

ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБНОСТИ *LISTERIA MONOCYTOGENES* ФОРМИРОВАТЬ БИОПЛЕНКИ В КОНСОРЦИИ С САПРОФИТНЫМИ БАКТЕРИЯМИ

^{1,2}Богатыренко Е.А., ^{1,2}Бузолева Л.С., ¹Бердасова А.С.

¹Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия (690950, г.Владивосток, ул.Суханова, 8)

²ФГБУ НИИЭМ им. Г.П. Сомова СО РАМН, Владивосток, Россия (690087, г. Владивосток, ул. Сельская, 1, e-mail: bogatyrenko.ea@dvfu.ru)

Для исследования способности патогенных бактерий формировать биопленки совместно с сапрофитными микроорганизмами были использованы штаммы *Listeria monocytogenes* и штаммы сапрофитов, выделенные с различных продуктов питания. Работа осуществлялась по модифицированному методу, основанному на спектрофотометрической оценке количества связанного с биопленкой 1%-ого раствора кристаллического фиолетового. Эксперимент проводили при действии разных температур: 5°C, 22°C и 37°C. Показано, что при 37°C листерии эффективно формировали биопленки в монокультуре, однако при 5°C и 22°C эта способность утрачивалась. Присутствие в среде с листериями сапрофитных бактерий оказывало неоднозначное действие на биопленкообразование. При 37°C сапрофиты как стимулировали, так и угнетали этот процесс. Однако, при температурах 5°C и 22°C все исследуемые сапрофитные микроорганизмы положительно влияли на образование биопленок с патогенными бактериями. Установлено, что самое эффективное образование биопленок листерий и сапрофитов наблюдалось при 22°C.

Ключевые слова: *Listeria monocytogenes*, биопленка, сапрофитные бактерии, температура, сообщества

RESEARCH OF ABILITY OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* TO FORM BIOFILMS IN CONSORTIUM WITH SAPROPHYTIC BACTERIA

^{1,2} Bogatyrenko E.A., ^{1,2} Buzoleva L.S., ¹Berdasova A.S.

¹Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia (690950, Vladivostok, Sukhanova st. 8)

² Research institute of epidemiology and microbiology n.a. G.P. Somov, Vladivostok, Russia (690087, г. Владивосток, Selskaya st. 1), e-mail: bogatyrenko.ea@dvfu.ru

For research of ability of pathogenic bacteria to form biofilms in interaction with saprophytic microorganisms the strains of *Listeria monocytogenes* and strains of saprophytes isolated from various food were used. The work was carried out with the modified method based on a photometric estimation of quantity of 1% solution of the crystal violet joined with a biofilm. Experiment was carried out at 5 °C, 22°C and 37°C. It is shown that at 37°C *L. monocytogenes* effectively formed biofilms in a monoculture, however at 5°C and 22°C this ability was lost. Presence of saprophytes in medium with *L. monocytogenes* had ambiguous effect on biofilm formation process. So, at 37°C saprophytes rendered the action both stimulating and inhibiting on formation of biofilms. However, at temperatures of 5°C and 22°C all studied saprophytic microorganisms positively influenced formation of biofilms with pathogenic bacteria. It is established that the most effective formation of biofilms of *L. monocytogenes* and saprophytes was observed at 22 °C.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, biofilm, saprophytic bacteria, temperature, communities

В настоящее время рядом авторов доказана и широко освещена ведущая роль в распространении листериозной инфекции таких пищевых продуктов как молоко, сыры, сливочное масло, колбасы, мясные полуфабрикаты [3, 5]. Но, в литературе представлены, в основном, эпидемиологические данные, которые не дают представлений о ключевых факторах, оказывающих влияние на изменение биологических свойств патогенных бактерий. Рассматривая пищевые продукты, как экологическую нишу, занимаемую листериями, как правило, основное внимание исследователей уделяется изучению динамики численности патогенных бактерий под влиянием абиотических факторов [1, 6]. Но, помимо абиотических,

на свойства возбудителей могут оказывать влияние и биотические факторы среды, так как листерии входят в состав биоценозов с сапрофитными микроорганизмами, контаминирующими продукты питания. Кроме того, известно, важнейшим механизмом адаптации *L. monocytogenes* является их способность к существованию и размножению в составе биопленок. На формирование биопленок листериями также могут оказывать влияние сапрофитные микроорганизмы, обсеменяющие пищевые продукты, что необходимо учитывать при эколого-эпидемиологических исследованиях [4, 7]. Вероятно, что биотические взаимодействия наравне с абиотическими факторами играют определенную роль в реализации адаптационных механизмов *L. monocytogenes*, однако, характер этих взаимодействий мало изучен.

