

УДК 576.8.097.29

DOI: 10.21668/health.risk/2019.4.15

Читать
онлайн

ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ *CAMPYLOBACTER JEJUNI* К АНТИМИКРОБНЫМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ ДЛЯ СНИЖЕНИЯ РИСКА КОНТАМИНАЦИИ ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА

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

Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, 109240, Россия,
г. Москва, Устьянский проезд, 2/14

Для оценки эффективности влияния на патогенную микрофлору различных антимикробных воздействий проведено сравнительное изучение чувствительности тест-штаммов *Campylobacter jejuni* к УФ-излучению и биоцидам на основе надуксусной кислоты (НУК). Биоциды на основе НУК подавляли значительное число кампилобактеров, однако заданные режимы обработки не обеспечивали полной инактивации тест-штаммов. Эффективность воздействия УФ-облучения на штаммы *C. jejuni* находилась в зависимости от продолжительности экспозиции: после 20 мин обработки планшетов с бульонными бактериальными суспензиями число жизнеспособных клеток снижалось на 1,5–2,0 логарифмических порядка, через 60 мин содержание *C. jejuni* снижалось и составляло менее 200 КОЕ/см³.

Антибиотические вещества полипептидной природы, продуцируемые молочнокислыми бактериями (бактериоцины, низин и др.), обладают комплексом полезных признаков, чем обусловлена возможность их использования для подавления вредной микрофлоры в производстве пищевых продуктов. Используя модель «ассоциативного роста», проведено изучение особенностей размножения *C. jejuni* в молоке, которое инокулировали одновременно с этим патогеном мезофильными молочнокислыми лактококками или термофильными лактобактериями – продуцентами бактериоцинов. В зависимости от количества внесенных молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis* и *Lactococcus lactis* размножение *C. jejuni* заметно ингибировалось. Установлена зависимость антибактериальной активности и характера ингибирующего действия от концентрации вышеуказанных видов молочнокислых микроорганизмов, температуры и продолжительности культивирования смешанных культур, свойств используемых штаммов, которые в наибольшей степени проявлялись при внесении лактобактерий в дозе 10⁸ КОЕ/см³.

Изучение способности *C. jejuni* выживать при неблагоприятных воздействиях внешней среды показало вариабельность физиологических свойств микробных популяций, высокую степень резистентности бактерий рода *Campylobacter* и связанные с ними трудности адекватного подбора эффективных средств и способов антимикробной обработки.

Ключевые слова: *Campylobacter jejuni*, модель *in vitro*, биоциды, антимикробные воздействия, УФ-облучение, контаминация, биопленки, молочнокислые бактерии.

© Ефимочкина Н.Р., Стеценко В.В., Маркова Ю.М., Минаева Л.П., Быкова И.Б., Пичугина Т.В., Шевелева С.А., 2019
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; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9071-0326>).

Стеценко Валентина Валерьевна – младший научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома (e-mail: stetsenko_valentina1992@mail.ru; тел.: 8 (495) 698-53-83; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6470-171X>).

Маркова Юлия Михайловна – научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома (e-mail: yulia.markova.ion@gmail.com; тел.: 8 (495) 698-53-83; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2631-6412>).

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; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1853-5735>).

Быкова Ирина Борисовна – научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома (e-mail: bikova@ion.ru; тел.: 8 (495) 698-53-83; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7288-312X>).

Пичугина Татьяна Викторовна – кандидат технических наук, научный сотрудник лаборатории биобезопасности и анализа нутримикробиома (e-mail: bbtvp@ion.ru; тел.: 8 (495) 698-53-83; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4632-7119>).

Шевелева Светлана Анатольевна – доктор медицинских наук, заведующий лабораторией биобезопасности и анализа нутримикробиома (e-mail: sheveleva@ion.ru; тел.: 8 (495) 698-53-83; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5647-9709>).

Высокая эпидемиологическая значимость бактерий рода *Campylobacter* обуславливает необходимость установления возможности выживания этих микроорганизмов в условиях современного производства пищевых продуктов под влиянием различных техногенных или биологических факторов. Изучение механизмов формирования стрессовой толерантности бактерий рода *Campylobacter* позволит интенсифицировать применение методологии оценки микробиологического риска и осуществлять эффективный мониторинг загрязненности пищевых продуктов возбудителями кампилобактериоза.

Бактерии рода *Campylobacter* широко распространены во внешней среде и обнаруживаются на поверхностях оборудования и инвентаря предприятий пищевой промышленности [1]. Поскольку частота контаминации живыми кампилобактериями объектов производственной среды высока, возникает потенциальная опасность появления дополнительных источников их инфицирования за счет некультивируемых форм и биопленок. Формирование последних усиливается под воздействием технологических стрессовых факторов, таких как сублетальные дозы антибиотиков, кислот, дезинфектантов, биоцидов и др. [2–4]. Этот процесс рассматривается как один из механизмов адаптации микроорганизмов в природных и искусственных экосистемах [5–7]. Облучение, широко используемое с целью бактерицидной обработки объектов производственной среды и упаковочных материалов, также может вызывать у бактерий стрессовый ответ, который индуцирует не только толерантность к этому воздействию, но и формирует устойчивость к другим видам обработки сырья и готовых продуктов [8, 9].

