

УДК 576.8.097.29

ИЗУЧЕНИЕ ТОЛЕРАНТНОСТИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ К ХЛОРСОДЕРЖАЩИМ БИОЦИДНЫМ СРЕДСТВАМ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ХРОМОГЕННЫХ ИНДИКАТОРНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМ

**Н.Р. Ефимочкина, И.Б. Быкова, Ю.В. Короткевич,
Ю.М. Маркова, Л.П. Минаева, С.А. Шевелева**

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт питания»,
Россия, 109240, г. Москва, Устьинский проезд, 2/14

*Изучен видовой состав микроорганизмов – контаминантов растительного сырья и оборудования, используемого в производстве биотехнологических продуктов и напитков брожения; выделено и изучено 85 культур энтеробактерий, из них идентифицировано до вида 46 штаммов родов *Enterobacter*, *Pantoea*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Escherichia*, *Cronobacter*; наиболее часто обнаруживали представителей родов *Enterobacter* и *Pantoea* (около 50 %). Впервые разработана и апробирована хромогенная модель *in vitro* на основе индикаторной тест-системы, позволяющая проводить количественную оценку степени ингибирования грамотрицательной микрофлоры под воздействием антимикробных средств в зависимости от концентраций биоцидов и плотности бактериальных популяций. Сделан сравнительный анализ толерантности штаммов энтеробактерий, выделенных из различных биотопов; проведено тестирование чувствительности к обработке хлорсодержащими биоцидами 26 штаммов энтеробактерий из растительного сырья и 9 штаммов *Escherichia coli*, выделенных из кишечника крыс – самцов линии Вистар. Энтеробактерии из растительного сырья и смывов были более устойчивы к антимикробному действию хлора, нежели представители популяций нормальной кишечной микрофлоры животных. Установлено, что концентрации активного хлора 50–100 мг/дм³, наиболее часто используемые при обработке растительного сырья, неэффективны для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, если плотность микробной популяции составляет 10^{3–7} клеток/см³ и выше. При исходном уровне контаминации энтеробактериями не более 10³ клеток/см³ обработка растворами с концентрацией активного хлора 75–100 мг/дм³ может обеспечить эффективное обеззараживание сырья, оборудования или инвентаря. Экспериментальная хромогенная модель *in vitro*, предложенная для оценки воздействия хлорсодержащих средств на степень ингибирования энтеробактерий, может быть использована для обоснования и подбора концентраций рабочих растворов антимикробных средств, эффективных в отношении других групп микробных контаминантов, что позволит оптимизировать применение режимов дезинфекции сырья и санитарной обработки оборудования на предприятиях пищевой промышленности.*

Ключевые слова: энтеробактерии, хромогенная модель *in vitro*, растительное сырье, хлорсодержащие биоцидные средства, толерантность.

© Ефимочкина Н.Р., Быкова И.Б., Короткевич Ю.В., Маркова Ю.М., Минаева Л.П., Шевелева С.А., 2015

Ефимочкина Наталья Рамазановна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома (e-mail: karlikanova@ion.ru; тел. 8 (495) 698-53-83; 8 (915) 366-62-59).

Быкова Ирина Борисовна – научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома (e-mail: bykova@ion.ru; тел. 8 (495) 698-53-83).

Короткевич Юлия Владимировна – младший научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома (e-mail: ulya_korotkevich@mail.ru; тел. 8 (495) 698-53-83).

Маркова Юлия Михайловна – младший научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома (e-mail: yulia.markova.ion@gmail.com; тел. 8 (495) 698-53-83).

Минаева Людмила Павловна – кандидат технических наук, старший научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома (e-mail: Liuminaeva-ion@mail.ru; тел. 8 (495) 698-53-83).

Шевелева Светлана Анатольевна – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией биобезопасности и анализа нутримикробиома (e-mail: sheveleva@ion.ru; тел. 8 (495) 698-53-83).

Современные эволюционные теории формирования механизмов патогенности бактерий, обеспечивающих взаимодействие возбудителя со средой обитания в соответствующих экологических нишах и сообщающих устойчивость к неблагоприятным условиям существования, являются основой для разработки новых подходов к изучению поведения пищевых бактериальных патогенов под воздействием физико-химических, технологических и иных параметров производства и хранения пищевых продуктов.

Влияние неблагоприятных воздействий внешней среды на жизненно важные функции бактериальной клетки происходит на различных регуляторных уровнях, что может приводить к появлению индуцированной толерантности микроорганизмов к воздействию тех или иных бактерицидных факторов. В природных условиях, а также при санитарной обработке воды и оборудования толерантность бактерий может формироваться под влиянием различных антибактериальных агентов, в том числе хлора, кислот, щелочей, консервантов, антиоксидантов, бактериофагов, колицинов, акрилатов, ионов металлов [1, 6, 12].

В пищевой промышленности в качестве меры, снижающей обсемененность патогенными микроорганизмами, в настоящее время достаточно широко применяют хлорсодержащие средства [4, 10, 11, 13]. Свободный хлор и выделяющие его соединения (гипохлорит натрия, кальция, магния, хлорная известь, хлорамин, диоксид хлора, дихлоризоцианураты натрия и калия), обладая высокой антимикробной активностью против большинства болезнетворных микроорганизмов, широко используются для целей дезинфекции в медицине и ветеринарии, обеззараживания питьевой воды и очистки сточных вод, а также в производстве пищевых продуктов для обработки оборудования и снижения микробной контаминации используемого сырья.

