боље стварање биофилма на температури 25°C у односу на 37°C, као и у односу на изолате *Enterococcus spp.*

Кључне ријечи: вода, микробиологија, бројлери, патогени, биофилм.

УВОД

Птице су мале животиње које рано сазријевају, а њихова мања отпорност може довести до тога да буду подложније инфекцијама, углавном узрокованим патогенима цријевног поријекла, који могу бити присутни у води, па Масаги (1997) и Englert (1998) препоручују да се вода за пиће намијењена људима користи за напајање птица.

Вода је најкритичнија хранлива материја за живину (Bell, 2002) која помаже у метаболизму и излучивању (Jafari и сар., 2006). У поређењу с другим хранљивим материјама, птице конзумирају воду у великим количинама. Потрошња воде би могла бити двоструко већа од количине хране која је унесена и може варирати у зависности од старости и врсте птица, нивоа активности, температуре ваздуха, влажности, брзине дисања и постојећих болести, те и услова околине као што је топлотни стрес.

Свако повећање или смањење нормалне потрошње воде живине може указивати на здравствени поремећај код птица (Butcher и сар., 1999). Доступност и квалитет воде имају значајну улогу у укупном здрављу и продуктивности птица. Међутим, улога обезбјеђивања безбједне и квалитетне воде за оптималне перформансе углавном се занемарује.

Бактерија су присутне у води за пиће, чак и у релативно великом броју (10^3 до 10^6 CFU/ml), без посљедица по људско здравље, све док нема присутних патогена (Hoefel и сар., 2005; Hammes и сар., 2008; Vital и сар., 2012).

Многе заразне болести животиња и људи преносе се водом контаминираним излучевинама људи и животиња, која постаје извор патогених бактерија, вируса и паразита и повећава здравствени ризик (Sasakova и сар., 2013; Fridrich и сар., 2014).

Употреба индикаторских организама, посебно колиформне групе, у циљу процјене потенцијалног присуства патогена који се преносе водом, кључна је за заштиту јавног здравља (Hijnen и сар., 2020).

Escherichia coli је колиформна бактерија, сматра се примарним индикатором фекалне контаминације третиране и нетретиране воде и јавља у фецесу свих сисара, често у великом броју (Edberg, 2000; WHO, 2008).

Ентерококе укључују бројне врсте које се јављају у фецесу људи и топлокрвних животиња и сматрају се секундарним индикаторима фекалног загађења (WHO, 2008).

Развој цријевне микрофлоре код животиња дубоко је под утицајем њиховог раног животног окружења (Ballou и сар., 2016). Смањење оптерећења бактеријама у

околном окружењу, а самим тим и смањење уноса патогена, има предност за успостављање здраве екологије пријевне микрофлоре.

Meza (1989) наводи да би требало да постоји боља бактериолошка контрола воде која се даје птицама током почетне фазе развоја, пошто постоји брзи бактеријски раст и повећан је здравствени ризик за птице од 1 до 21 дана старости.

Мора се истаћи да је вода којом се птице снабдијевају на многим фармама, контаминирана у изворима. Пријављено је да су узорци из извора воде и резервоара били контаминирани *Escherichia coli* у 10 фарми бројлера и кока носиља, што је доказ фекалног загађења узорака (Amaral и сар., 1999; Amaral и сар., 2001).

Болести узроковане бактеријама, вирусима и протозоама спадају међу најчешће болести у живинарству, у којима вода за пиће игра важну улогу (Gama, 1995).

Присуство бактерија, гљивица, минерала и адитива за воду у систему воде за живину и појилицама омета ефикасне праксе управљања, које имају за циљ постизање оптималног учинка (Oviedo, 2006).

Микробна контаминација у води за пиће живине угрожава опште здравље и перформансе птица (Maharjan и сар., 2016). Системи за напајање у живинарницима могу бити одговарајуће станиште за бактерије, које представљају здравствени ризик за птице.

Биофилм представља сесилан начин живота микроорганизама и настаје тако што бактерије, након пријањања за подлогу и успјешног размножавања, почињу да синтетишу љепљиви полисахаридни матриксни омотач, који има улогу у додатном учвршћивању биофилма за подлогу, као и у механичкој заштити бактерија унутар биофилма од услова спољашње средине, дејства антимикробних супстанци и имунског система домаћина, уколико се биофилм ствара у живом домаћину (Liu и сар., 2016). Уколико се биофилм ствара у неживој средини, долази до појаве биокорозије и оштећења подлоге на којој се биофилм створио. Биофилм представља начин на који бактерије превазилазе неповољне услове спољашње средине и опстају и шире се с неживе средине на домаћина (људе или животиње).