Цель работы – изучить способность *L. monocytogenes* формировать биопленки в консорциуме с сапрофитными бактериями, выделенными с продуктов питания, при действии различных температур.

Материал и методы исследования

Для изучения способности *Listeria monocytogenes* образовывать биопленки при взаимодействии с сапрофитными микроорганизмами использовали штаммы *L. monocytogenes* 5642/6 и 9156/2 из коллекции НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П. Сомова СО РАМН. В качестве тест-культур сапрофитных бактерий были выбраны 8 штаммов, выделенных из различных продуктов питания.

Опыт проводили на плоскодонных иммунологических планшетах при культивировании микроорганизмов на бульоне КД с добавлением 1% глюкозы при температурах 5 °С, 22 °С и 37°С в течение 3 суток. Для каждой изучаемой комбинации в лунки вносили по 1 мл суспензий листерий и 1 мл суспензий сапрофитных бактерий в концентрации 10^7 КОЕ/мл. Интенсивность биопленкообразования определяли на третьи сутки эксперимента по модифицированному методу, основанному на спектрофотометрической оценке количества связанного с биопленкой 1%-ого раствора кристаллического фиолетового [2]. В качестве контроля служили значения оптической плотности элюатов, полученные для биопленок листерий без сапрофитов. Каждый опыт повторяли трижды.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе работы было установлено, что при температуре 37°С оптическая плотность элюатов с поверхности лунок, содержащих только клетки листерий составила для штамма 5642/6 - 0,223, для штамма 9156/2 - 0,088 (табл.1). Для дальнейшего изучения способности листерий образовывать биопленки совместно с сапрофитными микроорганизмами были поставлены опыты с использованием 8 штаммов бактерий, выделенных с продуктов питания.

Полученные данные представлены в таблице 1.

Как видно из приведенных материалов, при температуре 37°C присутствие в среде с листериями тест-культур под номерами 4-1, 1-4 и 7-3488/3/1 положительно влияло на образование биопленок обоих штаммов листерий. Указанные сапрофитные бактерии усиливали процесс биопленкообразования на 18 – 150% по сравнению с контролем. При этом наибольший стимулирующий эффект оказывал штамм 4-1, выделенный с рубленой колбасы.

Ингибирующее влияние на образование биопленок оказали штаммы 9-2, 7с, 3-3492/3/3 и 5557/1, при этом интенсивность процесса снижалась на 22-78%. Интересно отметить, что штамм 2-3 по-разному влиял на биопленки штаммов *L. monocytogenes*. Для штамма 5642/6 наблюдалось усиление процесса на 16%, для 9156/2 – наоборот, отмечалось ухудшение формирования биопленки на 69%.

При понижении температуры эксперимента до 22°C обнаружена потеря способности исследуемых штаммов листерий образовывать биопленки в монокультуре. Однако, при добавлении в среду сапрофитов наблюдалось их стимулирующее действие на этот процесс. Все тест-культуры сапрофитов в разной степени стимулировали биопленкообразование: оптическая плотность смывов возрастала до 0,026 - 0,579. Наибольший положительный эффект для обоих штаммов листерий оказал штамм 7-3488/3/1, выделенный с мясных полуфабрикатов.

Стоит отметить, что при более низкой температуре 5°C листерии также не образовывали биопленок, но в присутствии сапрофитных бактерий эта способность вновь появлялась. Как и в случае культивирования при температуре 22°C, все исследуемые тест-культуры оказывали положительное влияние на формирование листериями биопленок. Оптическая плотность смывов возрастала до 0,040 – 0,286. Наибольший стимулирующий эффект оказали штаммы 7-3488/3/1 и 7с, выделенные с мясных полуфабрикатов и сыра соответственно.

Таким образом, установлено, что самое эффективное образование биопленок листерий и сапрофитов наблюдалось при 22°C, что, вероятно, связано с тем, что такая температура является наиболее оптимальной для интенсивного развития сапрофитной микрофлоры, с которой листерии вступают в симбиотические отношения. Утрата листериями способности образовывать биопленки в монокультуре при температурах ниже 37°C компенсируется способностью образовывать биопленки во взаимодействии с сапрофитами, что является важным адаптационным механизмом выживания и размножения листерий вне теплокровных организмов.

