

УДК 619.637.07

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ

Молофеева Н.И., кандидат биологических наук, доцент,
тел. 8(8422) 55-95-47; nadezhda.molofeeva.67@mail.ru
Мерчина С.В., кандидат биологических наук, доцент
тел. 8(8422) 55-95-47; sv2309@yandex.ru
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: мясо, контаминация, бактерии, биохимические свойства, бактериофаги, идентификация.

*Работа посвящена выделению и изучению биологических свойств бактерий *Shigella sonnei* и *Escherichia coli* O157 из сырья и продуктов птицеводства бактериологическим методом и с использованием бактериофагов.*

Введение. Мясо птицы является наиболее скоропортящимся продуктом по сравнению с другими продуктами животного происхождения. Это обусловлено как его химическим составом, так и спецификой уоя и обработки, предусматривающих нагревание в воде (шпарка) и механическое воздействие при снятии оперения, что особенно неблагоприятно отражается на качестве и стойкости продукта при хранении. В связи с этим большое значение приобретает заключительная операция — холодильная обработка тушек птицы (остывание, охлаждение и замораживание), от которой в значительной степени зависит качество мяса птицы при последующем хранении [1].

В тушке после уоя птицы развиваются химические и ферментативные процессы, наблюдается рост микроорганизмов, которые могут привести к порче мяса. Эти процессы при низкой температуре значительно замедляются. Большое значение для сохранности мяса птицы имеет санитарное состояние производства: чем меньше первоначальная обсемененность тушек микробами, тем более продолжительное время сохраняется продукт. Очень важно не

допускать колебаний температуры и относительной влажности при хранении охлажденной или мороженой птицы [2].

Мясо птицы может быть контаминировано различными микроорганизмами, в том числе способными испортить продукт при хранении в холодильнике, а также некоторыми возбудителями пищевого происхождения.

Фаги являются многообещающим средством контроля бактериального загрязнения пищевых продуктов [3].

Материалы и методы исследований. В качестве образца было выбрано следующая продукция птицеводства: фарш и колбаса, так как в конкретных факторах риска при пищевых вспышках дизентерии и эшерихиоза часто мясные продукты

Исследования проводили по методикам, изложенным в действующих стандартах, инструкциях, методических рекомендациях [4].

Результаты исследований и их обсуждение. Первым этапом нашей работы было выделение бактерий *Shigella sonnei* и *Escherichia coli* O157 из исследуемых образцов. Параллельно объекты контаминировали искомыми бактериями. Для контаминации образцов готовили разведения суточной культуры бактерий вида *E. coli* O157 : H7 и *Shigella sonnei* определяли концентрацию клеток в каждом разведении. Для контаминации использовали разведения 10^5 до 10^9 , что соответствовало наличию бактерий в 1 мл от 10 000 до 1 КОЕ.

Первичное обогащение анализируемых образцов для выделения бактерии *Sh. sonnei* использовали бульоне МакКонки, так как бактерии *Shigella sonnei* в продукте могут находиться в небольшом количестве, очень часто на фоне значительного количества микроорганизмов других родов, для выделения *E. coli* O157 : H7 в качестве сред обогащения использовали среду Кесслера. После термостатирования посевов при 37°C в течение 18—24 час проводили высеив на среды Эндо, XLD агар, аргар Плоскирева и сальмонелла шигелла агар [5].

Дополнительной питательной средой для выявления *E. coli* O157 : H7 является сорбитол *E. coli* O157:H7 агар, потому что плотная питательная среда, используемая для выделения колиформных бактерий (Эндо), не может быть использована для целенаправленного

поиска *E. coli O151 :H7*, т. к. данный микроорганизм разлагает лактозу подобно другим эшерихиям.

На мясо-пептонном агаре через 24 часа выросли S-формы колоний, диаметр которых составлял 1,0-2,0 мм. Колонии круглые, сферически выпуклые, с ровными краями, полупрозрачные, блестящие, мягкой консистенции, сероватого цвета. В образцах, не загрязненных искомыми бактериями колоний по культуральным свойствам характерным для *Escherichia coli O157* и *Shigella sonnei* не обнаружили. В образцах, загрязненных *Escherichia coli O157* и *Shigella sonnei* были обнаружены колонии, характерные для данных культур во всех разведениях.

В мазках, окрашенных по Грамму шигеллы и эшерихии представляют собой неподвижные грамотрицательные палочки с закругленными концами, расположенные беспорядочными скоплениями.