Влияние неблагоприятных воздействий внешней среды на жизненно важные функции бактериальной клетки происходит на различных регуляторных уровнях, что может сопровождаться появлением 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 [10–12].

В качестве меры, снижающей обсемененность патогенными микроорганизмами в пищевой промышленности, в настоящее время достаточно широко применяют обработку хлорсодержащими средствами [8, 9, 13, 14]. Свободный хлор и выделяющие его соединения (гипохлорит натрия, кальция, магния, хлорная известь, хлорамин, диоксид хлора, дихлоризоцианураты натрия и калия) широко используются для целей дезинфекции в медицине и ветеринарии, обеззараживания питьевой воды и очистки сточных вод, а также в производстве пищевых про-

дуктов для обработки оборудования и даже для снижения микробной контаминации поверхности используемого сырья, поскольку обладают высокой антимикробной активностью против большинства болезнетворных микроорганизмов [15].

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 [6, 13]. В целом соблюдение установленных максимально допустимых уровней остатков таких соединений позволяет избежать 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 корезистентности к лекарственным антимикробным средствам у микроорганизмов – контаминантов пищи и напитков [10, 16]. С биоцидами сегодня связывают также такие негативные последствия, как ускорение эволюции бактериальных патогенов и появление новых инфекций, опасных для человека [11, 12].

Распространение этих явлений свидетельствует о недооценке отдаленных рисков применения антимикробных средств в технологических целях. Безопасность традиционных концентраций биоцидов, используемых в пищевой индустрии, 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 важной задачей является обоснованный подбор эффективных и безопасных средств деконтаминации сырья и санитарной обработки оборудования на предприятиях пищевой промышленности.

Материалы и методы. Оценка эффективности подавления патогенной микрофлоры различными антимикробными препаратами проводили путем сравнительного анализа чувствительности тест-штаммов кампилобактеров и сальмонелл (бактерий-индикаторов пищевых патогенов) к воздействию биоцидов на основе гипохлорита, технологических вспомогательных средств «ФудКлинПерокси» и «Криодез» на основе надуксусной кислоты (НУК). Чувствительность бактерий *S. jejuni* к неблагоприятным воздействиям определяли с использованием разработанной ранее лабораторной модели *in vitro* [17], проводя параллельное культивирование нескольких субпопуляций тестируемых штаммов при варьировании параметров газовой среды и режимов инкуба-

ции. Определение соотношения числа жизнеспособных колониеобразующих единиц (КОЕ) и общего количества клеток в популяции рассчитывали по содержанию геномной ДНК в пробах методом количественной ПЦР-РВ [18].

Эффективность антимикробного действия растворов активного хлора в отношении сальмонелл оценивали по наличию или отсутствию роста тест-штаммов в глюкозопептонной среде с индикатором бромтимоловым синим (ГПС) после внесения биоцида и 18-часового культивирования проб при температуре 37 °С. Для обеспечения возможности варьирования двух факторов – концентрации биоцида и плотности бактериальной суспензии – использовали 96-луночные стерильные иммунологические планшеты [19]. О наличии роста судили по помутнению среды и изменению ее цвета от сине-зеленого до желтого. Оптическую плотность сред измеряли с использованием автоматического планшетного спектрофотометра Sunrise.

Способность штаммов *C. jejuni* к образованию биопленок определяли с использованием разработанной ранее лабораторной модели *in vitro* [20]. Штаммы выращивали на полистироловых 96- и 24-луночных планшетах, используя в качестве сред культивирования бульон Мюллера – Хинтона с внесением 5 % дефибрированной крови, а также ростовых добавок фирм Merck и HiMedia, содержащих пируват натрия, метабисульфит натрия и сульфат железа. Интенсивность пленкообразования определяли хромогенным методом с использованием планшетного спектрофотометра.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью критерия Стьюдента и непараметрического рангового критерия Манна – Уитни. Различия признавали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для расчетов применяли программы EXCEL и SPSS 18.0.

Результаты и их обсуждение. Ингибирующее действие дезсредств оценивали по интенсивности роста тест-штаммов в зависимости от концентрации биоцида и плотности бактериальных популяций (табл. 1).

Оценка воздействия активного хлора на сальмонеллы в условиях хромогенной модели *in vitro* приведена на рис. 1.

В сравнении с «ФудКлин Перокси» воздействие средства «Криодез» в отношении кампилобактерий было слабее и приводило к снижению количества тест-штаммов только на 1–2 логарифмических порядка (с $1,0 \cdot 10^9$ до $1,0 \cdot 10^{7-8}$ КОЕ/см³). Результаты проведенных сравнительных исследований по оценке антимикробного действия биоцидов на основе НУК свидетельствуют о необходимости оптимизации режимов контактного охлаждения сырья на птицеперерабатывающих предприятиях и подбора концентраций рабочих растворов дезсредств.