Обработка хлорсодержащими биоцидами обеспечивает предупреждение перекрестного обсеменения продукции возбудителями пищевых инфекций и токсикоинфекций, позволяет продлить сроки годности продукции. Однако применение хлора связано с рядом негативных эффектов, одним из которых является образование тригалометанов, обладающих токсическим и канцерогенным действием: хлороформа, дихлорбромметана, дибромхлорметана и бромформа [5, 7–9]. В целом соблюдение установленных для них максимально допустимых уровней позволяет избегать прямого риска для

здоровья в виде токсических, аллергических и других реакций при употреблении пищевых продуктов и напитков с остатками таких веществ. Однако в настоящее время доказана потенциальная возможность появления как приобретенной пониженной чувствительности к биоцидам, так и устойчивости к лекарственным антимикробным средствам у микроорганизмов – контаминантов пищи и напитков [11]. С биоцидами сегодня связывают также такие негативные последствия, как ускорение эволюции бактериальных патогенов и появление новых инфекций, опасных для человека [1].

Распространение этих явлений свидетельствует о недооценке отдаленных рисков применения антимикробных средств в технологических целях. Безопасность традиционных концентраций биоцидов, используемых в пищевой промышленности, формирование толерантности к ним у различных видов контаминантов, изменение фенотипических признаков наиболее значимых групп микроорганизмов в настоящее время изучены недостаточно.

Для снижения риска негативных воздействий активного хлора важной задачей является обоснованный подбор эффективных концентраций рабочих растворов хлорсодержащих средств и оптимизация используемых режимов деконтаминации сырья и санитарной обработки оборудования на предприятиях пищевой промышленности.

В связи с изложенным проведены исследования по оценке чувствительности микроорганизмов – контаминантов биотехнологических пищевых производств к хлору и хлорсодержащим веществам на основе подбора оптимальных концентраций и технологических режимов хлорирования с целью подавления роста или уничтожения бактериальной микрофлоры семейства *Enterobacteriaceae*.

Для проведения исследований разработана экспериментальная хромогенная модель оценки *in vitro* степени ингибирования граммотрицательной микрофлоры под воздействием хлорсодержащих биоцидных средств, позволяющая количественно определять чувствительность энтеробактерий к антимикробной обработке в зависимости от концентраций хлора и плотности бактериальных популяций.

Материалы и методы. Оценку воздействия хлорсодержащих средств проводили, используя различные концентрации растворов активного хлора и суспензий тест-штаммов энтеробактерий. Эффективность антимикробного действия хлора

оценивали по наличию или отсутствию роста штаммов в глюкозопептонной среде (ГПС) после внесения хлора и 18-часового культивирования проб при температуре 37 °С. В качестве контроля применяли те же разведения тест-культуры без добавления хлора, а также пробы неинокулированной среды ГПС.

Для обеспечения возможности варьирования двух факторов – концентрации хлора и плотности бактериальной суспензии – использовали 96-луночные стерильные иммунологические планшеты; общий объем пробы в каждой лунке составлял 200 мкл.

Предварительно во все лунки планшета вносили по 180 мкл стерильной среды ГПС, далее в первый вертикальный ряд лунок с использованием 8-канального дозатора вносили по 20 мкл суточной суспензии тест-штамма (10^9 – 10^{11} клеток/см³), получая первое десятикратное разведение; аналогичным образом культуру разбавляли до 11-го десятикратного разведения. Двенадцатый вертикальный ряд использовали в качестве отрицательного контроля. В горизонтальные ряды лунок вносили равные количества раствора активного хлора до получения расчетных концентраций в среде от 200 до 10 мг/дм³. В последний ряд планшета (Н) раствор хлора не вносили.

Для визуальной оценки роста тест-штаммов в среду ГПС добавляли раствор индикатора бромтимолового синего (2 см³ 1,6%-ного спиртового раствора индикатора на 1 дм³ среды), о наличии роста судили по помутнению среды и изменению ее цвета от сине-зеленого до желтого. Оптическую плотность сред измеряли с использованием автоматического планшетного фотометра «Sunrise» с длиной волны 450 нм.

Количественно чувствительность штаммов энтеробактерий к действию хлора оценивали, определяя степень ингибирования роста тест-штаммов в зависимости от дозы активного хлора и исходной плотности популяции, которую выражали как разницу в титрах (количество лунок с признаками роста) в контрольных и опытных рядах планшета:

$$\Delta i = T_K - T_N,$$

где T_K – титр культуры без добавления хлора, T_N – титр культуры с соответствующей дозой хлора (N).

В качестве хлорсодержащего препарата использовали дезинфицирующее средство, содержащее натриевую соль дихлоризоциануровой кислоты. Рабочие растворы с различными

концентрациями активного хлора готовили непосредственно перед экспериментом.

Для разработки модели применяли тест-штаммы *Salmonella enteritidis* 874 из коллекции ФГБНУ «Научно-исследовательский институт питания», *S.typhimurium* NCTC 00074 и *Escherichia coli* 1330 серотипа O157: H7 из коллекции ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Объектами исследований в хромогенных моделях *in vitro* являлись штаммы бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, выделенные из растительного сырья (картофеля, зерновых культур, солода) и смывов с поверхностей оборудования пивоваренного производства. Видовую принадлежность выделенных штаммов энтеробактерий устанавливали при использовании биохимических тест-систем «API 20E», «Rapid 20E», «API 10S», («БиоМерье», Франция). Кроме того, в качестве модельных тест-объектов были использованы штаммы *E.coli*, выделенные из кишечника лабораторных животных (крыс-самцов линии Вистар). Видовую принадлежность выделенных штаммов устанавливали при использовании биохимических тест-систем «API 20E», «Rapid 20E», «API 10S» («БиоМерье», Франция). Всего в эксперименте было протестировано 87 культур энтеробактерий.

