

УДК 579.869.1:613.2

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ НА ИЗМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *LISTERIA MONOCYTOGENES*, КОНТАМИНИРУЮЩИХ ПИЩЕВЫЕ ПРОДУКТЫ

Н.Б. Цветкова, Л.С. Бузолева, В.С. Обухова

НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН (690087 г. Владивосток, ул. Сельская, 1)

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, пищевые продукты, условия хранения, биологические свойства.

Показана изменчивость биологических свойств *Listeria monocytogenes* под влиянием различных абиотических факторов при культивировании на пищевых продуктах. Сочетанное действие температуры и вакуума приводило к тому, что штаммы становились физиологически и биохимически более активными. Установлено, что проявление факторов патогенности у *L. monocytogenes* зависит от вида пищевого продукта, температуры культивирования и наличия вакуума. На сосисочном субстрате адгезивные свойства и вирулентность усиливались при низкой температуре, а на сыром – в условиях вакуума. У всех исследуемых штаммов, культивируемых на продуктах питания, появлялась устойчивость к антимикробным препаратам II–III поколения.

В настоящее время пищевые продукты относят к основным факторам передачи листериозной инфекции. Жизнеспособность популяций *Listeria monocytogenes*, обитающих в объектах внешней среды, к которым можно отнести и продукты питания, зависит от условий их хранения. В литературе хорошо освещены вопросы выживаемости и размножения листерий в продуктах, упакованных под вакуумом [1, 13, 15]. Но сочетанное действие вакуума, температуры и вида продукта на изменение биологических свойств этих микроорганизмов не исследовалось.

Целью настоящей работы было определение диапазона изменчивости биологических свойств *L. monocytogenes* под влиянием температуры, вакуума и вида продукта – субстрата культивирования микроорганизма.

Материал и методы. Использованы штаммы *L. monocytogenes* из музея лаборатории экологии патогенных бактерий НИИЭМ СО РАМН, типичные по своим морфологическим, биохимическим, культуральным и антигенным свойствам, подтвержденным генетически: выделенный из сосисок штамм VIMVF-132 (1/2a), выделенный из креветок штамм VIMVG-086 (4b) и выделенный из сыра штамм VIMVF-280 (1/2a).

Были взяты продукты, приобретенные в торговой сети г. Владивостока, наиболее эпидемиологически значимые при листериозе [11, 12]: сосиски свиные и сыр «Камамбер» без вакуумной упаковки, креветки вареные, а также сосиски свиные и сыр «Камамбер», упакованные под вакуумом на производстве. На основе измельченных продуктов готовили 1%-ные субстраты в среде Патерсона–Кука (рН 7,2–7,4), которые служили опытными средами для исследуемых штаммов. В качестве контрольной среды использовали кровяно-дрожжевой агар (НИИ питательных сред, г. Махачкала), содержащий 0,1% глюкозы. Заражаю-

щую дозу листерий (10^9 кл./мл) вносили в среду в соответствии с тем, из какого продукта были выделены штаммы (если изолят получали из сыра, то его инокулировали в среду с сырым субстратом и т.д.).

Для определения чувствительности к антимикробным препаратам использовали дрожжевой агар с добавлением 0,1% глюкозы, так как стандартная среда АГВ непригодна для культивирования *L. monocytogenes* [5, 6]. Определение ферментативных свойств бактерий проводили с помощью сред Гисса с углеводами (короткий и длинный ряды). С этой же целью применяли стриповый диагностикум API *Listeria* фирмы BioMerieux (Франция), предназначенный для ускоренной идентификации листерий до вида по биохимическим признакам. Подвижность микроорганизмов изучали методом укола в полужидкий 0,3%-ный агар в модификации (добавляли в среду 2,3,5-три-фенилтетразолия хлорид). Лецитиназную активность определяли, выращивая бактерии на агаризованной среде с желтком куриного яйца и активированным углем, добавляемым в среду для связывания и удаления ауторепрессора [11].

Для выяснения влияния вакуумного хранения пищевых продуктов на биологические свойства *L. monocytogenes* были заражены сосиски свиные и сыр «Камамбер» (площадь поверхности упаковки 100 см²). Под парафин стерильным шприцем вводили суспензию листерий в концентрации 10^9 колониеобразующих единиц (КОЕ) на 1 мл в расчете 0,1 мл на 1 см² площади поверхности продукта. Экспозиция составила 30 дней, температура культивирования – 6 и 22 °С.