После обработки хлором у штаммов *S. enteritidis* и *S. typhimurium* регистрировали отсутствие пленкообразования, в то время как у *C. jejuni* наблюдали тенденцию усиления способности к образованию пленок (рис. 2).

Таблица 1

Воздействие биоцидов на *C. jejuni* и *Salmonella spp.*

Тест-штаммы	Разведение исходных суспензий тест-культур*									
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
<i>Контроль (без биоцидов)</i>										
<i>Salmonella enteritidis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>C. jejuni</i> 13п	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–
<i>C. jejuni</i> 5п	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–
<i>Гипохлорит (концентрация активного хлора 50 мг/дм³, экспозиция 25 мин при температуре +2 °С)</i>										
<i>Salmonella enteritidis</i>	+	+	+	+	+	–	–	–	–	–
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>C. jejuni</i> 13п	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>C. jejuni</i> 5п	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>«Фуд Клин Перокси» (0,04%-ный раствор, экспозиция 25 мин при температуре +2 °С)</i>										
<i>Salmonella enteritidis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Salmonella typhimurium</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>C. jejuni</i> 13п	+	+	+	+	–	–	–	–	–	–
<i>C. jejuni</i> 5п	+	+	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>«Криодез» (0,04%-ный раствор, экспозиция 25 мин при температуре +2 °С)</i>										
<i>Salmonella enteritidis</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Salmonella typhimurium</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>C. jejuni</i> 13п	+	+	+	+	+	+	+	–	–	–
<i>C. jejuni</i> 5п	+	+	+	+	+	+	–	–	–	–

Примечание: +/- – отсутствие или наличие роста в соответствующих разведениях суспензий тест-штаммов после воздействия биоцида; * – содержание бактерий в исходной бульонной культуре не менее $1 \cdot 10^9$ КОЕ/см³.

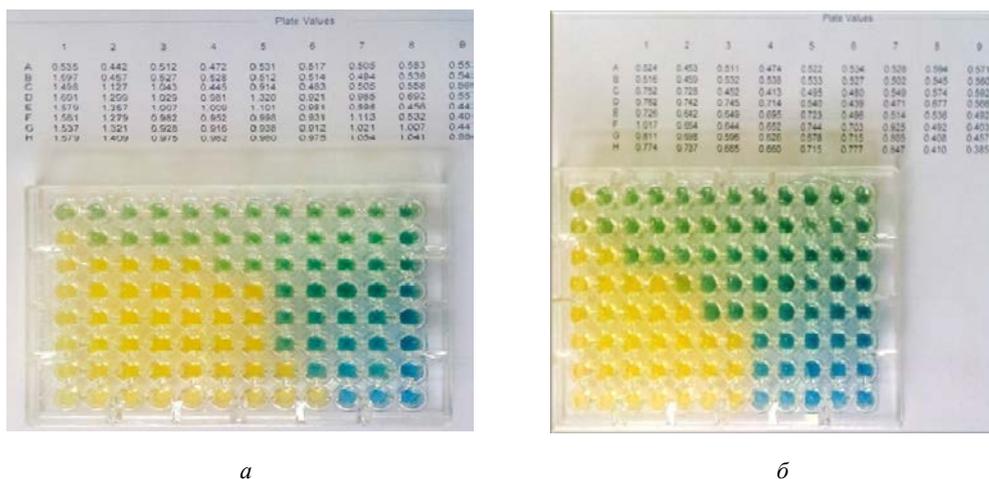


Рис. 1. Рост коллекционных тест-штаммов сальмонелл в присутствии активного хлора в диапазоне концентраций 10–200 мг/дм³ в экспериментальной хромогенной модели: а – *S. enteritidis*; б – *S. typhimurium*

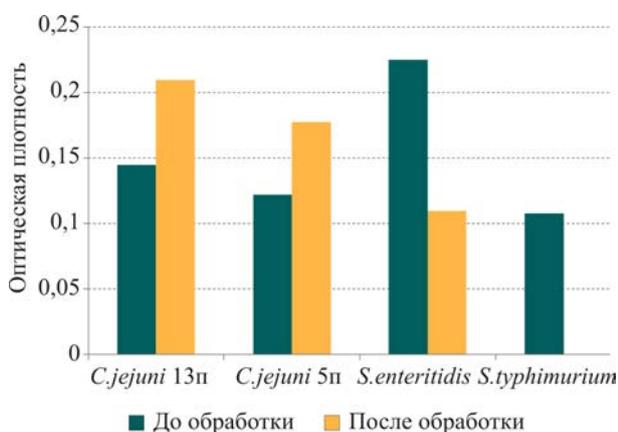


Рис. 2. Способность штаммов кампилобактерий и сальмонелл к формированию биопленок

Поскольку применение хлорсодержащих средств не обеспечивало в достаточной степени эффективной обработки зараженных кампилобактериями субстратов, были испытаны другие виды антимикробных воздействий. С этой целью проведено изучение чувствительности тест-штаммов кампилобактеров к УФ-излучению в сравнении с воздействием биоцидов на основе НУК.