Результаты и их обсуждение. Схема двухфакторного модельного эксперимента с тестированием коллекционного штамма *E.coli* 1330 приведена в табл. 1. В данном случае *in vitro* было показано, что концентрации активного хлора 50 и 100 мг/дм³, наиболее часто используемые для обеззараживания питьевой воды и обработки растительного сырья, неэффективны для патогенных бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, если плотность микробной популяции составляет $(1-5) \cdot 10^7$ клеток/см³ и выше. При этом сальмонеллы выживали и при исходной концентрации 10^5 – 10^6 клеток/см³ (рис. 1).

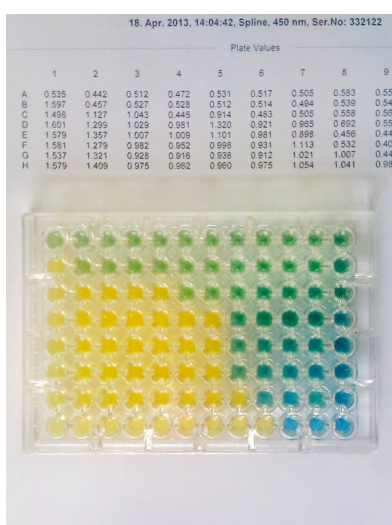
С использованием хромогенной модели была изучена чувствительность к хлору у тест-штаммов кишечных палочек, выделенных из нормальной микрофлоры кишечника лабораторных животных. Для исследований было отобрано 9 типичных штаммов *E.coli*, идентифицированных по комплексу культуральных и биохимических тестов с использованием наборов API 10S. Толерантность к воздействию хлора у культур *E.coli*, выделенных из микробиоты лабораторных животных (табл. 3), была сопоставима с чувствительностью коллекционного штамма *E.coli* серотипа O157: H7, тогда как степень ингибирования сальмонелл в тех же условиях была значительно ниже (табл. 2).

Таблица 1

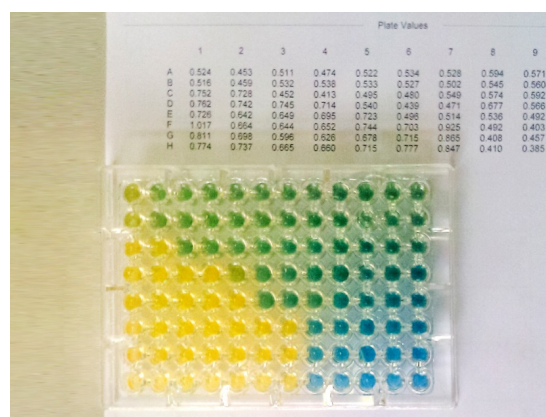
Оценка воздействия хлора на культуру *Escherichia coli* 1330

Дозы активного хлора, мг/дм ³	Оптическая плотность проб, 450 нм											
	1р	2р	3р	4р	5р	6р	7р	8р	9р	10р	11р	ОК
200	0,495	0,492	0,424	0,416	0,426	0,405	0,412	0,420	0,414	0,417	0,412	0,460
150	1,120	0,480	0,395	0,388	0,392	0,385	0,392	0,391	0,413	0,404	0,396	0,442
100	0,965	0,805	0,381	0,346	0,352	0,360	0,337	0,349	0,354	0,359	0,351	0,370
75	1,089	0,889	0,376	0,336	0,345	0,342	0,339	0,345	0,334	0,332	0,324	0,364
50	1,051	0,828	0,589	0,341	0,356	0,338	0,330	0,325	0,321	0,309	0,306	0,335
25	0,954	0,710	0,652	0,627	0,612	0,598	0,323	0,394	0,301	0,290	0,287	0,315
10	0,908	0,745	0,625	0,620	0,641	0,619	0,613	0,642	0,269	0,265	0,261	0,291
К	1,034	0,753	0,663	0,659	0,675	0,639	0,645	0,488	0,465	0,288	0,272	0,284

Примечание: цветом выделены лунки планшета / значения ОП, в которых регистрировали увеличение мутности и изменение цвета среды.



S. enteritidis



S. typhimurium

Рис. 1. Рост коллекционных тест-штаммов сальмонелл в экспериментальной хромогенной модели с использованием 96-луночного планшета

Таблица 2

Степень ингибирования тест-штаммов *E. coli* при различных концентрациях активного хлора

Номер штамма	Исходный титр культуры	Концентрация активного хлора в среде, мг/дм ³						
		200	150	100	75	50	25	10
6к	8	8	8	1	1	0	0	0
14к	9	9	8	2	2	2	1	1
16к	9	8	3	2	1	2	2	0
22к	8	7	8	3	1	0	0	0
23к	8	8	8	8	1	0	0	0
41к	9	8	6	1	0	1	1	1
49к	9	8	9	2	0	1	1	0
60к	11	10	10	4	4	3	3	0
62к	8	7	2	1	0	0	0	0
(M) ± std. ошибка среднего	8,78 ± 0,32	8,11 ± 0,31	6,89 ± 0,90	2,67 ± 0,75	1,11 ± 0,42	1,00 ± 0,37	0,89 ± 0,35	0,22 ± 0,15
Медиана	9,00	8,00	8,00	2,00	1,00	1,00	1,00	0,00

В данном эксперименте *in vitro* показано, что концентрации активного хлора 150–200 мг/дм³ обладают выраженным бактерицидным действием в отношении *E. coli*, приводя к практически полной инактивации живых клеток при их содержании до 10⁸ КОЕ/см³. При дозировке активного хлора в растворе 75–100 мг/дм³ происходит снижение числа живых клеток на 1,1–2,7 порядка, а внесение хлора в дозах менее 50 мг/дм³ было малоэффективным при любой плотности бактериальных суспензий.