Вирулентные свойства культур определяли в опытах на неинбредных белых мышах весом 14–16 г (срок наблюдения 30 дней). Для определения LD₅₀ животных заражали внутрибрюшинно суспензией *L. monocytogenes* в дозах 10^1 – 10^9 КОЕ/мл в 1,0 мл 0,15 N NaCl.

Способность листерий к адгезии исследовали на нативных эритроцитах человека О (I) группы Rh (+) по методике В.И. Брилис [2]. Адгезивные свойства бактерий оценивали с помощью следующих показателей: 1) средний показатель адгезии (СПА) – среднее количество микробных клеток, прикрепившихся к одному эритроциту при подсчете не менее 100 эритроцитов с учетом не более 5 эритроцитов в одном поле зрения; 2) индекс адгезивности микроорганизма (ИАМ) – среднее количество микробных клеток на одном участвующем в адгезии эритроците; 3) коэффициент участия эритроцитов – доля эритроцитов (%), имеющих на своей поверхности адгезированные микроорганизмы (этот коэффициент допол-

Таблица 1

Биохимические свойства *L. monocytogenes* при культивировании на продуктах питания в различных условиях при 6 и 22 °С

Тест	Способность к ферментации ¹														
	штамм VIMVF-132					штамм VIMVF-280						штамм VIMVG-086			
	К 6°С	К 22°С	П 6°С	П 22°С	В 6°С	К 6°С	К 22°С	П 6°С	П 22°С	В 6°С	В 22°С	К 6°С	К 22°С	П 6°С	П 22°С
D-галактоза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+
L-сорбоза	–	–	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	–	–	+
L-рамноза	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
D-маннитол	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
D-сахароза	–	+	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
Инулин	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
D-мелезидоза	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	–	–	–	–
D-раффиноза	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	+	–
Амидон	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–
Гликоген	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–

¹ Здесь и в табл. 2 и 3: К – контроль, культура, выращенная на кровяно-дрожжевом агаре; П – культура, выращенная на продукте; В – культура, выращенная на продукте в вакууме.

нительной информации не дает и необходим только для расчета ИАМ).

Адгезивность считали нулевой при СПА от 0 до 1,0, низкой – при СПА от 1,0 до 2,0, средней – при СПА от 2,01 до 4 и высокой – при СПА выше 4,0. Микроорганизм считали неадгезивным при ИАМ меньше 1,75, низкоадгезивным – при ИАМ от 1,76 до 2,5, среднеадгезивным – при ИАМ от 2,51 до 4,0 и высокоадгезивным – при ИАМ выше 4,0. Все эксперименты по изучению адгезивных свойств листерий проводили трижды, с обязательным подсчетом не менее 100 эритроцитов для каждого штамма при просмотре всего стекла.

Для определения чувствительности листерий к антимикробным препаратам применяли агародиффузный метод. Интерпретация полученных результатов проводилась согласно таблицам чувствительности микроорганизмов к антибиотикам, входящим в набор для определения чувствительности с помощью дисков.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Microsoft Excel XP и Statistica 6.0. Оценку достоверности различий определяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования. Температура является одним из важнейших факторов окружающей среды, влияющим на скорость ферментативных процессов, характер метаболизма бактерий и темпы их размножения [3, 9]. В результате эксперимента было установлено, что температура оказывала влияние на изменение биологических свойств листерий при культивировании их на пищевых субстратах. Так, тепловые варианты всех штаммов, включая те, которые выращивали в вакуумной упаковке, независимо от субстрата, утрачивали подвижность при 22 °С. Из всех холодных вариантов лишь штамм, культивируемый на креветке, был неподвижен при 22 °С.

Изменялись и биохимические свойства листерий (табл. 1). При этом характер изменений в большей степени зависел от субстрата и температуры культивирования. Наибольшие изменения в отношении

расширения спектра ферментативной активности наблюдались у вариантов, культивируемых на сыре при 22 °С. При этом штамм *L. monocytogenes* в отличие от контроля приобрел способность дополнительно ферментировать восемь субстратов: L-сорбозу, D-маннитол, D-сахарозу, инулин, D-мелезидозу, D-раффинозу, амидон, гликоген и утратил способность разлагать D-галактозу в вакууме при 6 °С.

Культура листерий, выращенная на субстрате из сосисок и креветок, как в условиях холода, так и при 22 °С в меньшей степени изменяла свои свойства. Так, на креветочном субстрате при 6 °С регистрировали способность бактерий ферментировать D-маннитол и D-раффинозу и отсутствие разложения K-рамнозы в отличие от контроля. Штамм *L. monocytogenes*, выращенный на сосисочном субстрате, приобрел способность ферментировать L-сорбозу и D-сахарозу.