Ингибирующее действие бактерицидных средств оценивали по интенсивности роста тест-штаммов в зависимости от продолжительности УФ-обработки и концентрации НУК (табл. 2).

Биоциды на основе НУК с концентрацией рабочего раствора 0,04 % подавляли значительное число бактерий *C. jejuni* (от 10^{6,5-8} до 10²⁻³ КОЕ/см³), однако заданные режимы обработки не обеспечивали полной инактивации тест-штаммов. Эффективность воздействия УФ-облучения на штаммы кампилобактеров находилась в зависимости от продолжительности экспозиции: после 20 мин обработки планшетов с бульонными бактериальными суспензиями число жизнеспособных клеток снижалось на 1,5–2,0 логарифмических порядка от исходной

Таблица 2
Рост штаммов *C. jejuni* при различных антимикробных воздействиях

Определяемый показатель	№ штамма / число повторов				Средние значения, <i>M ± m</i> (опыт)
	NCTC 11168 (контроль), <i>n</i> = 3	17п, <i>n</i> = 3	23п, <i>n</i> = 3	5.2, <i>n</i> = 3	
<i>Культивирование тест-штаммов при +37 °С в микроаэрофильных условиях (контроль)</i>					
Плотность бактериальной суспензии, lg КОЕ/см ³	7,99	6,9	6,8	6,6	7,07±0,31
Результаты ПЦР / (Ct)	+	+	+	+	(15,78 ± 0,7)
<i>Обработка НУК (0,04%-ный раствор, экспозиция 25 мин при температуре +2 °С)</i>					
Плотность бактериальной суспензии, lg КОЕ/см ³	3,6	2,6	2,1	3,3	2,90 ± 0,34
Результаты ПЦР / (Ct)	+	+	+	+	(20,75 ± 1,2)
Ингибция, lg порядков от исходного	4,4	4,3	4,7	3,3	4,1
<i>УФ-облучение в течение 20 мин</i>					
Плотность бактериальной суспензии, lg КОЕ/см ³	4,3	5,6	5,1	4,3	4,83 ± 0,32
Результаты ПЦР / (Ct)	+	+	+	-	(29,07±0,37)
Ингибция, lg порядков от исходного	3,7	2,3	1,7	2,3	2,1
<i>УФ-облучение в течение 60 мин</i>					
Плотность бактериальной суспензии, lg КОЕ/см ³	1,9	2,1	1,1	<1,0	1,53 ± 0,28
Результаты ПЦР / (Ct)	+	+	+	+	(28,25 ± 1,0)
Ингибция, lg порядков от исходного	6,09	4,8	5,7	5,6	5,4

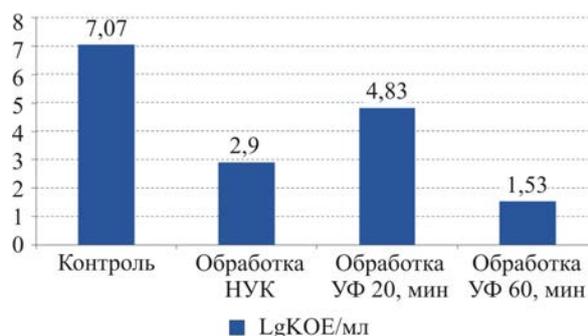


Рис. 3. Влияние бактерицидных воздействий на выживание *C. jejuni*

концентрации 10^7-10^8 КОЕ/см³, через 60 мин содержание *C. jejuni* снижалось и составляло менее 200 КОЕ/см³ (рис. 3).

Результаты проведенных сравнительных исследований по оценке антимикробных воздействий на бактерии рода *Campylobacter* свидетельствуют о необходимости подбора современных более эффективных средств деконтаминации производственной среды пищевых предприятий.

Имеющиеся данные о характере воздействия физико-химических и биологических факторов в отношении бактерий рода *Campylobacter* обусловили проведение исследований по изучению способности некоторых микроорганизмов проявлять симбиотические или антагонистические свойства в сложном биоценозе с пищевыми патогенами. Наибольшее значение в этом плане придается молочнокислым бактериям с выраженным антимикробным действием и выделенным из них субстанциям. Ведущее место в объяснении явления антагонизма молочнокислых бактерий отводится специфическим антибиотическим веществам полипептидной природы, обладающим определенным спектром антимикробного действия и различной химической структурой. Бактериостатики, продуцируемые молочнокислыми бактериями (бактериоцины, низин и др.), обладают комплексом полезных признаков, чем обусловлена возможность их использования для подавления вредной микрофлоры в производстве пищевых продуктов.