Формирање заједнице унутар биофилма је један од значајнијих механизма који доприносе настанку антимикробне резистенције, јер спречава пролазак антибиотика до бактерија и омогућава бактеријама да пређу у перзисторске облике са смањеним метаболизмом и диобом (Bowler и сар., 2020). Због тога су за ерадикацију овако формулисаних бактерија потребне дозе антибиотика које су 10-1.000 пута веће од оних који се испитују класичним путем за појединачне планктонске сојеве. Биофилм представља заштитни механизам бактерија да се групишу, формирајући заштитни омотач од егзоплоисахарида, те преживе неповољне услове у спољашњој средини. Биофилм, односно сесилна заједница микроорганизама, најчешће се формира на преласку између водене средине и ваздуха или водене средине и чврстог супстрата у природи. Унутар биофилма су

бактерије заштићене, али због ограничених хранљивих материја, бактерије почињу да угибају, што слаби сесилну заједницу и заштитни омотач, те доводи до слабљења и оштећења биофилма. На тај начин се бактерије, које имају способност формирања биофилма, расипају и траже нове супstrate и нише у којима се налазе повољнији услови за поновно груписање и ширење биофилма у природи. Биофилм је веома битан због дуготрајног опстанка и преживљавања бактерија у вјештачким супстратима и срединама попут водоводне мреже, филтера, инструмената који се користе током прања и руковања са намирницама, који могу послужити као значајан резервоар бактерија за сталну контаминацију воде и намирница, односно могу изазвати инфекције и интоксикације. Због повезаности биофилма с могућом контаминацијом водоводних система и индиректном контаминацијом хране током прања таквом водом, веома је битно испитати способност бактерија да формирају биофилм на температури спољашње средине и на температури топлокрвних организама.

Виша температура воде и стагнирајући проток у систему за напајање живине повећавају размножавање бактерија и стварање биофилма (Maharjan и сар., 2017). Студије су забиљежиле повећано формирање биофилма на већим температурама воде (Kadam и сар., 2013; Bonsaglia и сар., 2014).

Poimenidou и сар. (2016) уочили су да је температура од 20°C више подстакла формирање биофилма него на 37°C, што је температура објекта у другој половини периода раста птица.

Нетретирана вода за пиће у фармама може да испољи већу осјетљивост на присуство патогена у систему за напајање. Чак су и третиране воде за пиће биле подложне стварању биофилма у систему за напајање живине, током периода раста јата. Стога, чишћење система за напајање између два турнуса постаје обавезна пракса за побољшање (Raut и сар., 2024).

Слаба ефикасност дезинфекционих средстава против полимерне матрице биофилма фаворизује бољу заштиту бактерија на његовим површинама, упркос пракси дезинфекције (Muhterem-Uyar и сар., 2015). Испирање система за напајање дезинфикованом водом ослобађа супстанце и тако уклања развијени биофилм.

Циљ истраживања је утврђивање микробиолошког статуса воде поријеклом са фарми живине, као и испитивање способности продукције биофилма изолованих патогених бактерија из воде, који бактерије врло лако и ефикасно стварају у воденом екосистему, а који значајно може допринијети стварању антимикробне резистенције.

МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

Материјал за испитивање је 150 узорка воде поријеклом са фарми товних пилића лоцираних на територији Републике Српске, који су узорковани у 2023. години, од чега су 93 узорка (62%) поријеклом из водовода, 44 узорка (29,33%) бунарске

воде и 13 узорака (8,67%) изворске воде. Већина узорака бунарске и изворске воде третирана је дезинфекционим средствима непосредно прије испуштања у систем за напајање.

Узорковање је вршено на начин да су уклоњени сви наставци са славине, вода је пуштена да тече 2-3 минута, након чега је затворена славина и извршена дезинфекција славине алкохолом и стерилизација пламеном, па је поново пуштена вода да тече 2-3 минута. Након тога је вода сипана у затамњене стерилне стаклене флаше запремине 1 литар, при чему је у исте сипана вода у количини од $\frac{3}{4}$ запремине флаше. Узорци су транспортовани на температури $5\pm 3^{\circ}\text{C}$, а испитивање је обављено у року од 6 часова од узорковања.

Лабораторијско испитивање воде вршено је следећим стандардним методама:

- број микроорганизама на 22°C и 37°C према BAS EN ISO 6222 (ИСБИХ, 2003а),
- број цријевних ентерокока према BAS EN ISO 7899-2 (ИСБИХ, 2003б),
- број колиформних бактерија и *Escherichia coli* према BAS EN ISO 9308 (ИСБИХ, 2018).

Правилником о здравственој исправности воде намијењене за људску употребу (Пропис, 2017) утврђени су параметри испитивања и микробиолошких критеријуми (Табела 1).