Было установлено, что каталазная и оксидазная активность (табл. 2), а также тинкториальные свойства листерий в эксперименте не изменялись.

Известно, что одним из свойств, обеспечивающих проникновение патогенных бактерий в организм человека и животных, является адгезия. При этом при низкой температуре культивирования (6–8 °С) адгезия к клеткам макроорганизма может усиливаться у разных видов бактерий, что в какой-то степени объясняет возможность заражения человека и животных через абиотические объекты окружающей среды [4].

В наших экспериментах было отмечено, что все штаммы *L. monocytogenes* оставались способными к взаимодействию с клетками эритроцитов человека, однако температура культивирования, вид продукта-субстрата и условия вакуума оказывали влияние на это свойство листерий. В целом следует отметить, что низкая температура способствовала повышению адгезивных свойств, что согласуется с данными литературы [4]. В зависимости от вида продукта адгезия бактерий к эритроцитам по сравнению с контролем (ИАМ – 5,31 при 6 °С и 3,81 при 22 °С) значимо

Таблица 2

Биологические свойства *L. monocytogenes* при культивировании на продуктах питания в различных условиях при 6 и 22 °С

Тест		Штамм VIMVF-132					Штамм VIMVF-280					Штамм VIMVG-086				
		К 6°С	К 22°С	П 6°С	П 22°С	В 6°С	К 6°С	К 22°С	П 6°С	П 22°С	В 6°С	В 22°С	К 6°С	К 22°С	П 6°С	П 22°С
Подвиж- ность	37°С	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22°С	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Лецити- наза	с углем	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
	без угля	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Гемолиз		+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Адгезия (ИАМ)		5,31 ¹	3,81 ²	7,06 ¹	5,14 ¹	6,07 ¹	3,96 ²	3,40 ²	2,52 ³	2,76 ³	5,31 ¹	5,14 ¹	1,15 ³	1,65 ³	2,50 ²	1,65 ³
LD ₅₀		2,5×10 ⁴	1,5×10 ⁵	1,5×10 ³	6,3×10 ⁶	6,3×10 ³	1,5×10 ⁵	6,2×10 ⁴	6,3×10 ⁵	1,5×10 ⁵	3,9×10 ³	3,6×10 ³	1,5×10 ⁷	6,3×10 ⁶	1×10 ⁸	1×10 ⁸

1 – в/а, 2 – с/а. 3 – н/а.

Таблица 3

Чувствительность к антимикробным препаратам *L. monocytogenes* при культивировании на пищевых продуктах в различных условиях при 6 и 22 °С

Антибиотик	Диаметр зоны ингибции (М±m), мм														
	штамм VIMVF-132					штамм VIMVF-280					штамм VIMVG-086				
	К 6°С	К 22°С	П 6°С	П 22°С	В 6°С	К 6°С	К 22°С	П 6°С	П 22°С	В 6°С	В 22°С	К 6°С	К 22°С	П 6°С	П 22°С
Цефотаксим	22,0±0,5	22,0±0,1	-	-	-	22,0±0,1	22,0±0,1	-	-	-	-	22,0±0,0	28,0±0,0	-	-
Цефоперазон	20,0±1,0	26,0±0,2	-	-	-	20,0±0,0	26,0±0,0	-	-	-	-	20,0±0,0	20,0±0,2	-	-
Цефатриаксон	20,0±0,2	20,0±0,1	-	-	-	20,0±0,0	24,0±0,0	-	-	-	-	24,0±0,1	22,0±0,0	-	-
Цефуроксим	20,0±0,2	15,0±0,2	-	-	-	20,0±0,0	18,0±0,2	-	-	-	-	15,0±0,2	17,0±0,3	-	-
Цефазолин	12,0±0,3	16,0±0,2	-	-	-	21,0±0,1	24,0±0,2	-	-	-	-	22,0±0,5	20,0±0,5	-	18,0±0,3
Пефлоксацин	26,0±0,3	26,0±0,2	-	-	-	20,0±0,2	20,0±0,0	-	-	-	-	18,0±0,4	17,0±0,5	-	-
Офлоксацин	22,0±0,2	20,0±0,1	-	-	-	18,0±0,5	20,0±0,0	-	-	-	-	22,0±0,1	20,0±0,5	-	-
Ципрофлоксацин	30,0±0,1	32,0±0,3	-	-	-	30,0±0,3	40,0±0,2	-	-	-	-	36,0±0,0	36,0±0,2	-	-
Норфлоксацин	18,0±0,1	18,0±0,4	-	-	-	18,0±0,1	22,0±0,3	-	-	-	-	20,0±0,0	24,0±0,2	-	-

повышалась при культивировании на сосисочном субстрате (7,06 и 5,14 соответственно) и практически не изменялась на креветочном (независимо от температуры) и сырном (при 22 °С) продуктах (табл. 2). Вакуум достоверно усиливал адгезивность листерий на сырном субстрате, в отличие от остальных продуктов и при 6 °С, и при 22 °С.