Данные, касающиеся взаимодействий между кампилобактерами и молочнокислыми микроорганизмами, немногочисленны из-за трудности воспроизведения в экспериментальных условиях естественного микробного фона этого сложного биотехнологического процесса. С использованием модели «ассоциативного роста» проведено изучение особенностей размножения *C. jejuni* в молоке, которое инокулировали одновременно с этим патогеном мезофильными молочнокислыми лактококками или термофильными лактобактериями. В зависимости от количества внесенных молочнокислых бактерий и температуры инкубирования размножение кампилобактеров заметно ингибировалось (табл. 3).

Антибактериальное действие культур *Lactobacillus plantarum*, подобное бактериоцину, установле-

но в опытах *in vitro*, при этом гибели бактериальных клеток *C. jejuni* не наступало, то есть проявлялся лишь бактериостатический эффект. Подавление роста патогенных штаммов кампилобактеров наблюдали также при совместном культивировании в молоке с *Lactobacillus lactis* и молочнокислыми лактококками *Lactococcus lactis*. В течение 6–24 ч инкубирования в смешанных популяциях происходила инактивация *C. jejuni* – снижение первоначального уровня на 1–3 lg. Установлена зависимость антибактериальной активности и характера ингибирующего действия от концентрации вышеназванных видов молочнокислых микроорганизмов, температуры и продолжительности культивирования смешанных культур, свойств используемых штаммов, которые в наибольшей степени проявлялись при внесении лактобактерий в дозе 10^8 КОЕ/см³.

Таблица 3

Обнаружение *C. jejuni* в процессе сквашивания экспериментально контаминированного сырого молока

Молочнокислые микроорганизмы	Концентрация молочнокислых микроорганизмов, клеток/см ³	Концентрация <i>C. jejuni</i> , клеток/см ³					
		10 ²		10 ³		10 ⁴	
		6 ч	24 ч	6 ч	24 ч	6 ч	24 ч
<i>Lactobacillus plantarum</i>	10 ⁴	+	–	+	+	+	+
	10 ⁶	–	–	+	+	+	+
	10 ⁸	–	–	–	–	+	–
<i>Lactobacillus lactis</i>	10 ⁴	–	–	+	–	+	+
	10 ⁶	–	–	+	–	+	+
	10 ⁸	–	–	–	–	+	–
<i>Lactococcus lactis</i>	10 ⁴	+	–	+	+	+	+
	10 ⁶	–	–	+	–	+	+
	10 ⁸	–	–	–	–	–	–

Примечание: «+» – наличие роста *C. jejuni*, «–» – отсутствие роста *C. jejuni*

Изучение способности *C. jejuni* выживать при неблагоприятных воздействиях внешней среды показало вариабельность физиологических свойств микробных популяций, высокую степень резистентности бактерий рода *Campylobacter* и связанные с ними трудности адекватного подбора эффективных средств и способов антимикробной обработки. Поэтому дальнейшие исследования должны быть направлены на изучение механизмов трансферабельной резистентности бактерий рода *Campylobacter*, влияния стрессовых факторов производственной среды на их выживаемость и переход в некультивируемые формы; изучение специфических механизмов фенотипической адаптации (толерантности) к сублетальным концентрациям антимикробных средств.

Выводы. Общие механизмы защитных свойств *Campylobacter spp.* могут реализоваться в различных вариантах взаимодействия бактерий с окружающей средой, способствуя формированию устойчивых вариантов микроорганизмов как *in vitro*, так и в произ-

водственных условиях под влиянием стрессовых техногенных или биологических факторов.

Наиболее выраженной тенденцией в изменении свойств *C. jejuni* является повышение их резистентности к бактерицидным воздействиям, которые обусловлены повсеместным применением антимикробных препаратов (АМП), в том числе антибиотиков и биоцидов.

С использованием модели «ассоциативного роста» показана зависимость антибактериальной активности и характера ингибирующего действия от концентрации молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis* и *Lactococcus lactis*, температуры и продолжительности культивирования смешанных культур, свойств используемых штаммов, которые в наибольшей степени проявлялись при внесении лактобактерий в дозе 10^8 КОЕ/см³.

Для оценки эффективности влияния на патогенную микрофлору различных антимикробных воздействий проведено сравнительное изучение чувствительности тест-штаммов кампилобактеров к УФ-излучению и биоцидам на основе надуксусной кислоты (НУК). Биоциды на основе НУК подавляли значительное число бактерий *C. jejuni*, однако заданные режимы обработки не обеспечивали полной инактивации тест-штаммов. Эффективность воздействия УФ-облучения на штаммы кампилобактеров находилась в зависимости от продолжительности экспозиции и условий антимикробного воздействия.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-16-00015).

