

УДК 579.672

ВЫДЕЛЕНИЕ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ИЗ ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ УСКОРЕННЫМ МЕТОДОМ

Т.В. Младшева, магистрант, А.С. Гранкина, магистрант, Н.И. Молофеева, к.б.н., доцент, С.В. Мерчина, к.б.н., доцент, Н.Г. Барт, к.б.н., доцент
тел. 8(8422)55-95-47
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: идентификация, продукты питания, бактерии рода *Listeria*, ускоренный метод.

Работа посвящена выделению *Listeria monocytogenes* из продуктов питания ускоренным методом. При проведении исследования по данной методике, авторами были выделены листерии из пяти образцов.

Исследования проводятся в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ, выполняемых по заданию МСХ РФ в 2019 году.

Введение. *L. monocytogenes* был выделен из широкого спектра продуктов, готовых к употреблению (RTE), и является причиной нескольких вспышек листериоза, связанных с употреблением мяса, птицы, молочных продуктов, рыбы и овощей [1-4]. Даже когда *L. monocytogenes* изначально присутствует в небольших количествах в пищевых продуктах, он может размножиться с различными скоростями при охлажденном хранении в зависимости от типа пищевого продукта, как в аэробных, так и в анаэробных условиях, адаптироваться к дезинфицирующим средствам [5-8].

Материалы и методы исследований. Нами были взяты для исследования пробы от следующих продуктов:

Проба №1 - Фарш говяжий «Черкизово» охлажденный, проба №2 - Фарш домашний свино-говяжий охлажденный «Мираторг», проба №3 - Голень куриная «Юрма», проба №4- Окорок, проба №5 - Голень куриная «Акашево», пробы №6-№10 - Окорок, контаминированный культурой *Listeria monocytogenes* №56 в концентрации 10^1 КОЕ- 10^5 КОЕ соответственно.

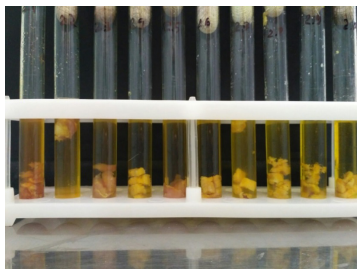


Рисунок 1 – Исследуемые пробы в бульоне Фразера

Проводили выделение *Listeria monocytogenes*, используя ускоренный метод, предложенный Васильевым Д.А. [].

Исследуемые пробы измельчали и смешивали со средой накопления, в нашем случае - бульон Фразера (Fraser Broth Base HiMedia Laboratories Pvt. Limited) в соотношении 1:8 (1 часть продукта и 8 частей среды). Полученную суспензию встряхивали в течение 1 минуты и помещали в термостат при $(28\pm 3)^\circ\text{C}$ на 24-48 часов (рис.1).

При росте листерий на бульоне Фразера отмечается почернение среды, что мы и наблюдали через 24 часа инкубирования во всех пробах, но это не дает точного результата выделения *Listeria monocytogenes*.

Через сутки 1 мл полученной бактериальной суспензии смешивали с 5 мл 0,3 % раствора KOH (растворенного в 5% NaCl), встряхивали и через минуту высевали на селективные среды - Оксфорд (Listeria Oxford Medium Base, India) и хромогенный агары (Chromogenic Listeria Agar Base TM Media, Rajasthan, India).

Посевы инкубировали при $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24-48 часов.

Через 24 часа наблюдали рост на чашках Петри. В пробе №3 выросли зелено-голубые крупные колонии с шероховатой поверхностью, при микроскопировании мазков были обнаружены грамположительные крупные палочки (бациллы). В пробах №6-№10 наблюдали рост росинчатых колоний голубого цвета на хромогенном агаре, на Оксфорд агаре выросли мелкие колонии, сероватые, окруженные черным ореолом углубленным центром.

Результаты представлены в таблице 1.

Следующим шагом было приготовление мазков идентичных колоний для окраски по методу Грама.

**Таблица 1 - Рост на селективных средах при (37±1)°С
в течение (24±3) ч.**

№ пробы	Рост на Оксфорд агаре	Рост на хромогенном агаре
Проба №1	-	-
Проба №2	-	-
Проба №3	+	+
Проба №4	-	-
Проба №5	-	-
Проба №6	-	+
Проба №7	+	+
Проба №8	+	+
Проба №9	+	+
Проба №10	+	+

Примечания:

«-» - рост отсутствует

«+» - рост на чашках Петри

В пробах №6-№10 нами были обнаружены грамположительные короткие палочки с закругленными концами.

Для точной идентификации культуры *Listeria monocytogenes* мы решили использовать метод ПЦР в режиме реального времени и классическую ПЦР с электрофоретической детекцией, результаты представлены на рисунках 2-3.

Предполагаемые колонии, относящиеся к роду листерий, подращивали в течение 24 часов при (37±1)°С.