Микробиологические исследования растительного сырья и санитарных условий пищевых биотехнологических производств включали оценку количественных уровней бактериальной контаминации, анализ видового состава, изучение фенотипических свойств выделенных штаммов и чувствительность их к антимикробным воздействиям.

При исследовании 13 образцов солода, зерна и смывов с оборудования предприятий по производству напитков брожения было выделено 32 культуры грамотрицательных аэробных и факультативно анаэробных бактерий, подвергнутых идентификации по расширенному перечню культуральных и биохимических тестов. Из общего числа выделенных штаммов 27 культур были идентифицированы; 26 штаммов принадлежали к различным родам в составе семейства *Enterobacteriaceae*, 1 культура – *Pseudomonadoceae*. В пробах были обнаружены бактерии родов *Enterobacter*, *Pantoea*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Escherichia*. Из общего числа выделенных штаммов видовая принадлежность была установлена для 17 культур, которые относились к видам *Enterobacter cloacae*, *E. amnigenus*, *E. aerogenes*, *Serratia fonticola*, *S. ficaria*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Анализ видового состава изолятов показал, что наибольшее число штаммов – 11 культур (42 %) – было представлено бактериями рода *Pantoea*. Микроорганизмы рода *Pantoea* обнаруживались в большинстве исследованных проб. Второй по частоте обнаружения группой микроорганизмов, выделенных из смывов и сырья, были бактерии рода *Enterobacter* (29,6 % всех штаммов). Сопоставление данных о частоте обнаружения колиформных лактозоположительных бактерий и других грамотрицательных микроорганизмов позволило выявить существенные различия в составе контаминантов сырья и смывов: колиформы значительно чаще обнаруживались в смывах, а энтеробактерии растительного происхождения – в солоде.

При изучении видового состава микрофлоры, контаминирующей крахмалсодержащее сырье для спиртового производства (пробы цельного и дробленого зерна пшеницы, ячменя, овса, клубни картофеля, полученные из нескольких регионов Российской Федерации, а также по импорту, всего 17 проб), было выделено 53 штамма грамотрицательных, ферментирующих глюкозу бактерий. По результатам идентификации принадлежность семейству *Enterobacteriaceae* подтверждена для 29 штаммов, в том числе были обнаружены условно-патогенные бактерии родов *Enterobacter*, *Pantoea*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Escherichia*. В двух случаях выделены патогенные микроорганизмы рода *Cronobacter*. Наиболее часто обнаруживали представителей родов *Enterobacter* (38,0 %) и *Pantoea* (27,6 %). Колиформные лактозоположительные бактерии (БГКП) фиксировали как в зерне, так и в картофеле, а энтеробактерии растительного происхождения *Pantoea spp.* были выделены только из зернового сырья.

Перечень штаммов энтеробактерий, отобранных для тестирования в экспериментальной хромогенной модели *in vitro*, приведен в табл. 3.

Результаты сравнительной оценки чувствительности к хлору 26 штаммов бактерий, выделенных из растительного сырья и смывов с производственного оборудования, приведены в табл. 4.

Анализ полученных данных показал, что все исследованные штаммы энтеробактерий в той или иной степени были чувствительны к использованному в эксперименте концентрациям активного хлора. Дозы 200 и 150 мг/дм³ полностью подавляли рост 7 из 26 исследованных штаммов (26,9 %). При концентрации активного хлора 75–100 мг/дм³ наблюдали значительное ингибирование роста штаммов с 10^{8–9} клеток/см³ до 10^{5–6} клеток/см³, то есть на 3,5–4,7 логарифмических порядка. При меньших концентрациях хлора ингибирования практически не происходило – плотность популяций снижалась лишь в 5–10 раз (менее 1,0 lg клеток/см³).

Сравнение чувствительности к хлору бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных из смывов и растительного сырья, и штаммов *E. coli* из кишечника крыс показало, что при концентрациях хлора 75–100 мг/дм³ бактерии, выделенные из растительного сырья, были менее чувствительны к антимикробному действию хлорсодержащих средств (рис. 2).