Табела 1 Параметри испитивања и микробиолошки критеријуми

Параметар	Пречишћена вода	Непречишћена вода
	Критеријум	
Број микроорганизама на 22°C	100CFU/1 ml	300CFU/1 ml
Број микроорганизама на 37°C	20CFU/1 ml	100CFU/1 ml
Цријевне ентерококе	0CFU/100 ml	0CFU/100 ml
<i>Escherichia coli</i>	0CFU/100 ml	0CFU/100 ml
Колиформи	0CFU/100 ml	0CFU/100 ml

Испитивање продукције биофилма је рађено по методи Stepanovic и сар. (2000), с модификацијом у концентрацији испитиваног инокулума од 10^6 CFU/ml, који је припремљен у мождано срчаном инфузионом бујону (ВНІ). За сваки сој рађене су по 3 пробе, тј. за сваки сој су инокулисане по три рупице са 100 μl ВНІ. Микротитарске плоче су затим инкубисане 24 сата на 25°C и 37°C . Након инкубације садржај плоче је одстрањен пипетирањем, а свака рупица три пута испрана пуфером. Адхерисане бактерије фиксиране су сушењем на ваздуху. Послије сушења је у сваку рупицу пипетирано по 100 μl боје кристал виолет из сета за бојење по Граму (Biomerieux, France). Бојење је трајало 15 минута, након чега су плоче три пута испране пуфером и осушене на ваздуху. Да би се ресуспендовала боја, у сваку рупицу је додато по 100 μl 30% сирћетне киселине

(Зорка, Шабач). Екстинкција је очитана на аутоматизованом ICN Flow Titrek Multiscan Plus читачу на λ од 570 nm. На свакој плочи за микротитрацију кориштене су по 3 негативне пробе, тј. у 3 рупице је инокулисан стерилан ТХУ бујон. На основу тога одређена је гранична (cutt-off) вриједност екстинкције ODc, која се израчунавала као средња вриједност три негативне пробе увећана за три стандардне девијације. Изолати су означени као непродуктори биофилма, те слаби, умјерени и јаки продуктори на основу следећих формула:

- $OD < ODc$ (непродуктори)
- $ODc < OD < 2 \times ODc$ (слаби продуктори)
- $2 \times ODc < OD < 4 \times ODc$ (умјерени продуктори)
- $4 \times ODc < OD$ (јаки продуктори).

Као позитивна контрола кориштен је референтни сој *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990.

У анализи добијених резултата микробиолошких испитивања користили смо дескриптивне статистичке параметре (Excel, Micosoft Office 2019). За поређење степена продукције биофилма између две групе бактерија, кориштен је Фишеров тест тачне вјероватноће. За поређење биомасе створеног биофилма код две групе тестираних бактерија кориштен је Т тест. Вриједност $p < 0,05$ сматрана је статистички значајном.

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Микробиолошко испитивања узоракa воде

Микробиолошки квалитет воде се дефинише као максимално прихватљив број или концентрација бактерија које не представљају опасност по здравље (Пропис, 2020), а *Escherichia coli* и цријевни ентерококе сматрају се основним параметрима.

Производња и дистрибуција биолошки стабилне воде може се постићи само адекватним праћењем и контролом микробиолошких процеса током третмана и дистрибуције воде (Prest и сар., 2016).

Оцјена микробиолошке усаглашености узоракa воде за пиће извршена је у односу на Правилник о здравственој исправности воде намијењене за људску употребу (Пропис, 2017).

Микробиолошким испитивањем утврђено је 64,67% задовољавајућих и 35,33% незадовољавајућих узоракa воде за пиће, а резултати по категоријама воде приказани су у Табели 2.

Табела 2 Резултати микробиолошког испитивања по категоријама

Категорија воде	Задовољавајући узорци %	Незадовољавајући узорци %
Водовод	74,19	25,81
Бунар	54,55	45,45
Извор	30,77	69,23

Вода је неопходна за организме да одржавају своје основне метаболичке активности, а квалитет воде за пиће је несумњиво повезан са здрављем и перформансама животиња (El-Katcha и сар., 2018; Guo и сар., 2022).

Kalaba и сар. (2018) су утврдили да је 26,20% узорака воде добијених са фарми животиња било незадовољавајуће у Републици Српској за период од 2015. до 2017. године, а Golić и сар. (2023) су утврдили да је 45,82% узорака воде било незадовољавајуће током 2022. године. Добијени резултати се налазе у опсегу претходних истраживања, и указују на варијације из године у годину, што указује на константну значајну микробиолошку контаминацију воде за пиће, те, како на неадекватност поступка дезинфекције, тако и на недоследност у његовој примјени.

У Табели 3 приказани су незадовољавајући узорци према параметрима испитивања.