Сочетанное действие вакуума и низкой температуры приводило к повышению вирулентности штаммов, культивируемых на сыре и сосисочном субстрате, при этом значения LD₅₀ уменьшались на 1–2 порядка (табл. 2). При культивировании под вакуумной упаковкой при 22 °С также наблюдали повышение вирулентных свойств листерий. Во всех остальных вариантах наблюдалось снижение вирулентности (LD₅₀ увеличивалась на 1–2 порядка).

Все тепловые варианты утратили гемолитическую и лецитиназную активность. Из холодовых лишь штаммы, культивируемые на креветке и сыре, не лизировали эритроциты и не продуцировали лецитин. Установлено, что гиалуронидазная активность и цитопатогенное действие листерий в эксперименте не изменялись.

Одним из показателей изменчивости свойств патогенных бактерий является их чувствительность к антимикробным препаратам. Так, независимо от субстрата и условий культивирования, у всех штаммов

наблюдалось снижение чувствительности, вплоть до приобретения устойчивости к цефалоспорином и фторхинолонам II и III поколения (табл. 3).

Обсуждение полученных данных. Особенности биологических свойств *L. monocytogenes* как типичного представителя возбудителей сапрозоонозов способствуют ее концентрации в продуктах питания и контакту с восприимчивой популяцией человека [10]. Изменчивость биологических свойств листериозного микроба в различных средах обитания (почва, вода и простейшие) описана многими авторами [7, 14], но изучение сочетанного действия нескольких факторов (температура, вакуум, субстрат) на его размножение при культивировании на пищевых продуктах проведено впервые.

Как показали результаты исследования, листерии теряли подвижность при культивировании на пищевых субстратах при 22 °С. Очевидно, хранение контаминированных этими бактериями продуктов при комнатной температуре способствует прекращению формирования жгутиков и потере подвижности в результате блокировки таксисного механизма, что подтверждается и данными литературы [10]. Тем не менее, поскольку листерии в условиях холода при культивировании на креветочном субстрате, в отличие от других пищевых субстратов, также утрачивали подвижность, можно предположить, что на нее кроме температуры влиял и вид продукта.

Культивирование листерий на пищевых продуктах приводит к тому, что штаммы становятся физиологически и биохимически более активными. Показанная изменчивость биохимической активности листерий, культивируемых на продуктах питания, находит подтверждение в работах основоположников учения о листериозе – М. Barber, П.П. Сахаровой и Е.И. Гудковой [8], показавших, что сахаролитические свойства *L. monocytogenes* являются очень лабильными и относительными, особенно это касается такого субстрата, как арабиноза. Кроме того, известно, что длительное обитание листерий в нестерильной почве также приводило к вариативности их биохимических свойств в отношении указанных сахаров и аминокислот [10].

Следует отметить неоднозначное влияние вида продукта и условий его хранения на проявление факторов патогенности у листерий. Так, у штаммов на сосисочном субстрате при низкой температуре (независимо от наличия вакуума) усиливались адгезивные свойства и повышалась вирулентность. Важно отметить, что данные штаммы относились к сероварианту 1/2а. По данным Е.А. Зайцевой [4], в эксперименте на музейных культурах при низких температурах культивирования повышалась адгезия к эритроцитам у большинства штаммов данного серотипа. Но в большей степени, чем на сосисочном субстрате, повышались эти свойства у листерий при культивировании на сыре в вакууме, независимо от температуры. Именно вакуум в данной ситуации способствовал усилению вирулентности.

Культивирование *L. monocytogenes* на креветочном субстрате не привело к сколько-нибудь значимому изменению ее свойств. Следовательно, при контаминировании листериями продуктов питания на проявление факторов патогенности возбудителя могут оказывать влияние как температура его хранения, так и наличие вакуумной упаковки в зависимости от вида продукта. Появление устойчивости у листерий, культивируемых на продуктах питания, к антимикробным препаратам II–III поколения можно характеризовать как проявление адаптивных свойств в отношении действия факторов внешней среды.

Следует отметить, что все описанные изменения носили фенотипический характер, так как пассирование на кровяном и дрожжевом агаре приводило к восстановлению первоначальных свойств листерий. Возникающие модификационные изменения *L. monocytogenes* необходимо учитывать при выделении и идентификации возбудителя из продуктов питания.