Таблица 1

Количественная оценка интенсивности образования биопленок *L. monocytogenes* и

сапрофитных бактерий

Сочетание штаммов (источник выделения сапрофита)	Оптическая плотность, t=37°C	Оптическая плотность, t=22°C	Оптическая плотность, t=5°C
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + № 9-2 (замороженная говядина)	0,050	0,007	0,058
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + № 4-1 (колбаса рубленая)	0,347	0,248	0,079
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + № 2-3 (сосиски)	0,259	0,026	0,109
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + № 1-4 (колбаса полукопченая)	0,263	0,106	0,061
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + № 7с (сыр)	0,071	0,291	0,209
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + № 7-3488/3/1 (п/ф колбаски для жарки)	0,270	0,405	0,240
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + № 3-3492/3/3 (пельмени)	0,173	0,379	0,095
<i>L. monocytogenes</i> 5642/6 + № 5557/1 (пресервы из сельди)	0,151	0,363	0,082
<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + № 9-2 (замороженная говядина)	0,036	0,065	0,060
<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + № 4-1 (колбаса рубленая)	0,220	0,344	0,040
<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + № 2-3 (сосиски)	0,027	0,110	0,153
<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + № 1-4 (колбаса полукопченая)	0,130	0,219	0,050
<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + № 7с (сыр)	0,042	0,212	0,233
<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + № 7-3488/3/1 (п/ф колбаски для жарки)	0,118	0,579	0,286
<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + № 3-3492/3/3 (пельмени)	0,031	0,316	0,061
<i>L. monocytogenes</i> 9156/2 + № 5557/1 (пресервы из сельди)	0,042	0,115	0,070
Контроль, <i>L. monocytogenes</i> 5642/6	0,223	0,000	0,000
Контроль, <i>L. monocytogenes</i> 9156/2	0,088	0,000	0,000
Контроль, стерильная среда	0,000	0,000	0,000

Заключение

Показано, что *L. monocytogenes* способны формировать биопленки в монокультуре при 37°C, однако, эта способность утрачивается ими при понижении температуры до комнатной или температуры холодильника. Тем не менее, сопутствующая пищевым продуктам микробиота способна стимулировать процесс совместного образования биопленки. Таким образом, отмечено влияние как абиотических, так и биотических факторов на биологию

возбудителя листериоза. Кроме того, в проведенной нами работе не было установлено четкой зависимости интенсивности образования биопленки листериями от источника выделения сапрофитных бактерий, что свидетельствует о необходимости уделять особое внимание изучению взаимодействия листерий и сапрофитных бактерий, контаминирующих пищевые продукты, при проведении эколого-эпидемиологических исследований.

Список литературы

1. Сомов Г.П., Бузолева Л.С. Адаптация патогенных бактерий к абиотическим факторам окружающей среды. – Владивосток: ОАО Примполиграфкомбинат, 2004. – 167 с.
2. Christensen G.D., Simpson W.A., Younger J.J, Baddour L.M, Barrett F.F, Melton D.M., Beachey E.H. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices // J. Clin Microbiol. – 1985. – Vol. 22. – P. 996–1006.
3. Kongo J.M., Malcata F.X., Ho A.J. Detection and characterization of *Listeria monocytogenes* in Sao Jorge (Portugal) cheese production // J. Dairy Sci. – 2006. – Vol. 89, № 11. – P. 4456–4461.
4. Leriche, V., Carpentier B. Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms. // J. Appl. Microbiol. – 2000. –Vol. 4. – P. 594–605.
5. Olsen S.J., Patrick M., Hunter S.B. Multistate outbreak of *Listeria monocytogenes* infection linked to delicatessen turkey meat // J. Clin. Infect. Dis. – 2005. – Vol. 40. – P. 962–967.
6. Wemekamp-Kamphuis H.H., Sleator R.D., Wouters J.A. Molecular and physiological analysis of the role of osmolyte growth of *Listeria monocytogenes* at low temperatures // J. Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70. – P. 2912–2918.
7. Zhao, T., Doyle M.P., Zhao P. Control of *Listeria monocytogenes* in a biofilm by competitive-exclusion microorganisms // J. Appl. Environ. Microbiol. – 2004. – Vol. 70. – P. 3996–4003.

Рецензенты:

Крылова Н.В., д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории фавиовирусных инфекций ФГБУ НИИЭМ им. Г.П. Сомова СО РАМН, г. Владивосток;

Пивненко Т.Н., д.б.н., профессор, главный научный сотрудник НИЦ «Морские биотехнологии» ФГБОУ ВПО «Дальрыбвтуз», г. Владивосток.