Табела 3 Незадовољавајући узорци према параметрима испитивања

Параметар	Незадовољавајући узорци у %
Број микроорганизама на 22°C	12,67
Број микроорганизама на 37°C	15,33
Цријевне ентерококе	13,33
<i>Escherichia coli</i>	20
Колиформи	20

Резултати указују на то да осим *Escherichia coli* није било других колиформа у испитиваним узорцима воде. У студији микробиолошке анализе воде на фармама у Републици Српској (Kalaba и сар., 2015), утврђено је да је 62,66% узорака воде добијених са фарми животиња било незадовољавајуће и да су најчешћи узроци неправилности били везани за ентерококе, *Escherichia coli* и укупан број колонија на 22°C и 37°C. Сличне резултате добили су Golić и сар. (2023). Резултати добијени у нашем истраживању потврђују претходне, само са значајно мањим процентуалним учешћем по испитиваном параметру.

У Табели 4 приказани су незадовољавајући резултати микробиолошког испитивања у односу на укупан број узорака по категоријама, према параметру испитивања.

Табела 4 Незадовољавајући резултати микробиолошког испитивања у односу на укупан број узорака по категоријама према параметру испитивања

Параметар	Незадовољавајући узорци у %		
	Водовод	Бунар	Извор
Број микроорганизама на 22°C	8,60	13,64	38,46
Број микроорганизама на 37°C	11,83	18,18	30,77
Цријевне ентерококе	9,68	13,64	38,46
<i>Escherichia coli</i>	13,98	18,18	69,23
Колиформи	13,98	18,18	69,23

У периоду 2018-2020. година, утврђено је да је 23,41% узорака воде поријеклом са фарми животиња било неисправно (Golić и сар., 2021), од чега је 10,19% узорака због присуства цријевних ентерокока, а 6,44% узорака због присуства *Escherichia coli*. У нашем истраживању добијени су слични резултати за цријевне ентерококе, али и значајно повољнији резултати по питању *Escherichia coli*. Највећи проценат незадовољавајућих узорака односи се на изворску воду, могуће из разлога што се она не дезинфикује, за разлику од водоводске и бунарске воде. У Табели 5 приказани су резултати микробиолошког испитивања по категоријама и параметру испитивања у односу на незадовољавајуће узорке.

Табела 5 Резултати микробиолошког испитивања по категоријама и параметру испитивања у односу на незадовољавајуће узорке

Параметар	Незадовољавајући узорци у %		
	Водовод	Бунар	Извор
Број микроорганизама на 22°C	33,33	30	55,56
Број микроорганизама на 37°C	45,83	40	44,44
Цријевне ентерококе	37,50	30	55,56
<i>Escherichia coli</i>	54,17	40	100
Колиформи	54,17	40	100

Фекални колиформи су пријављени у узорцима воде из 20 фарми (50%), који су били изнад максимално прихватљивог нивоа (Jafari и сар., 2006). Amaral и сар. (1995) су утврдили да 90% узорака воде из бунара и 100% узорака воде из извора има бактерије које указују на фекално загађење. Kalaba и сар. (2018) су установили да је 63,40% незадовољавајућих узорака последица повећаног

укупног броја колонија на 22°C, 54,90% је посљедица повећаног укупног броја колонија на 37°C, 58,80% посљедица присуства цревних ентерокока, 31,40% посљедица присуства колиформа и 19% посљедица присуства *Escherichia coli*. Такође, и у нашем истраживању добијен је висок проценат незадовољавајућих узорака воде за пиће у односу на параметре испитивања.

Испитивање стварања биофилма код *Escherichia coli* и *Enterococcus spp.* изолата

Укупно је испитано 30 сојева *Escherichia coli* и 20 сојева *Enterococcus spp.*, који су изоловани из свих узорака током основне микробиолошке анализе. Испитивање је вршено на начин да је одређивана укупна количина биомасе биофилма на основу екстинкције боје. Сојеви су на основу негативних контрола означени као непродуктори биофилма, те као слаби, умјерени и снажни продуктори.

Код сојева *Escherichia coli* уочено је постојање статистички високо значајне разлике у биомаси створеног биофилма, као и у степену продукције биофилма на тестираним температурама инкубације (Табела 6). На собној температури је више од половине изолата (17/30, тј. 56,7%) показало јаку продукцију биофилма, док су на температури топлокрвних организама најучесталији били умјерени продуктори (16/30, тј. 53%). Када је у питању биомаса створеног биофилма, уочено је да су изолати на собној температури створили биомасу у вриједности од $0,63 \pm 0,71$, у односу на статистички високо значајно мању продукцију биофилма на температури топлокрвних организама $0,21 \pm 0,12$ ($p=0,003$).