Таблица 3

Видовая принадлежность исследованных штаммов энтеробактерий

Номер штамма	Видовая принадлежность	Источник выделения
<i>Лактозоположительные энтеробактерии (БГКП)</i>		
5/6	<i>Escherichia coli</i>	Солод ржаной неферментированный
1	<i>Citrobacter freundii</i>	Пшеница
6/4	<i>Citrobacter freundii</i>	Смыв (разливочный аппарат)
24	<i>Citrobacter freundii</i>	Пшеница
50	<i>Citrobacter braakii</i>	Картофель
1/3	<i>Klebsiella pneumonia</i>	Солод ячменный
14	<i>Enterobacter spp</i>	Пшеница
7/4	<i>Enterobacter cloacae</i>	Смыв с дозатора (укупорка)
7/6	<i>Enterobacter cloacae</i>	Смыв с дозатора (укупорка)
16	<i>Enterobacter cloacae</i>	Овес
22	<i>Enterobacter cloacae</i>	Пшеница
41	<i>Enterobacter cloacae</i>	Картофель
48	<i>Enterobacter cloacae</i>	Картофель
52	<i>Enterobacter cloacae</i>	картофель
47	<i>Cronobacter spp (E. sakazakii)</i>	Картофель
51	<i>Cronobacter spp (E. sakazakii)</i>	Картофель
<i>Лактозонегативные энтеробактерии</i>		
2/1	<i>Pantoea spp.</i>	Рожь
2/3	<i>Pantoea spp.</i>	Рожь
3/1	<i>Pantoea spp.</i>	Солод пшеничный
20	<i>Pantoea spp.</i>	Ячмень
30	<i>Pantoea spp.</i>	Пшеница
33	<i>Pantoea spp.</i>	Пшеница
38	<i>Serratia ficaria</i>	Картофель
45	<i>Serratia marcescens</i>	Картофель
35	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Пшеница
<i>Другие виды лактозонегативных бактерий</i>		
6/6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Смыв (разливочный аппарат)

Таблица 4

Степень ингибирования штаммов, выделенных из растительного сырья и смывов (ΔI)

Номер штамма	Исходный титр культуры	Концентрация активного хлора в среде, мг/дм ³						
		200	150	100	75	50	25	10
<i>Лактозоположительные энтеробактерии (БГКП)</i>								
5/6	9	9	9	6	2	2	0	0
1	9	9	9	8	8	3	2	1
6/4	9	8	8	6	1	1	0	0
24	9	9	9	8	9	1	2	0
50	8	7	7	2	1	1	0	0
1/3	8	7	7	6	6	0	0	0
14	9	9	8	7	7	1	0	0
7/4	9	8	7	5	3	1	1	0
7/6	9	7	7	6	5	1	0	0
16	11	10	11	9	10	3	2	2
22	10	10	10	8	7	3	0	2
41	9	8	6	0	0	0	1	0
48	9	7	0	1	1	1	0	1
52	10	9	8	2	2	0	2	2
47	8	6	6	1	1	0	1	0
51	8	7	7	1	1	0	0	0
2/1	9	7	7	6	5	1	0	0
(M) ± стд. ошибка среднего	9,00 ± 0,19	8,06 ± 0,29	7,41 ± 0,57	4,82 ± 0,72	4,06 ± 0,79	1,12 ± 0,26	0,65 ± 0,21	0,47 ± 0,19
Медиана	9,0	8,0	7,0	6,0	3,0	1,0	0,0	0,0
<i>Лактозонегативные энтеробактерии и Pseudomonas spp.</i>								
2/3	9	8	8	7	7	3	1	1
3/1	8	7	7	5	3	2	0	0

Окончание табл. 4

Номер штамма	Исходный титр культуры	Концентрация активного хлора в среде, мг/дм ³						
		200	150	100	75	50	25	10
20	9	9	9	9	6	2	1	0
30	8	8	8	2	2	1	1	1
33	8	7	8	1	1	1	0	0
38	8	7	3	0	0	0	0	0
45	8	7	6	0	0	0	0	0
35	7	7	4	2	1	1	1	0
6/6	8	3	2	0	0	0	0	0
(M) ± стд. ошибка среднего	8,11±0,20	7,00 ± 0,55	6,11 ± 0,84	2,89 ± 1,11	2,22 ± 0,88	1,11 ± 0,35	0,44 ± 0,18	0,22 ± 0,15
Медиана	8,0	7,0	7,0	2,0	1,0	1,0	0,0	0,0
(M) * ± стд. ошибка среднего	8,69±0,22	7,80 ± 0,22	6,94 ± 0,42	3,77 ± 0,51	2,83 ± 0,50	1,09 ± 0,18	0,66 ± 0,14	0,34 ± 0,11
Медиана	9,0	8,00	8,00	2,00	1,00	1,00	0,00	0,00

Примечание: * – средние значения для всех протестированных штаммов.

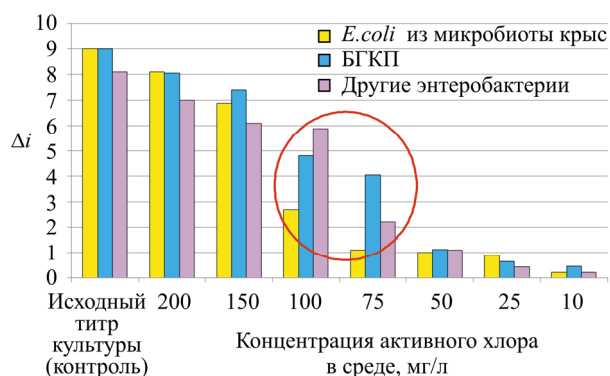
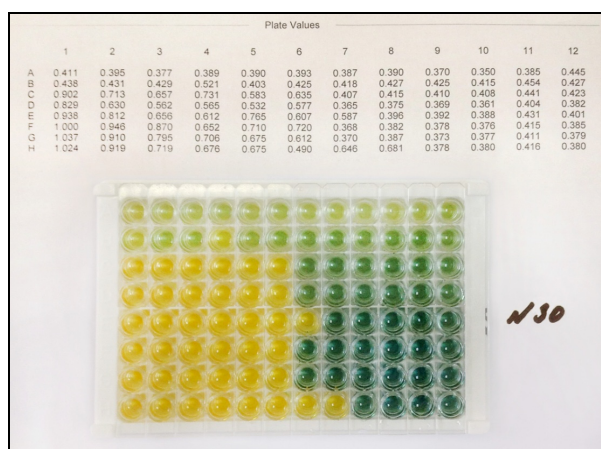