Конфликт интересов. Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. The change in prevalence of Campylobacter on chicken carcasses during processing: A systematic review / M.T. Guerin, C. Sir, J.M. Sargeant, L. Waddell, A.M. O'Connor, R.W. Wills, R.H. Bailey, J.A. Byrd // *Poult. Sci.* – 2010. – Vol. 89, № 5. – P. 1070–1084. DOI: 10.3382/ps.2009-00213
2. 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, № 6. – P. 770–776. DOI: 10.4315/0362-028x-64.6.770
3. Epidemiology and Control of Campylobacter in Modern Broiler Production / A.B. Vidal, R.H. Davies, J.D. Rodgers, A. Ridley, F. Clifton-Hadley // *Campylobacter Ecology and Evolution.* – Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2014. – Vol. 1. – P. 287–231.
4. Teh A.H., Lee S.M., Dykes G.A. Does Campylobacter jejuni form biofilms in food-related environment? // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – Vol. 80, № 17. – P. 5154–5160. DOI: 10.1128/AEM.01493-14
5. An Evaluation of EPA's Proposed Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Using Chloroform and Dichloroacetate as Case Studies. Report of an Expert Panel [Электронный ресурс] // *International Life Sciences Institute.* – 1997. – URL: <https://hesiglobal.org/publication/an-evaluation-of-epas-proposed-guidelines-for-carcinogen-risk-assessment-using-chloroform-and-dichloroacetate-as-case-studies-workshop-report/> (дата обращения: 20.07.2019).
6. Oral (drinking water) two-generation reproductive toxicity study of bromodichloromethane (BDCM) in rats / M.S. Christian, R.G. York, A.M. Hoberman, L.C. Fisher, W.R. Brown // *International Journal of Toxicology.* – 2002. – Vol. 21, № 2. – P. 115–146. DOI: 10.1080/10915810252866097
7. 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, № 3. – P. 359–369. DOI: 10.1016/0769-2609(87)90124-4
8. 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. – № 659. – P. 1–26.
9. 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, C.C. Warf, G.K. Kemp // *J. Appl. Poult. Res.* – 2007. – Vol. 16, № 1. – P. 45–51. DOI: 10.1093/japr/16.1.45
10. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria // *Annu Rev. Biochem.* – 2009. – № 78. – P. 119–146. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923
11. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014 // *EFSA Journal.* – 2016. – Vol. 14, № 2. – 270 p. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5182
12. Mavri A., Ribič U., Možina S.S. The Biocide and Antibiotic Resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli // *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food.* – 2015. – P. 269–283. DOI: 10.1007/978-3-319-24040-4_15
13. 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, R.M. Diener, L.C. Fisher, G.A. Gates // *International Journal of Toxicology.* – 2001. – Vol. 20, № 4. – P. 239–253.
14. Rao M.V. Acidified Sodium Chlorite (ASC). Chemical and Technical Assessment. Prepared for the 68th the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives [Электронный ресурс] // *JECFA.* – 2007. – 12 p. – URL: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/68/Acidified_Sodium_Chlorite.pdf (дата обращения: 20.07.2019).

15. 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. DOI: 10.4315/0362-028x-68.8.1752
16. The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, 9–11 July 2012 [Электронный ресурс] // World Health Organization. – 2013. – 69 p. – URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/80751> (дата обращения: 20.07.2019).
17. Стеценко В.В., Ефимочкина Н.Р., Пичугина Т.В. Особенности роста и персистенции *Campylobacter jejuni* в пищевых продуктах // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 166, № 12. – С. 723–730.
18. Особенности культивирования и хранения бактерий рода *Campylobacter* в условиях *in vitro* / Н.Р. Ефимочкина, В.В. Стеценко, И.Б. Быкова, А.С. Полянина, А.С. Алешкина, С.А. Шевелева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2017. – Т. 164, № 7. – С. 81–88.
19. Изучение толерантности энтеробактерий к хлорсодержащим биоцидным средствам в экспериментальных моделях с использованием индикаторных тест-систем / Н.Р. Ефимочкина, И.Б. Быкова, Ю.В. Короткевич, Ю.М. Маркова, Л.П. Минаева, С.А. Шевелева // Анализ риска здоровью. – 2015. – № 3. – С. 73–82. DOI: 10.21668/health.risk/2015.3.11
20. Формирование биопленок пищевыми патогенами и разработка на их основе лабораторной модели *in vitro* для исследования бактерий рода *Campylobacter* / Н.Р. Ефимочкина, И.Б. Быкова, Ю.М. Маркова, Ю.В. Короткевич, В.В. Стеценко, Л.П. Минаева, С.А. Шевелева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 162, № 10. – С. 470–475.