Табела 6 Продукција биофилма *Escherichia coli* изолата на две испитиване температуре у %

Сој	25°C	37°C	<i>p</i>
Непродуктор	3 (10%)	2 (6,7%)	0,001*
Слаб продуктор	7 (23,3%)	7 (23,3%)	
Умјерен продуктор	3 (10%)	16 (53,3%)	
Јак продуктор	17 (56,7%)	5 (16,7%)	

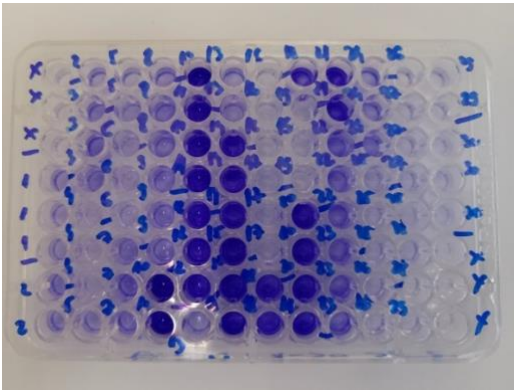
Са друге стране, ентерококе су показале подједнаку способност продукције биофилма, било да је испитиван степен продукције биофилма (Табела 7) или биомаса. На обе температуре су стварали готово подједнаку биомасу биофилма (0,07 на нижој, односно 0,09 на вишој температури) ($p>0,05$).

Микробиолошки статус воде за пиће са бројлерских фарми и способност стварања биофилма изолованих патогених бактерија

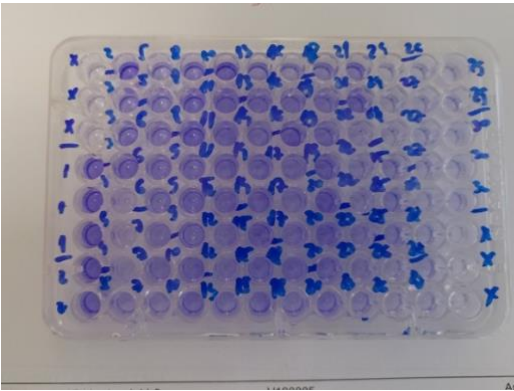
Табела 7 Продукција биофилма *Enterococcus spp.* изолата на две испитиване температуре

Сој	25°C	37°C	<i>p</i>
Непродуктор	8 (40%)	2 (10%)	0,06
Слаб продуктор	8 (40%)	8 (40%)	
Умјерен продуктор	3 (15%)	9 (45%)	
Јак продуктор	1 (5%)	1 (5%)	

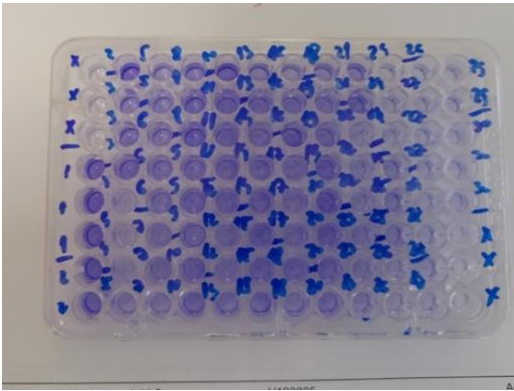
Када се упореди способност формирања биофилма између ове две бактерије на наведеним температурама, уочава се да је *Escherichia coli* била значајно бољи продуктор биофилма кад су у питању и биомаса и степен продукције биофилма на 25°C ($p=0,001$, $p=0,00018$) (Слика 1-4).



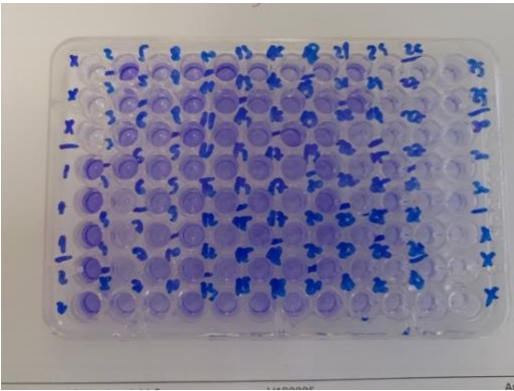
Слика 1 Продукција биофилма *Escherichia coli* на 25°C



Слика 2 Продукција биофилма *Escherichia coli* на 37°C



Слика 3 Продукција биофилма *Enterococcus spp.* на 25°C



Слика 4 Продукција биофилма *Enterococcus spp.* на 37°C

На собној температури већина изолата *Escherichia coli* били су умјерени и јаки продуценти (20/30, тј. 66,7%), док су код ентерокока већина изолата били непродуценти и слаби продуценти (16/20, тј. 80%). Ово је јасно видљиво уколико се посматра и биомаса биофилма, јер је екстинкција боје била десетоструко већа на 25°C. На температури топлокрвних организама оба испитивана микроорганизма подједнако добро су продуковали биофилм када се пореди степен продукције биофилма, као и створена биомаса ($p > 0,05$, $p > 0,05$).