Рис. 2. Степень толерантности к хлору у *E. coli* и энтеробактерий, выделенных из смывов и растительного сырья

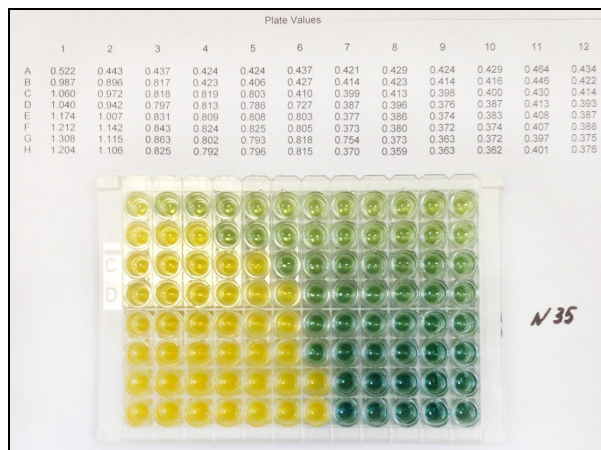
Наиболее выраженной толерантностью к хлору обладали энтеробактерии рода *Pantoea*, которые обычно персистируют в биотопах растительных и почвенных экосистем, являясь одним из самых распространенных представителей семейства *Enterobacteriaceae* [2]. Так, выделенные из зерна пшеницы штаммы *Pantoea spp.* № 30 и № 35 были устойчивы к воздействию 100–150 мг/дм³ активного хлора, степень ингибирования при этих условиях была на 3 логарифмических порядка ниже по сравнению с другими выделенными штаммами (см. табл. 4, рис. 3).

Чувствительность к хлору колиформных бактерий (БГКП) из растительного сырья в сравнении с другими представителями семейства *Enterobacteriaceae* в некоторых случаях была более выражена, однако достоверной разницы при небольшом объеме выборки выявить не удалось.

Существующая практика обеззараживания питьевой воды предполагает подбор дозировок активного хлора таким образом, чтобы по мик-



а



б

Рис. 3. Рост *Pantoea spp.* в хромогенной модели при различных концентрациях активного хлора: а – штамм № 30; б – штамм № 35

робиологическим показателем она соответствовала требованиям СанПиН 2.1.4.1074-01 [3], а содержание остаточного хлора при этом не

превышало 0,3–0,5 мг/дм³. Наиболее часто для этих целей используются концентрации активного хлора от 50 до 100 мг/дм³ при различной продолжительности обработки (экспозиции).

В осуществленном эксперименте при концентрации активного хлора 100 мг/дм³ в модельной среде достигалось снижение плотности бактериальных популяций в среднем на 5 логарифмических порядков, а при 75 мг/дм³ – на 3–4 порядка. Исключение составили данные относительно штамма *Ps. aeruginosa* б/б, выделенного из смыва с оборудования: ингибирование культуры достигалось только при содержании активного хлора 150–200 мг/дм³, штамм был практически нечувствителен к более низким концентрациям.

Выводы:

1. Изучен видовой состав микробных контаминантов растительного сырья и оборудования, используемого в производстве биотехнологических продуктов и напитков брожения; выделено и изучено по комплексу культурально-биохимических показателей 85 культур энтеробактерий, из них идентифицировано до вида 46 штаммов родов *Enterobacter*, *Pantoea*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Escherichia*, *Cronobacter*; наиболее часто обнаруживали представителей родов *Enterobacter* и *Pantoea* (около 50 %).

2. Впервые разработана и апробирована в экспериментальных условиях хромогенная модель *in vitro* на основе индикаторной тест-системы, позволяющая проводить количественную оценку степени ингибирования грамотрицательной микрофлоры под воздействием антимикробных средств в зависимости от концентраций биоцидов и плотности бактериальных популяций.

3. С использованием разработанной модели сделан сравнительный анализ толерантности штаммов энтеробактерий, выделенных из различных биотопов; проведено тестирование чувствительности к обработке хлорсодержащими биоцидными средствами 26 штаммов – контаминантов растительного сырья и 9 штаммов *E. coli*, выделенных из кишечника лабораторных животных. Энтеробактерии из растительного сырья и смывов были более устойчивы к антимикробному действию хлора, нежели представители популяций нормальной кишечной микробиоты.

4. Показано, что концентрации активного хлора 50–100 мг/дм³, наиболее часто используемые при обработке растительного сырья, неэффективны для бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, если плотность микробной популяции составляет 10^{5–7} клеток/см³ и выше. При исходном уровне контаминации энтеробактериями не более 10³ клеток/см³ обработка растворами с концентрацией активного хлора 75–100 мг/дм³ может обеспечить эффективное обеззараживание сырья, оборудования или инвентаря.

5. Экспериментальная хромогенная модель *in vitro*, предложенная для оценки воздействия хлорсодержащих средств на степень ингибирования энтеробактерий, может быть использована для обоснования и подбора концентраций рабочих растворов антимикробных средств, эффективных в отношении других групп микробных контаминантов, что позволит оптимизировать применение режимов дезинфекции сырья и санитарной обработки оборудования на предприятиях пищевой промышленности.

