

УДК 579.672

## ВЫДЕЛЕНИЕ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ИЗ ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ ПО МЕЖГОСУДАРСТВЕННОМУ СТАНДАРТУ

*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*.

Работа посвящена выделению *Listeria monocytogenes* из продуктов питания по межгосударственному стандарту ГОСТ 32031-2012. При проведении исследования по данному методу, авторами было выделены листерии из двух образцов.

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

**Введение.** Изучение распространенности *L. monocytogenes* в продуктах готовых к употреблению (RTE) и в среде обработки очень важно. Готовые к употреблению мясные продукты могут быть загрязнены *L. monocytogenes* на нескольких стадиях, таких как сырье (мясо, молоко, овощи и др.), в процессе производства (оборудование) или при контакте с загрязненным необработанным сырьем, нечистыми поверхностями или людьми [1-6]. Неудивительно, что *L. monocytogenes* является одним из наиболее часто обнаруживаемых патогенов в мясных продуктах, и в нескольких исследованиях документально подтверждено, что уровень распространения патогена достигает 40–45% [7-8].

**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, загрязненный культурой *Listeria monocytogenes* №56 в концентрации  $10^1$  КОЕ- $10^5$  КОЕ соответственно.

Мы проводили выделение *Listeria monocytogenes* из образцов, используя методику Межгосударственного стандарта ГОСТ 32031-2012.

**Результаты исследований.** Измельченные пробы по 1 грамму добавляли в 8 мл полуконцентрированного бульона Фразера (Fraser Broth Base HiMedia Laboratories Pvt. Limited) и инкубировали при температуре  $(30\pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(24\pm 2)$  ч. т.к. бактерии рода листерии в продукте могут находиться в небольшом количестве, очень часто на фоне значительного количества микроорганизмов других родов. Поэтому для выявления небольшого количества бактерий рода листерия, а также «поврежденных» клеток в пробе необходим этап селективного обогащения на среде с пониженной концентрацией селективных компонентов. Половина бульона Фразера содержит половину концентрации налидиксовой кислоты и акрифлавина по сравнению с бульоном Фразера.

При росте листерий на бульоне Фразера отмечается почернение среды. Через сутки в исследуемых пробах изменений не было обнаружено, почернение среды бульона Фразера мы не наблюдали, поэтому выдерживали пробы еще сутки при  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ . Через 48 часов инкубирования проб бульон Фразера почернел.

Следующим этапом было вторичное обогащение посевного материала. Через двое суток из полученных посевов отбирали по 1 мл суспензии и переносили в пробирки с содержанием 8 мл бульона Фразера с полной концентрацией селективных компонентов, далее ставили в термостат при температуре  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  на 48 часов.

Через двое суток наблюдали почернение среды (рис.1). Результаты представлены в таблице 1.

Затем делали пересев исследуемого материала параллельно на две плотные селективные питательные среды – Оксфорд (*Listeria Oxford Medium Base, India*) и хромогенный агары (*Chromogenic Listeria Agar Base TM Media, Rajasthan, India*). Посевы культивировали при  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(24\pm 3)$  ч.

Через сутки наблюдали рост на чашках Петри. Результаты представлены в таблице 2. В пробах №9-№10 наблюдали рост росинчатых колоний голубого цвета на хромогенном агаре, на Оксфорд агаре выросли мелкие колонии, сероватые, окруженные черным ореолом.

В мазках из проб №9-№10, окрашенных по методу Грама, были обнаружены мелкие грамположительные палочки.

Но это не дает точной идентификации *Listeria monocytogenes*. Для дальнейшего типирования нами был выбран метод ПЦР в режиме реального времени.



Рисунок 1 – Рост на бульоне Фразера через 24 часа ( $37\pm 1$ ) °С

Таблица 1 – Изменение цвета среды на бульоне Фразера

№ пробы	Первичное обогащение		Вторичное обогащение
	24 часа	48 часов	24 часа
Проба №1	-	+	+
Проба №2	-	+	+
Проба №3	-	+	-
Проба №4	-	+	+
Проба №5	-	+	-
Проба №6	-	+	-
Проба №7	-	+	+
Проба №8	-	+	+
Проба №9	-	+	+
Проба №10	-	+	+

Примечания:

«-» - почернение среды отсутствует

«+» - почернение среды

Предполагаемые колонии, относящиеся к роду *Listeria*, подращивали в течении 24 часов при ( $37\pm 1$ )°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» («ИнтеЛаб-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 соот-

Таблица 2 – Рост на селективных средах при  $(37\pm 1)^\circ\text{C}$  в течение  $(24\pm 3)$  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	+	+

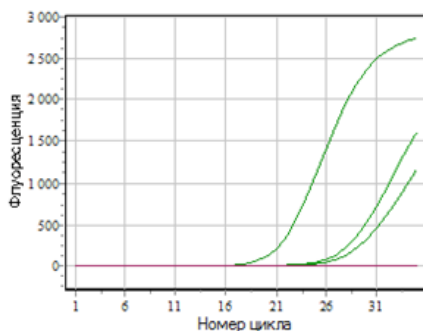


Рисунок 2 - Зависимость флуоресценции канала HEX от номера цикла при исследовании проб №9-№10 с праймерами для *L.monocytogenes*

ветствующем уровне (0,05) пороговой линией (treshhold) значения порогового цикла «Ct».

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

**Заключение.** Выделили культуры листерии из исследуемых проб при помощи методики указанной в Межгосударственном стандарт ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*. Установили, что чувствительность данного метода составила 10000 КОЕ /1 мл. Время проведения исследований до этапа ти-

пирования культур равно 144 часам.

*Библиографический список:*

1. 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.
2. Сульдина Е. В., Васильев Д. А. Количественное определение патогенных листерий в пищевом сырье и продуктах питания //Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии. – 2017. – С. 202-204.
3. 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).
4. 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.
5. 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.
6. Сульдина Е. В. и др. Выделение листериозных бактериофагов и изучение их основных биологических свойств //Аграрный научный журнал. – 2015. – №. 3. – С. 37-41.
7. 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.
8. Гранкина А., Сульдина Е. В. Идентификация штаммов листерий коллекции 1960-1970 гг. методом ПЦР // Молодежь и наука XXI века. – 2017. – С. 66-71.

## **ALLOCATION OF LISTERIA MONOCYTOGENES FROM FOOD RAW MATERIALS AND FOOD PRODUCTS BY INTERSTATE STANDARD**

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

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

*The work is dedicated to the selection of Listeria monocytogenes from food products according to the interstate standard GOST 32031-2012. When conducting research on this method, the authors isolated Listeria from two samples.*