Стварање биофилма је универзални протективни начин заштите микроорганизма у неповољним условима. Водени екосистем у природи или у дистрибутивној водоводној мрежи представљају одличну средину за настанак микробних заједница у виду биофилма, који бактерије саме стварају након што достигну критичан број на одређеном супстрату или подлози (Liu и сар., 2016). У нашем испитивању су сојеви *Escherichia coli* показали значајно боље стварање биофилма на нижој температури у односу на вишу температуру инкубације, као и у односу на изолате ентерокока. Наши резултати су у сагласности са радом Ingle и сар. (2011) и Maltholouti и сар. (2018) који су, такође, доказали бољу продукцију биофилма на 25°C, поготово уколико су кориштене богате хранљиве подлоге неутралног рН, као што је било у нашем случају. Важни фактори вируленције који доприносе стварању биофилма су коврцави пили и продукција целулозе. Пили су важни и као фактор адхеренције и као градивни протеински елемент, а целулоза као доминантна полисахаридна компонента. Ген за продукцију целулозе се инактивише на температури од 37°C, док се активира на температури нижој од 30°C (Uhlich и сар., 2014). Ово би могло бити објашњење и наших резултата. С друге стране, температура није имала утицаја на стварање биофилма ентерококних сојева, чак и кад су кориштене температуре у распону од 10-45°C (Marinho и сар., 2013), што се слаже с нашим истраживањем. Исти аутори показали су да је додатак веће концентрације глукозе довео до разлике у стварању биофилма на различитим температурама. У будућим радовима било би интересантно утврдити да ли ће и сојеви кориштени у нашем испитивању имати слично понашање. Такође, Jahan и сар. (2014), показали су да је боља продукција биофилма на 25°C у односу на 37°C зависна првенствено од врсте и да су *Enterococcus faecalis* изолати били бољи продуценти у односу на *Enterococcus faecium*, што пред нас ставља битан задатак да урадимо специјацију наших изолата, да бисмо утврдили које врсте су биле доминантне у нашој студији.

ЗАКЉУЧАК

Вода за пиће на фармама бројлерских пилића има веома неповољан микробиолошки статус, посебно са становишта неповољног утицаја патогених бактерија на ову осјетљиву категорију живине. Поступак дезинфекције воде потребно је преиспитати и значајно побољшати, посебно имајући у виду значајну употребу бунарске и изворске воде, те повољне услове за стварање биофилма у

системима за напајање. Сојеви *Escherichia coli* показали значајно боље стварање биофилма на температури 25°C у односу на 37°C, као и у односу на изолате *Enterococcus spp.* С обзиром да нисмо испитивали утицај хранљивих материја на дејство продукције биофилма и да нисмо имали потпуну идентификацију изолата, не можемо дати коначан одговор због чега су изолати ентерокока значајно мање стварали биофилм, осим да претпоставимо да су оне, као грам позитивне бактерије, мање волуминозне и нису биле индуковане на продукцију биофилма у степену у ком су то радили грам негативни изолати *Escherichia coli*. Слична истраживања нису рађена и нема доступних података, тако да нам у будућим истраживањима остаје да детектујемо факторе вируленције код обе врсте који су битни током стварања биофилма, да бисмо разјаснили њихово понашање у сесилној заједници у воденим екосистемима.

Захвалница

Рад је подржан средствима Министарства за научнотехнолошки развој и високо образовање Републике Српске (Уговор број 19.032/961-101/23).

Изјава о сукобу интереса: Аутори изјављују да не постоји сукоб интереса.

ЛИТЕРАТУРА

- Amaral L. A., Nader Filho A., Isa H., Barros L. S. S. (2001): Qualidade higiênico-sanitária e demanda de cloro da água de dessedentação de galinhas de postura coletadas em bebedouros tipo nipple e taça. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 3(3):249-255.
- Amaral L. A., Nader Filho A., Rossi Junior O. D., Penha L. H. C. (1995): Características microbiológicas da água utilizada no processo obtenção do leite. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 15(2/3):85-88.
- Amaral L. A., Rossi Junior O. D., Cardoso V. (1999): Qualidade higienico-sanitária da água de bebedouros pendular e nipple utilizados na criação de frangos de corte. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 1(2):145-148.
- Ballou A. L., Ali R. A., Mendoza M. A., Ellis J. C., Hassan H. M., Croom W. J., Koci M. D. (2016): Development of the chick microbiome: how early exposure influences future microbial diversity. *Front. Vet. Sci.*, 3(2).
- Bauer, A. W., Kirby W. M. M., Sherris J. C., Turck M. (1966): Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 36:493-496.
- Bell D. D. (2002): Consumption and quality of water. In *Commercial Chicken Meat and Egg Production*, 5th edition. Eds. D. D. Bell., W. D. Weaver, Jr. Springer, 411-430.
- Bonsaglia E. C. R., Silva N. C. C., Fernandes A. J., Araujo J. P. J., Tsunemi M. H., Rall V. L. M. (2014): Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures. *Food Control*, 35:386-391.
-