Список литературы

1. Ефимочкина Н.Р. Микробиология пищевых продуктов и современные методы детекции патогенов. – М.: Изд-во РАМН, 2013. – 517 с.
2. Изучение особенностей микробной контаминации свежих овощей и листовых салатов промышленного изготовления / Н.Р. Ефимочкина, И.Б. Быкова, С.Ю. Батищева, Л.П. Минаева, Ю.М. Маркова, Ю.В. Короткевич, Г.Ю. Шилов, С.А. Шевелева // Вопросы питания. – 2014. – № 5. – С. 33–42.
3. СанПиН 2.1.4.1074-01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению безопасности систем горячего водоснабжения. Санитарно-эпидемиологические правила и нормативы. – М.: Роспотребнадзор, 2001. – 112 с.
4. Application of Acidified Sodium Chlorite in the Drinking Water to Control Salmonella serotype Typhimurium and Campylobacter jejuni in Commercial Broilers / P. Mohyla, S.F. Bilgili, O.A. Oyarzabal [et al.] // J. Appl. Poult Res. – 2007. – Vol. 16, № 1. – P. 45–51. doi: 10.1093/japr/16.1.45
5. Biodisposition of dibromoacetic acid (DBA) and bromodichloromethane (BDCM) administered to rats and rabbits in drinking water during range-finding reproduction and developmental toxicity studies / M.S. Christian, R.G. York, A.M. Hoberman [et al.] // International Journal of Toxicology. – 2001. – Vol. 20. – P. 239–253.

6. Hicks S.J., Rowbury R.J. Resistance of attached *Escherichia coli* to acrylic acid and its significance for the survival of plasmid-bearing organisms in water // *Ann. Inst. Pasteur.* – 1987. – Vol. 138. – P. 359–369.
7. International Life Sciences Institute. An Evaluation of EPA's Proposed Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Using Chloroform and Dichloroacetate as Case Studies. Report of an Expert Panel, ILSI HESI, Washington, DC, November, 1997. – 240 c.
8. Oral (drinking water) developmental toxicity studies of bromodichloromethane (BDCM) in rats and rabbits / M.S. Christian, R.G. York, A.M. Hoberman [et al.] // *International Journal of Toxicology.* – 2001. – Vol. 20. – P. 225–237.
9. Oral (drinking water) two-generation reproductive toxicity study of bromodichloromethane (BDCM) in rats / M.S. Christian, R.G. York, A.M. Hoberman [et al.] // *International Journal of Toxicology.* – 2002. – Vol. 21. – P. 115–146.
10. Oyarzabal O.A. Reduction of *Campylobacter* spp. by commercial antimicrobials applied during the processing of broiler chickens: a review from the United States perspective // *J. Food Prot.* – 2005. – Vol. 68. – P. 1752–1760.
11. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from DG SANCO on the assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance // *The EFSA Journal.* – 2008. – Vol. 659. – P. 1–26.
12. Whiting G.C., Rowbury R.J. Increased resistance of *Escherichia coli* to acrylic acid and to copper ions after cold-shock // *Letts. Appl. Microbiol.* – 1995. – Vol. 20. – P. 240–242.
13. Yang H., Li Y. Johnson M.G. Survival and death of *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* in processing water and on chicken skin during poultry scalding and chilling // *J. Food Prot.* – 2001. – Vol. 64. – P. 770–776.

References

1. Efimochkina N.R. Mikrobiologija pishhevyyh produktov i sovremennyye metody detekcii patogenov [Food microbiology and modern methods of detection of foodborne pathogens]. Moscow: Publishing house of the Russian Academy of Medical Sciences, 2013. 517 p.
2. Efimochkina N.R., Bykova I.B., Batisheva S.Yu., Minaeva L.P., Markova Yu.M., Korotkevich Yu.V., Shilov G.Yu., Sheveleva S.A. Izuchenie osobennostey mikrobnoy kontaminatsii svezhih ovoshhej i listovyh salatov promyshlennogo izgotovleniya [Study of microbial contamination of processed fresh vegetables and lettuce]. *Voprosy pitanya*, 2014, no. 5, pp. 33–42 (In Russian).
3. SanPiN 2.1.4.1074-01. «Pit'evaya voda. Gigienicheskie trebovaniya k kachestvu vody centralizovannykh sistem pit'evogo vodosnabzheniya. Kontrol' kachestva. Gigienicheskie trebovaniya k obespecheniju bezopasnosti sistem gorjachego vodosnabzheniya. Sanitarno-jepidemiologicheskie pravila i normativy» [SanPin 2.1.4.1074-01 «Drinking water. Hygienic requirements to water quality of centralized drinking water supply systems. Quality control. Hygienic requirements for safety of hot water systems. Sanitary-epidemiological rules and regulations»]. Moscow: Rospotrebnadzor, 2001. 112 p. (In Russian).
4. Mohyla P., Bilgili S. F., Oyarzabal O. A. et al. Application of Acidified Sodium Chlorite in the Drinking Water to Control *Salmonella* serotype Typhimurium and *Campylobacter jejuni* in Commercial Broilers. *J. Appl. Poult Res.*, 2007, vol. 16, no. 1, pp. 45–51. doi: 10.1093/japr/16.1.45.
5. Christian M.S., York R.G., Hoberman, A.M. et al. Biodisposition of dibromoacetic acid (DBA) and bromodichloromethane (BDCM) administered to rats and rabbits in drinking water during range-finding reproduction and developmental toxicity studies. *International Journal of Toxicology*, 2001, vol. 20, pp. 239–253.
6. Hicks S.J., Rowbury R.J. Resistance of attached *Escherichia coli* to acrylic acid and its significance for the survival of plasmid-bearing organisms in water. *Ann. Inst. Pasteur*, 1987, vol. 138, pp. 359–369.
7. International Life Sciences Institute. An Evaluation of EPA's Proposed Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Using Chloroform and Dichloroacetate as Case Studies. Report of an Expert Panel, ILSI HESI, Washington, DC, November 1997. 240 p.
8. Christian M.S., York R.G., Hoberman A.M. et al. Oral (drinking water) developmental toxicity studies of bromodichloromethane (BDCM) in rats and rabbits. *International Journal of Toxicology*, 2001, vol. 20, pp. 225–237.
9. Christian M.S., York R.G., Hoberman A.M. et al. Oral (drinking water) two-generation reproductive toxicity study of bromodichloromethane (BDCM) in rats. *International Journal of Toxicology*, 2002, vol. 21, pp. 115–146.
10. Oyarzabal O.A. Reduction of *Campylobacter* spp. by commercial antimicrobials applied during the processing of broiler chickens: a review from the United States perspective. *J. Food Prot.*, 2005, vol. 68, pp. 1752–1760.
11. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from DG SANCO on the assessment of the possible effect of the four antimicrobial treatment substances on the emergence of antimicrobial resistance. *The EFSA Journal*, 2008, vol. 659, pp. 1–26.
12. Whiting G.C., Rowbury R.J. Increased resistance of *Escherichia coli* to acrylic acid and to copper ions after cold-shock. *Letts. Appl. Microbiol.*, 1995, vol. 20, pp. 240–242.
13. Yang, H., Li, Y. Johnson, M.G. Survival and death of *Salmonella typhimurium* and *Campylobacter jejuni* in processing water and on chicken skin during poultry scalding and chilling. *J. Food Prot.*, 2001, vol. 64, pp. 770–776.