Для изучения культуральных свойств посев производили на среды XLD-агаре, Эндо, шигелла-сальмонелла агар и висмут-сульфитный агар. На среде Эндо шигеллы образуют бесцветные, блестящие, полупрозрачные колонии цвета среды. Они слегка выпуклые, с ровными краями, имеют мягкую консистенцию и легко снимаются петлёй. Колонии *S. sonnei* способны к отсроченному расщеплению лактозы, в результате чего на вторые сутки на среде Эндо они приобретают красноватый оттенок, образуют более мелкие и нежные колонии [6].

Для изучения биохимических свойств использовали следующие тесты: метиловый красный, Фогес – Проскауера, индол, индол, сероводород, цитрат Симмонса, сорбитол, лактоза, манитол, сахароза, глюкоза, каталаза, оксидаза, орнитиндекарбоксилаза, уреазы. Для дифференциации шигелл с другими энтеробактериями, а именно с эшерихиями произведен посев на среду с лизином, шигеллы отрицательны в пробе с лизином, а эшерихии, сходные по биохимическим признакам положительны. По биохимическим свойствам шигеллы лактозоотрицательные, что показывает отрицательный результат на среде с лактозой [7]. Результаты биохимических тестов представлены в таблице 1.

Таблица 1. Дифференциация бактерий *Escherichia coli* O157 и *Shigella sonnei* по биохимическим свойствам

№	Тест или субстрат	Штаммы бактерий		
		<i>E. coli</i> O157 №904	<i>E. coli</i>	<i>Shigella sonnei</i>
1	Сорбитол	-	+	-
2	D-глюкуронидаза	-	+	+
3	Цитрат Симмонса	-	-	-
4	Сероводород	-	-	-
5	Рамноза	+	+/-	-
6	Глюкоза (газ)	+	+	+
7	Лактоза	+	+/-	+ (через 72 часа)
8	Сахароза	+	+/-	-
9	Маннит	+	+	+
10	Арабиноза	+	+	-
11	Адонит	-	-	-
12	Каталаза	+	+	+
13	Оксидаза	-	+/-	-
14	Дульцит	+	+/-	+
15	Раффиноза	+	+/-	-
17	Орнитиндекарбоксилаза	+	+/-	+
18	Лизиндекарбоксилаза	+	+	-
19	Аргининдегидролаза	-	+/-	-
20	Индол	+	+	-
21	Реакция с метиловым красным	+	+	+
22	Реакция Фогеса-Проскауэра	-	-	-

Одним из тестов дифференциации бактерий видов *Shigella sonnei* является тест на орнитиндекарбоксилазу. Цель состоит в том, чтобы выяснить, способен ли микроб утилизировать орнитин, аминокислота это источник углерода и энергии для роста.

Утилизация орнитина достигается ферментом, называемым орнитиндекарбоксилазой. Для постановки данного теста использовали бульон орнитиндекарбоксилазы, которая представляет собой питательный бульон, в который добавлено 0,5% орнитина. Культивирование проводили в течение 24 часов при температуре от 35 до 37°C, чтобы микроб мог использовать орнитин.

Изменение обратно на фиолетовый после желтого является признаком

положительного результата теста на деградацию орнитина. Отсутствие пожелтения в течение 24 часов или изменение цвета на фиолетовый через 48 часов является отрицательным результатом.

Посев изучаемых бактерий на среду Клиглера проводили с целью определения их способности ферментировать лактозу, глюкозу, образовывать газ и сероводород.

Учет результатов производили каждые сутки, но не позднее 48 ч инкубации при температуре $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ по способности энтеробактерий ферментировать лактозу (пожелтение скошенной части среды), что характерно для бактерий вида *Shigella sonnei* через 48 часов.

Для дифференциации лактозоотрицательных эшерихий использовали тест на маннит. Они положительно реагируют с метиловым красным. Реакцию с метиловым красным проводят, выращивая культуру на среде Кларка. Положительная реакция проявляется красным окрашиванием среды при добавлении к культуре индикатора.

Изучаемые бактерии не продуцируют сероводород, что видно при культивировании. В случае отрицательной реакции среда остается красной, либо скошенная поверхность приобретает малиновый оттенок.

Цитратный агар Симмонса использовали для изучения способности использовать цитрат в качестве источника углерода и ионы аммония в качестве единственного источника азота. Результаты на среде Симмонса получили отрицательные.