- Bowler P., Murphy C., Wolcott R. (2020): Biofilm exacerbates antibiotic resistance: Is this a current oversight in antimicrobial stewardship? *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 9(1), 1-5.
- Butcher G. D., Jacob J. P., Mather F. B. (1999): Common poultry diseases, Fact Sheet PS-47. University of Florida, 1-19.
- Edberg S. C., Rice E. W., Karlin R. J., Allen M. J. (2000): *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Journal of Applied Microbiology*, 88:106-116.
- El-Katcha M., Soltan M. A., El-Shobokshy S. A., Kasser M. (2018): Impact of water acidification or magnetic treatment on growth performance, health and oxidative status of broiler chicks challenged by *Salmonella enteritidis*. *Alex. J. Vet. Sci.*, 59:154-168.
- Englert S. (1998): Produção de frangos de corte. In: Avicultura: tudo sobre raças, manejo e alimentação. 7^ª. Eds. S. Englert, Guaíba: Agropecuária, 94-151.
- Fridrich B., Krcmar D., Dalmacija B., Molnar J., Pesic V., Kragulj M., Varga N. (2014): Impact of wastewater from pig farm lagoons on the quality of local groundwater. *Agricultural Water and Management*, 135:40-53.
- Gama M. S. Q. (1995): Água, que cura, que nutre, que mata. *Aves & Ovos*, 30-33.
- Golić B., Kalaba V., Nedić D. (2021): Review of microbiological analysis of drinking water for animals in the Republic of Srpska (Bosnia and Herzegovina) during the period 2018-2020. *Veterinary Journal of Republic of Srpska, Banja Luka*, 21(1-2):37-49.
- Golić B., Knežević D., Pećana B. (2023): Assessment of the microbiological status of drinking water on animal farms. In XIV International Scientific Agricultural Symposium „Agrosym 2023“, Proceedings, 1086-1093.
- Guo Y. J., Wang Z. Y., Wang Y. S., Chen B., Huang Y. Q., Li P., Tan Q., Zhang H. Y., Chen W. (2022): Impact of drinking water supplemented 2-hydroxy-4-methylthiobutyric acid in combination with acidifier on performance, intestinal development, and microflora in broilers. *Poult. Sci.*, 101(3).
- Hammes F., Berney M., Wang Y., Vital M., Koster O., Egli T. (2008): Flow-cytometric total bacterial cell counts as a descriptive microbiological parameter for drinking water treatment processes. *Water Res.*, 42:269-277.
- Hijnen W. A. M., van Veenendaal D. A., van der Speld W. H. M., Visser A., Hoogenboezem W., van der Kooij D. (2000): Enumeration of faecal indicator bacteria in large volumes using in site membrane filtration to assess water treatment efficiency. *Water Research*, 34:1659-1665.
- Hoefel D., Monis P. T., Grooby W. L., Andrews S., Saint C. P. (2005): Profiling bacterial survival through a water treatment process and subsequent distribution system. *J. Appl. Microbiol.*, 99:175-186.
-