Таким образом, специфической особенностью листерий, позволяющей им выживать и сохраняться во внешней среде, является исключительная способность адаптироваться к новым условиям существования. Подобная адаптивная изменчивость – одна из наиболее распространенных форм изменчивости, существующих в условиях естественного пребывания микроба во внешней среде. Культивирование листерий на пищевых продуктах под воздействием абиотических факторов формирует субпопуляции микро-

организмов, наиболее адекватные к условиям данной экологической ниши.

Литература

1. Бакулов И.А., Васильев Д.Ф. Бактериологический контроль пищевых продуктов на наличие листерий. Ульяновск: Изд-во Ульяновской гос. сельхоз. академии, 1999. 37 с.
2. Брилис В.И., Брилене Т.А., Ленцнер Х.П. и др. Методика изучения адгезивного процесса микроорганизмов // Лаб. дело. 1996. № 4. С. 210–212.
3. Ермолаева С.А., Белый Ю.Ф., Тартаковский И.С. Изменение уровня экспрессии факторов вирулентности *Listeria monocytogenes* под влиянием внешних условий // Мол. ген. микробиол. и вирусол. 2000. № 1. С. 17–19.
4. Зайцева Е.А., Сомов Г.П. Влияние температуры на адгезивные свойства листерий // Журн. микробиол. эпидемиол. и иммунол. 2006. № 3. С. 20–23.
5. Медицинская микробиология / под ред. В.И. Покровского и О.К. Поздеева. М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. 1200 с.
6. Поляк М.С. Определение чувствительности микроорганизмов к противомикробным препаратам «Метод дисков». СПб.: НИЦ фармакотерапии, 1997. 21 с.
7. Рубан Е.Л. Физиология и биохимия представителей рода *Pseudomonas*. М.: Наука, 1986. 199 с.
8. Сахаров П.П., Гудкова Е.И. Листереллезная инфекция. М.: Изд-во АМН СССР, 1950. 205 с.
9. Сомов Г.П., Бузолева Л.С., Зайцева Е.А. и др. О существовании патогенных бактерий в окружающей среде // Вестн. ДВО РАН. 2000. № 3. С. 3–9.
10. Сомов Г.П., Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. Владивосток: Примполиграфкомбинат, 2004. 167 с.
11. Тартаковский И.С., Малеев В.В., Ермолаева С.А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М.: Медицина для всех, 2002. 200 с.
12. Garrido V., Vitas A.I., Garsia-Jalon I. Survey of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products: Prevalence by brands and retail establishments for exposure assessment of listeriosis in Northern Spain // *L. monocytogenes* Food Control. 2009. Vol. 20, No. 11. P. 986–991.
13. Schmidt U., Kaya M. Verhalten von *Listeria monocytogenes* in vacuum verpacktem Brühwürstaufschnitt // *Fleischwirtschaft*. 1990. Vol. 70, No. 3. P. 236–240.
14. Stecha P.F., Heyness C.D., Rol J.T. et al. Effects of growth temperature on the ingestion and killing of clinical isolates of *Listeria monocytogenes* by human neutrophils // *J. Clin. Microbiol.* 1989. Vol. 42. P. 1572–1576.
15. Wang Guang-hua, Shi Mao-zhan. The behaviour of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed sliced Chinese spiced beef // *Fleischwirtschaft*. 1997. Vol. 77, No. 1. P. 57–58.

Поступила в редакцию 15.02.2010.

FOOD PRODUCT STORAGE CONDITIONS AND MODIFYING BIOLOGICAL PROPERTIES OF LISTERIA MONOCYTOGENES

N.B. Tsvetkova, L.S. Buzoleva, V.S. Obukhova

Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Siberian Branch of RAMS (1 Selskaya St. Vladivostok 690087 Russia)

Summary – The authors show variability of biological properties of *Listeria monocytogenes* modified under the influence of various abiotic factors when it is cultivated on food products. A combined effect of a temperature and vacuum results in an increased physiological and biochemical activity of the strains. As indicated, *L. monocytogenes*'s disease-inciting power depends on a type of food product, cultivation temperature and vacuum. The sausage substrate at low temperature increases adhesive properties and virulence. The cheese one manifests the same characteristics at vacuum. All the strains cultivated on food products demonstrate II–III generation antibiotic resistance.

Key words: *Listeria monocytogenes*, food products, storage conditions, biological properties.

Pacific Medical Journal, 2010, No. 4, p. 36–39.