Тесты метиловый красный и Фогес Проскауэр проводили для дифференциации двух основных типов факультативно-анаэробных кишечных бактерий и ацетоинобразующих бактерий.

Метиловый красный – это индикатор pH, которая позволяет выявить кислотообразующие бактерии, а тест Фогеса-Проскауэра помогает в обнаружение ацетоина (нейтрально реагирующие конечные продукты), продуцирующие бактерии при культивировании в определенных средах

Изучаемые микроорганизмы можем идентифицировать по ферментации лактозы, это один из немногих тестов по которым можем идентифицировать микроорганизмы видов *Shigella*.

Как дополнительные тесты нами были изучены свойства на каталазу и оксидазу. Метод определения активности каталазы. Метод основан на свойстве перекиси водорода разлагаться под влиянием каталазы на воду и кислород Все шигеллы не утилизируют цитрат Симмонса. Каталазоположительные. Оксидазоотрицательные. Как

дополнительные тесты нами были изучены свойства на каталазу и оксидазу. Метод определения активности каталазы. Метод основан на свойстве перекиси водорода разлагаться под влиянием каталазы на воду и кислород. Из распространённых углеводов шигеллы ферментируют образованием кислоты только D-глюкозу. Бактерии ферментируют арабинозу, глицерин, мальтозу, маннит, мелибиозу, рамнозу, раффинозу, D-сорбит, трегалозу, салицина, сахарозы.

Характерной биохимической особенностью энтерогеморрагических кишечных палочек *E. coli* O157 : H7, в отличие от других *E. coli*, является отсутствие способности продуцировать фермент P-D-глюкуронидазу (95 % штаммов) и расщеплять сорбитол. В остальном биохимические свойства штаммов *E. coli* O157 : H7 практически не отличаются от таковых у *E. coli*: ферментируют с кислотообразованием углеводы - глюкозу, маннит, лактозу; не ферментируют адонит и инозит; сбраживают вариабельно рамнозу, сахарозу, салицин, дульцит, раффинозу; не образуют сероводород; не утилизируют цитрат, малонат; не имеют фенилаланиндезаминазы, уреазы; утилизируют ацетат; дают положительную реакцию с метиловым красным и отрицательную Фогеса-Проскауэра; обладают ферментом P-D-галактозидазой; большинство штаммов (89 %) расщепляют аминокислоты лизин и орнитин, не расщепляют аргинин [7].

В результате приведенных исследований по выделению и идентификации выше названных микроорганизмов из фарша и колбасы по стандартной методике, *Shigella sonnei* и *E. coli* O157 были выделены из образцов, контаминированных бактериями в 1 грамме продукта 10^5 .

Поэтому назрела необходимость внедрения микробиологических исследований с использованием современных экспресс-методов диагностики, которые сокращают время индикации и идентификации патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах.

Мы рекомендуем использовать комбинацию методов бактериологического выделения возбудителей из пищевого сырья и продуктов питания.

Присутствие и дифференциацию возбудителей дизентерии и эшерихиоза в исследуемой пробе предлагаем использовать

бактериофагов. Этот прием основан на специфичности действия бактериофагов и сокращает время исследования.

Для идентификации возбудителей эшерихиоза и дизентерии предлагаем использовать метод Отто (метод стекающей капли) с помощью специфичных диагностических фагов.

Выяснение источника инфекции может представлять значительную проблему. Фаговое типирование изолятов может быть важным инструментом как в эндемичных, так и в эпидемических ситуациях. Типирование может быть единственным способом определения источника инфекции у лиц, подвергшихся воздействию нескольких возможных источников. *Shigella* типировается с помощью ряда процедур, таких как серологическое типирование, биотипирование и бактериоциновое типирование, в дополнение к фаговому типированию. Серотипирование является достаточно отличительным в эпидемиологическом контексте, но имеет неоценимое значение для диагностики видов этого рода.

Характерной особенностью бактериофагов является их сродство к определенным бактериям, которое возникает благодаря их способности специфически распознавать молекулы, присутствующие на бактериальной поверхности хозяина. Это свойство было успешно использовано для диагностики и идентификации бактерий. Взаимодействия между фагами и их хозяевами зависят от морфологии фага, структуры поверхности бактерии окружающей среды. Так называемые моновалентные бактериофаги поражают определенный штамм бактерий, тогда как поливалентные бактериофаги проявляют специфичность к нескольким штаммам бактерий..