- Ingle, D. J., Clermont, O., Skurnik, D., Denamur, E., Walk, S. T., & Gordon, D. M. (2011). Biofilm formation by and thermal niche and virulence characteristics of *Escherichia* spp. *Applied and environmental microbiology*, 77(8):2695-2700.
- ИСБИХ (2003a): Квалитет воде – Бројање узгојених микроорганизама – Одређивање броја колонија цијепљењем агар хранљиве подлоге за гајење. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS EN ISO 6222.
- ИСБИХ (2003b): Квалитет воде – Детекција и бројање цријевних ентерокока – Дио 2: Метода мембранске филтрације. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS EN ISO 7899-2.
- ИСБИХ (2018): Квалитет воде – Бројање *Escherichia coli* и колиформних бактерија – Дио 1: Метода мембранске филтрације за воде са ниским природним фоном бактеријске флоре. Институт за стандардизацију Босне и Херцеговине, BAS EN ISO 9308-1.
- Jafari R. A., Fazlara A. M. (2006): Govahi An investigation into *Salmonella* and fecal coliform contamination of drinking water in broiler farms in Iran. *Int. J. Poult. Sci.*, 5:491-493.
- Jahan M., Holley R. A. (2014): Incidence of virulence factors in enterococci from raw and fermented meat and biofilm forming capacity at 25°C and 37°C. *International Journal of Food Microbiology*, 170:65-69.
- Kadam S. R., den Besten H. M. W., van der Veen S., Zwietering M. H., Moezelaar R., Abee T. (2013): Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: Impact of growth condition, serotype and strain origin. *Int. J. Food Microbiol.*, 165:259-264.
- Kalaba V., Golić B., Ilić T. (2018): Microbiological safety of water in primary production. In 29. Counselling of veterinary of Serbia, Book of Article and Abstracts, 326.
- Kalaba V., Golić B., Kasagić D., Nedić D., Dojčinović S. (2015): Determining the microbiological safety of water on farms in the Republic of Srpska. *Veterinary Journal of Republic of Srpska*, 15(2):259-271.
- Liu S., Gunawan C., Barraud N., Rice S. A., Harry E. J., Amal R. (2016): Understanding, monitoring, and controlling biofilm growth in drinking water distribution systems. *Environmental science & technology*, 50(17), 8954-8976.
- Macari M. (1997): Qualidade da água e bebedouros para frangos de corte: tipos, vantagens e desvantagens. In: Conferência Apinco'97 de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas: Facta, 121-143.
- Maharjan P., Clark T., Kuenzel C., Foy M. K., Watkins S. (2016): On-farm monitoring of the impact of water system sanitation on microbial levels in broiler house water supplies. *J. Appl. Poult. Res.*, 25:266-271.
- Maharjan P., Dey S., Huff G., Zhang W., Phillips G. K., Watkins S. (2017): Effect of chlorine treatment on inhibition of *E coli* serogroup O2 incorporation into 7-day-old biofilm on polyvinylchloride surface. *Poult. Sci.*, 96:2862-2870.
-

- Mathlouthi A., Pennacchietti E., De B. D. (2018): Effect of temperature, pH and plasmids on in vitro biofilm formation in *Escherichia coli*. *Acta Naturae*, 10(4(39)):129-132.
- Marinho A. R., Martins P. D., Ditmer E. M., d'Azevedo P. A., Frazzon J., Van der Sand S. T., Frazzon A. P. G. (2013): Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44:423-426.
- Meza H. (1989): Controle de qualidade na produção de frangos de corte. *Avicultura & Suinocultura Industrial*, 80:38-44.
- Muhterem-Uyar M., Dalmasso M., Bolocan A. S., Hernandez M., Kapetanakou A. E., Kuchta T., Manios S. G., Melero B., Minarovicova J., Nicolau A. I., Rovira J., Skandamis P. N., Jordan K., Lazaro D. R., Stessl B., Wagner M. (2015): Environmental sampling for *Listeria monocytogenes* control in food processing facilities reveals three contamination scenarios. *Food Control*, 51:94-107.
- Oviedo E. O. (2006): Important factors in water quality to improve broiler performance. *N. Carolina Poult. Industry Joint Area Newsletter*, 1:7-8.
- Poimenidou S. V., Chrysadaku M., Tzakoniati A., Bikouli V. C., Nychas G. J., Skandamis P. N. (2016): Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *Int. J. Food Microbiol.*, 237:164-171.
- Prest E. I., Hammes F., van Loosdrecht M. C. M., Vrouwenvelder J. S. (2016): Biological Stability of Drinking Water: Controlling Factors, Methods, and Challenges. *Front. Microbiol.*, 7:45.
- Пропис (2017): Правилник о здравственој исправности воде за пиће намијењене за људску потрошњу. Службени гласник Републике Српске, 88/17.
- Пропис (2020): Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council on the quality of water intended for human consumption (recast). Official Journal of European Union, L435.
- Raut R., Kilonzo Nthenge A., Anume T., Basnet A., Watkins S., Maharjan P. (2024): Impacts of on-farm water sanitation practices on microbial hygiene in poultry waterlines and efficacy of sodium hypochlorite-based product on foodborne pathogens. *Journal of Applied Poultry Research*, 33(3).
- Sasakova N., Veselitz-Lakticova K., Hromada R., Chvojka D., Koscco J., Ondrasovic M. (2013): Contamination of individual sources of drinking water located in environmentally polluted Central Spis Region (Slovakia). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3:262-265.
- Stepanovic S., Vukovic D., Dakic I., Savic B., Svabic-Vlahovic M. A. (2000): Modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, 40(2):175-9.

- Uhlich G. A., Chen C.-Y., Cottrell B. J., Nguyen L.-H. (2014): Growth media and temperature effects on biofilm formation by serotype O157:H7 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 354(2):133-141.
- Vital M., Dignum M., Magic-Knezev A., Ross P., Rietveld L., Hammes F. (2012): Flow cytometry and adenosine tri-phosphate analysis: alternative possibilities to evaluate major bacteriological changes in drinking water treatment and distribution systems. *Water Res.*, 46:4665-4676.
- WHO (2008): Guidelines for Drinking-water Quality, 3rd ed., Vol. 1. World Health Organisation.
-