Оценка чувствительности *Campylobacter jejuni* к антимикробным воздействиям для снижения риска контаминации пищевой продукции возбудителями кампилобактериоза / Н.Р. Ефимочкина, В.В. Стеценко, Ю.М. Маркова, Л.П. Минаева, И.Б. Быкова, Т.В. Пичугина, С.А. Шевелева // Анализ риска здоровью. – 2019. – № 4. – С. 139–147. DOI: 10.21668/health.risk/2019.4.15

UDC 576.8.097.29

DOI: 10.21668/health.risk/2019.4.15.eng

Read
online



ASSESSING SENSITIVITY OF *CAMPYLOBACTER JEJUNI* TO ANTI-MICROBE EFFECTS TO REDUCE RISKS OF FOOD PRODUCTS CONTAMINATION WITH *CAMPYLOBACTERIOSIS* AGENTS

N.R. Efimochkina, V.V. Stetsenko, Yu.M. Markova, L.P. Minaeva, I.B. Bykova, T.V. Pichugina, S.A. Sheveleva

Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, 2/14 Ust'inskiy proezd, Moscow, 109240, Russian Federation

*We aimed to assess efficiency of various anti-microbe effects on pathogenic microflora; to do that, we performed comparative study on how sensitive *Campylobacter jejuni* test strains were to ultraviolet radiation and biocides based on peracetic acid (PAA). PAA-based biocides suppressed significant numbers of *Campylobacter*; however, preset treating modes didn't allow achieving complete inactivation of the test strains. Efficiency of effects produced by ultraviolet radiation on *C.jejuni* strains depended on exposure duration: 20-minute treatment of plates with broth bacterial suspensions caused a decrease in a number of viable cells which was equal to 1.5–2,0 logarithmic orders; 60-minute treatment resulted in a decrease in *C.jejuni* contents that amounted to less than 200 CFU/cm³.*

*Polypeptide antibiotics produced by lactic-acid bacteria (bacteriocins, nisin, etc.) have some useful properties and it makes them applicable for suppressing adverse microflora in food products manufacture. We applied an 'associate growth' model to examine peculiarities related to *C.jejuni* growth in milk that, beside this pathogen, was simultaneously inoculated with mesophilic lactic-acid lactococci or thermophilic lactic-acid bacteria that were bacteriocins producers. Depending on quantity of introduced lactic-acid bacteria, such as *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus lactis* and *Lactococcus lactis*, *C.jejuni* growth was substantially inhibited. We revealed a relationship between anti-bacterial activity and nature of inhibiting effects and concentrations of the above-mentioned lactic-acid microorganisms, temperature, an amount of time during mixed cultures were cultivated together, and properties of used strains which became the most apparent when lactobacteria were introduced in a dose equal to 10⁸ CFU/cm³.*

Our study on an ability of C.jejuni to survive under exposure to an adverse environment revealed that microbe populations had variable physiological properties, Campylobacter were greatly resistant, and it was difficult to make a relevant choice on efficient tools and procedures for anti-microbe treatment.

Key words: *Campylobacter jejuni, in vitro model, biocides, anti-microbe effects, ultraviolet radiation, contamination, biofilms, lactic-acid bacteria.*

References

1. Guerin M.T., Sir C., Sargeant J.M., Waddell L., O'Connor A.M., Wills R.W., Bailey R.H., Byrd J.A. The change in prevalence of Campylobacter on chicken carcasses during processing: A systematic review. *Poult. Sci.*, 2010, vol. 89, no. 5, pp. 1070–1084. DOI: 10.3382/ps.2009-00213
2. 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, no. 6, pp. 770–776. DOI: 10.4315/0362-028x-64.6.770
3. Vidal A.B., Davies R.H., Rodgers J.D., Ridley A., Clifton-Hadley F. Epidemiology and Control of Campylobacter in Modern Broiler Production. *Campylobacter Ecology and Evolution*. Norfolk, UK, Caister Academic Press Publ., 2014, vol. 1, pp. 287–231.
4. Teh A.H., Lee S.M., Dykes G.A. Does Campylobacter jejuni form biofilms in food-related environment? *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014, vol. 80, no. 17, pp. 5154–5160. DOI: 10.1128/AEM.01493-14
5. An Evaluation of EPA's Proposed Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Using Chloroform and Dichloroacetate as Case Studies. Report of an Expert Panel. *International Life Sciences Institute*, 1997. Available at: <https://hesiglobal.org/publication/an-evaluation-of-epas-proposed-guidelines-for-carcinogen-risk-assessment-using-chloroform-and-dichloroacetate-as-case-studies-workshop-report/> (20.07.2019).
6. Christian M.S., York R.G., Hoberman A.M., Fisher L.C., Brown W.R. Oral (drinking water) two-generation reproductive toxicity study of bromodichloromethane (BDCM) in rats. *International Journal of Toxicology*, 2002, vol. 21, no. 2, pp. 115–146. DOI: 10.1080/10915810252866097
7. 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, no. 3, pp. 359–369. DOI: 10.1016/0769-2609(87)90124-4
8. 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, no. 659, pp. 1–26.
9. Mohyla P., Bilgili S.F., Oyarzabal O.A., Warf C.C., Kemp G.K. 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
10. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annu Rev. Biochem.*, 2009, no. 78, pp. 119–146. DOI: 10.1146/annurev.biochem.78.082907.145923
11. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2014. *EFSA Journal*, 2016, vol. 14, no. 2, 270 p. DOI: 10.2903/j.efsa.2018.5182
12. Mavri A., Ribič U., Možina S.S. The Biocide and Antibiotic Resistance in Campylobacter jejuni and Campylobacter coli. *Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food*, 2015, pp. 269–283. DOI: 10.1007/978-3-319-24040-4_15
13. Christian M.S., York R.G., Hoberman A.M., Diener R.M., Fisher L.C., Gates G.A. 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, no. 4, pp. 239–253.