Для выполнения этого метода на чашку с МПА наносили каплю суточной бульонной культуры *Shigella sonnei* и *Escherichia coli* O157 и шпателем круговыми движениями распределяли по поверхности агара. Затем наносили каплю суспензии шигеллезной и эшерихиозной бактериофага соответственно и наклоном чашки давали капле стечь по поверхности агара [6, 7].

Посевы инкубировали в термостате в течение суток, после чего учитывали результаты. При соответствии фага и бактерий в месте нанесения диагностического фага наблюдается отсутствие роста культуры.

Закключение. Проводимый в лабораториях ветеринарно-санитарной экспертизы рынков контроль пищевых продуктов ограничивается лишь микроскопией, органолептическими и биохимическими показателями. Это не дает полной картины микробного пейзажа продуктов и не гарантирует их безопасность. Учитывая специфическое взаимодействие бактериофагов с бактериальной клеткой дает непосредственную возможность их использования для дифференциации. Феномен лизиса является основой для использования фага в лабораторной практике для идентификации патогенных продуктов. Этот прием основан на специфичности действия бактериофагов, в то же время сокращает время исследования до 46 часов.

Библиографический список:

1. Молофеева, Н. И. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Escherichia coli* 0157 и их применение в диагностике : специальность 03.00.0703.00.23 : автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Молофеева Надежда Ивановна. – Саратов, 2004. – 21 с.

2. Золотухин, С.Н. Методические рекомендации по ускоренной индикации и идентификации энтерогемморогической кишечной палочки *E. coli* O 157:H7 и O 157:H-в патологическом материале, кормах, пищевом сырье и объектах внешней среды с применением специфических бактериофагов : научное издание / С. Н. Золотухин, Н. И. Молофеева, Д. А. Васильев, Л. С. Каврук. – Москва : Российская академия сельскохозяйственных наук, 2005. – 16 с.

3. Рыскалиева, Б.Ж. Изучение тинкториальных, культуральных и биохимических свойств полученных штаммов бактерии *Pectobacterium carotovorum* / Б. Ж. Рыскалиева, Е. А. Ляшенко, Д. А. Васильев [и др.] // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: Материалы IX Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию Ульяновского государственного аграрного университета имени П.А. Столыпина, Ульяновск, 20–21 июня 2018 года. Том 2018-Часть 2. – Ульяновск:

Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, 2018. – С. 116-119.

4. Молофеева, Н. И. Биологическая характеристика фагов *Escherichia coli* O157 для создания диагностического препарата / Н. И. Молофеева, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности : Материалы Международной научно-практической конференции, Ульяновск, 23–25 апреля 2013 года / Редакционная коллегия: Д.А. Васильев, С.Н. Золотухин, А.В. Алешкин. Том 1. – Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина, 2013. – С. 87-91.

5. Куклина, Н.Г. Разработка метода индикации и идентификации *Aeromonas hydrophila* методом реакции нарастания титра фага / Н. Г. Куклина, Н. И. Молофеева, Н. Г. Барт [и др.] // Достижения молодых ученых в ветеринарную практику : материалы IV Международной научной конференции, посвященной 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, 06 декабря 2016 года. – Владимир: Федеральное государственное учреждение "Федеральный центр охраны здоровья животных", 2016. – С. 117-124.

6. Ширманова, К. О. Качество сосисок по нормативным показателям / К. О. Ширманова // Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии : Материалы IX-й Международной студенческой научной конференции, Ульяновск, 24–25 мая 2016 года. Том I. – Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия имени П.А. Столыпина, 2016. – С. 181-184.

7. Молофеева, Н. И. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Escherichia coli* O157 и их применение в диагностике : специальность 03.00.0703.00.23 : диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук / Молофеева Надежда Ивановна. – Ульяновск, 2004. – 166 с.

**COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF INDICATION
METHODS AND IDENTIFICATION OF PATHOGENIC
MICROORGANISMS IN FOOD PRODUCTS**

Malofeeva N.I., Merchina S.V.
FSBEI HE Ulyanovsk SAU

Keywords: *meat, contamination, bacteria, biochemical properties, bacteriophages, identification.*

*The work is devoted to the isolation and study of the biological properties of the bacteria *Shigella sonnei* and *Escherichia coli* O157 from raw materials and poultry products by bacteriological method and using bacteriophages.*