Из суточных бульонных культур отбирали 1,5 мл бактериальной взвеси в одноразовые стерильные полипропиленовые пробирки. Центрифугировали при 13000 об/мин. и убирали надосадочную жидкость.

Для выделения ДНК использовали «ДНК-сорб-АМ» («ИнтелЛаб-Сервис», Москва). Полученный супернатант, содержащий ДНК сразу использовали в полимеразной цепной реакции.

Результаты интерпретировали на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне (0,05) пороговой линией (threshold) значения порогового цикла «Ст».

Образец считали отрицательным, если значение «Ст» по каналу Нех для *L.monocytogenes* отсутствовало (рис.2).

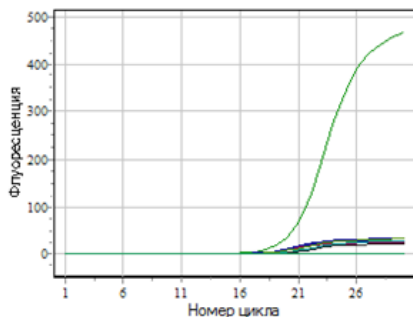


Рисунок 2 - Зависимость флуоресценции канала HEX от номера цикла при исследовании проб №6-№10 с праймерами для *L.monocytogenes*

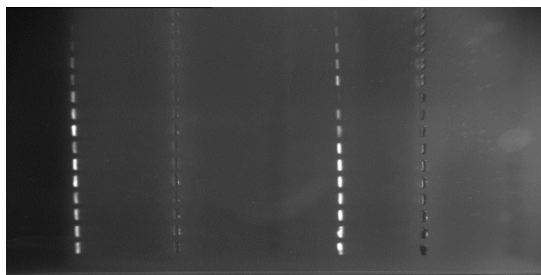


Рисунок 3 - Электрофореграмма ПЦР-продуктов из проб №6-№10

По выбранной нами методике ускоренного выделения листерий из пищевого сырья и продуктов питания, предположительные колонии бактерий рода листерий, были обнаружены в пробах №6-№10. С помощью полимеразноцепной реакции провели точную идентификацию, и выяснили, что в данных пробах содержалась культура *L.monocytogenes*.

Заключение. Выделили листерии из отобранных проб ускоренным методом используя «Способ выделения листерий из пищевых продуктов // патент № 2068880 (автор Васильев Д.А.)». Чувствительность метода равна 10 КОЕ/ 1 мл. Время проведения исследования до этапа типирования культур - 72 часа.

Библиографический список:

1. Сульдина Е. В., Васильев Д. А. Количественное определение патогенных листерий в пищевом сырье и продуктах питания //Иновации в пищевой тех-

- нологии, биотехнологии и химии. – 2017. – С. 202-204.
2. Васильев Д. А. и др. Разработка параметров количественного определения бактерий видов *Listeria monocytogenes* и *Listeria ivanovii* на основе мультиплексной ПЦР в режиме «реального времени» //Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных. – 2014. – С. 91-96.
 3. Сульдина Е. В., Васильев Д. А. Разработка параметров количественного определения патогенных листерий в пищевом сырье и продуктах питания методом Real-Time PCR //Молекулярная диагностика 2017. – 2017. – С. 412-413.
 4. Сульдина Е. В., Васильев Д. А. Оптимизация эффективности мультиплексной ПЦР-тест-системы для детекции *L. monocytogenes* и *L. ivanovii* //Молекулярная диагностика 2017. – 2017. – С. 425-426.
 5. Гранкина А., Сульдина Е. В. Идентификация штаммов листерий коллекции 1960-1970 гг. методом ПЦР // Молодежь и наука XXI века. – 2017. – С. 66-71.
 6. Сульдина Е. В., Ковалева Е. Н., Васильев Д. А. Основные биологические свойства листериозных бактериофагов //Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения. – 2015. – С. 125-127.
 7. Сульдина Е. В. и др. Выделение листериозных бактериофагов и изучение их основных биологических свойств //Аграрный научный журнал. – 2015. – №. 3. – С. 37-41.
 8. Сульдина Е. В., Васильев Д. А., Обухов И. Л. Бактериофаги бактерий *Listeria spp.* и их биологические свойства //Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. – №. 3 (43).

EXTRACTING LISTERIA MONOCYTOGENES FROM FOOD RAW MATERIALS AND FOOD PRODUCTS BY THE ACCELERATED METHOD

***Mldsheva T.V., Grankina A.S., Molofeeva N.I.,
Merchina S.V., Bart N.G.***

Key words: *identification, food, bacteria of the genus Listeria, accelerated method.*

The work is devoted to the selection of Listeria monocytogenes from food products by an accelerated method. When conducting research on this technique, the authors isolated Listeria from five samples.