© Efimochkina N.R., Stetsenko V.V., Markova Yu.M., Minaeva L.P., Bykova I.B., Pichugina T.V., Sheveleva S.A., 2019
Natalya R. Efimochkina – Doctor of Biological Sciences., Leading researcher at the Laboratory for Biosafety and Nutrimicrobiome Analysis (e-mail: karlikanova@ion.ru; tel.: +7 (495) 698-53-83; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-9071-0326>).

Valentina V. Stetsenko – Junior researcher at the Laboratory for Biosafety and Nutrimicrobiome Analysis (e-mail: stetsenko_valentina1992@mail.ru; tel. +7 (495) 698-53-83; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6470-171X>).

Yulia M. Markova – Candidate of Biological Sciences, Researcher at the Laboratory for Biosafety and Nutrimicrobiome Analysis (e-mail: yulia.markova.ion@gmail.com; tel.: +7 (495) 698-53-83; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2631-6412>).

Liudmila P. Minaeva – Candidate of Technical Sciences, Senior researcher at the Laboratory for Biosafety and Nutrimicrobiome Analysis (e-mail: liuminaeva-ion@mail.ru; tel.: +7 (495) 698-53-83; ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-1853-5735>).

Irina B. Bykova – Researcher at the Laboratory for Biosafety and Nutrimicrobiome Analysis (e-mail: bikova@ion.ru; tel.: +7 (495) 698-53-83; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7288-312X>).

Tatiana V. Pichugina – Candidate of Technical Sciences, Researcher at the Laboratory for Biosafety and Nutrimicrobiome Analysis (e-mail: bbtvp@ion.ru; tel.: +7 (495) 698-53-83; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4632-7119>).

Svetlana A. Sheveleva – Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory for Biosafety and Nutrimicrobiome Analysis (e-mail: sheveleva@ion.ru; tel.: +7 (495) 698-53-83; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5647-9709>).

14. Rao M.V. Acidified Sodium Chlorite (ASC). Chemical and Technical Assessment. Prepared for the 68th the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *JECFA*, 2007, 12 p. Available at: http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/68/Acidified_Sodium_Chlorite.pdf (20.07.2019).

15. 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. DOI: 10.4315/0362-028x-68.8.1752

16. The global view of campylobacteriosis: report of an expert consultation, Utrecht, Netherlands, 9–11 July 2012. *World Health Organization*, 2013, 69 p. Available at: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/80751> (20.07.2019).

17. Stetsenko V.V., Efimochkina N.R., Pichugina T.V. Osobennosti rosta i persistentsii *Campylobacter jejuni* v pishchevykh produktakh [Peculiarities of *Campylobacter jejuni* growth and persistence in food products]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*, 2018, vol. 166, no. 12, pp. 723–730 (in Russian).

18. Efimochkina N.R., Stetsenko V.V., Bykova I.B., Polyamina A.S., Aleshkina A.S., Sheveleva S.A. Osobennosti kul'tivirovaniya i khraneniya bakterii roda *Campylobacter* v usloviyakh in vitro [Peculiarities of cultivating and storing *Campylobacter* bacteria in *in vitro* conditions]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*, 2017, vol. 164, no. 7, pp. 81–88 (in Russian).

19. Efimochkina N.R., Bykova I.B., Korotkevich Yu.V., Markova Yu.M., Minaeva L.P., Sheveleva S.A. Study of tolerance of enterobacteria to chlorine-based biocides in experimental models using chromogenic indicator tests. *Health Risk Analysis*, 2015, no. 3, pp. 73–82 (in Russian). DOI: 10.21668/health.risk/2015.3.11.eng

20. Efimochkina N.R., Bykova I.B., Markova Yu.M., Korotkevich Yu.V., Stetsenko V.V., Minaeva L.P., Sheveleva S.A. Formirovanie bioplenok pishchevymi patogenami i razrabotka na ikh osnove laboratornoi modeli in vitro dlya issledovaniya bakterii roda *Campylobacter* [Food pathogens forming biofilms and an *in vitro* laboratory model based on such films and applied to examine bacteria from *Campylobacter* family]. *Byulleten' eksperimental'noi biologii i meditsiny*, 2016, vol. 162, no. 10, pp. 470–475 (in Russian).

Efimochkina N.R., Stetsenko V.V., Markova Yu.M., Minaeva L.P., Bykova I.B., Pichugina T.V., Sheveleva S.A. Assessing sensitivity of campylobacter jejuni to anti-microbe effects to reduce risks of food products contamination with campylobacteriosis agents. Health Risk Analysis, 2019, no. 4, pp. 139–147. DOI: 10.21668/health.risk/2019.4.15.eng

Получена: 25.07.2019

Принята: 13.12.2019

Опубликована: 30.12.2019