STUDY OF TOLERANCE OF ENTEROBACTERIA TO CHLORINE-BASED BIOCIDES IN EXPERIMENTAL MODELS USING CHROMOGENIC INDICATOR TESTS

**N.R. Efimochkina, I.B. Bykova, Yu.V. Korotkevich, Yu.M. Markova,
L.P. Minaeva, S.A. Sheveleva**

FSBI "Institute of Nutrition", Russian Federation, Moscow, 2/14 Ustinsky Passage, 109240

The species-specific composition of microbial contaminants of vegetable raw materials and equipment used in the production of biotechnological products and beverages fermentation are studied. 85 enterobacteria strains was isolated and investigated, 46 strains of the genera Enterobacter, Pantoea, Citrobacter, Serratia, Escherichia, Cronobacter was identified to the species level; the most frequently detected bacteria of the genera Enterobacter and Pantoea (about 50 %). For the first time developed and tested chromogenic in vitro model based that allows to quantify the degree of inhibition of gram-negative microflora under the influence of antimicrobial agents depending on the concentrations of biocides and density of bacterial populations. A comparative analysis of the tolerance of Enterobacteriaceae strains from different biotopes was conducted. Sensitivity to the treatment of chlorine-containing biocides in 26 strains of enterobacteria from plant material and 9 strains of Escherichia coli from the intestine of male rats of Wistar line was tested. Enterobacteria from vegetable raw materials and swabs were more resistant to antimicrobial action of chlorine, than the representatives of the populations of the normal intestinal microbiota. It is established that the active chlorine concentration of 50–100 mg/dm³, the most commonly used in the processing of vegetable raw materials, is not effective for Enterobacteriaceae, if the density of the microbial population is 10⁵⁻⁷ cells/cm³ and above. At an initial level of contamination with Enterobacteriaceae not more than 10³ cells/cm³ processing solutions with a concentration of active chlorine of 75 to 100 mg/dm³ can provide effective disinfection of raw materials, equipment, or inventory. Experimental chromogenic in vitro model proposed to assess the impact of chlorine-based biocides on the degree of the enterobacteria inhibition, can be used to justify the selection and doses of antimicrobial agents, effective against other groups of microbial contaminants. This will optimize the use of modes of decontamination of raw materials and sanitizing equipment in the food industry.

Key words: enterobacteria, chromogenic model in vitro, vegetable raw materials, chlorine-based biocides, tolerance.

© Efimochkina N.R., Bykova I.B., Korotkevich Yu.V., Markova Yu.M., Minaeva L.P., Sheveleva S.A., 2015

Efimochkina Natalia Ramazanovna – Doctor of biological sciences, leading research worker of the Laboratory of biosafety and nutrimicrobiom analysis (e-mail: karlikanova@ion.ru; tel. 8 (495) 698-53-83; 8 (915) 366-62-59).

Bykova Irina Borisovna – research worker of the Laboratory of biosafety and nutrimicrobiom analysis (e-mail: bykova@ion.ru; tel. 8 (495) 698-53-83).

Korotkevich Yulia Vladimirovna – junior research worker of the Laboratory of biosafety and nutrimicrobiom analysis (e-mail: ulya_korotkevich@mail.ru; tel. 8 (495) 698-53-83).

Markova Yulia Mikhailovna – junior research worker of the Laboratory of biosafety and nutrimicrobiom analysis (e-mail: yulia.markova.ion@gmail.com; tel. 8 (495) 698-53-83).

Minaeva Liudmila Pavlovna – Candidate of technical sciences, leading research worker of the Laboratory of biosafety and nutrimicrobiom analysis (e-mail: Liuminaeva-ion@mail.ru; tel. 8 (495) 698-53-83).

Sheveleva Svetlana Anatolievna – Doctor of biological sciences, head of the Laboratory of biosafety and nutrimicrobiom analysis (e-mail: sheveleva@ion.ru; tel. 8 (495) 698-53-83).