

# ИНГИБИРОВАНИЕ *Listeria monocytogenes* 302 В МОДЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ СЫРА С ПОМОЩЬЮ *in situ* ПРОДУЦИРУЕМЫХ ОЦИНОВ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

## INHIBITION OF *Listeria monocytogenes* IN A MODEL CHEESE SAMPLES USING *in situ* PRODUCED BACTERIOCINS BY LACTIC ACID BACTERIA

V. Zulfigarova  
S. Gulahmadov  
K. Bakhshaliyeva

**Summary.** The growth dynamics of *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* A7 and *Enterococcus faecalis* S5 and the intensity of *in situ* production of bacteriocins, as well as the possibility of using them to inhibit the growth of *L. monocytogenes* 302 during the maturation of model cheese samples were studied. With the same amount of initial inoculum ( $\log 3$  CFU/g of cheese), 7.2 log units of live cells of *L. delbrueckii* *lactis* A7 and 6.1 log units *E. faecalis* S5 were found at the end of the cheese ripening period. The maximum titer of bacteriocin A7 and enterocin S5 in the medium, which was detected at the end of the first week of the maturation process, was 1200 IU/g and 2200 IU/g, respectively. In the absence of inhibitory factors, the amount of primary inoculum *L. monocytogenes* 302 in cheese increased 2.5 times. *L. delbrueckii* spp. *lactis* A7 and *E. faecium* S5, as well as bacteriocin A7 and enterocin S5, inhibited the growth of *L. monocytogenes* in cheese by 40%, 63%, 61% and 74%, respectively.

**Keywords:** cheese, *Listeria monocytogenes*, biocontrol, bacteriocin.

**Зулфигарова Вусала Шахин**

Преподаватель, Университет Одлар Йурду (Баку)  
nazarli.vusala@gmail.com

**Гюльяхмедов Саиб Гурбан**

Д.б.н, Бакинский Государственный Университет  
sahib66@rambler.ru

**Бахшалиева Конул Фарух**

Д.б.н., доцент, Институт Микробиологии  
Министерства Науки и Образования Республики  
Азербайджан  
konul.baxsh@mail.ru

**Аннотация.** Изучено динамика роста штаммов *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* A7 и *Enterococcus faecalis* S5 и интенсивность *in situ* продуцирования бактериоцинов, а также возможности с их помощью ингибирования роста *L. monocytogenes* 302 в процессе созревания модельных образцов сыра. При одинаковом количестве начального посевного материала ( $\log 3$  КОЕ/г сыра), в конце периода созревания сыра было обнаружено 7,2 log единиц живых клеток *L. delbrueckii* spp. *lactis* A7 и 6,1 log единиц *E. faecalis* S5. Максимальный титр бактериоцина A7 и энтероцина S5 в среде, который был обнаружен в конце первой недели процесса созревания, составил 1200 ПЕ/г и 2200 ПЕ/г, соответственно. При отсутствии ингибирующих факторов количество первичного посевного материала *L. monocytogenes* 302 в сыре увеличилось в 2,5 раза. *L. delbrueckii* spp. *lactis* A7 и *E. faecium* S5, а также бактериоцин A7 и энтероцин S5 ингибировали рост *L. monocytogenes* в составе сыра на 40%, 63%, 61% и 74%, соответственно.

**Ключевые слова:** сыр, *Listeria monocytogenes*, биоконтроль, бактериоцин.

## 1. Введение

**О**беспечение людей безопасными продуктами пищи является одной из основных проблем во всем мире. По данным ВОЗ, в результате употребления некачественных и небезопасных продуктов ежегодно заболевают больше миллиона людей. Причиной болезней пищевого происхождения не редко служат патогенные микроорганизмы, такие как, представители родов *Listeria*, *Salmonella*, *Staphylococcus* и т.д. [12].

В частности, при листериозе, возбудителем которого является *Listeria monocytogenes*, у больных возникает менингит. Подавляющему большинству таких больных требуется стационарное лечение, а прибли-

зительно, у одной трет из них наблюдается летальный эффект [3]. Эти бактерии способны расти при 4 °С, pH 4,5 и в присутствии 12% соли. Поэтому, при загрязнении продуктов пищи этим патогеном они портятся и становятся опасным для потребления [8]. Клетки *Listeria* часто обнаруживаются в молоке, разных видах сыра, сосисок, а также в морепродуктах. Источниками загрязнения могут быть непосредственно сырье и неосторожные процессы производства [4].

Из-за резистентности к стрессовым факторам окружающей среды, следовательно, и вездесущности этого патогена, исследователями предпринимаются самые разные способы искоренения его из состава пищевых продуктов. Эти способы условно можно разделить на три группы: физические (термическая обработка

продуктов, высокое давление и т.д.), химические (добавление синтетических консервантов) и биологические.

С помощью физических методов не всегда получаются желаемые результаты, к тому же, они применяются при производстве ограниченного ассортимента пищевых продуктов. Что касается синтетических консервантов, то все большее число современных потребителей обеспокоены синтетическими консервантами и требуют минимально обработанных пищевых продуктов [11]. Эти обстоятельства выводят на первый план биологические методы борьбы с патогенными микроорганизмами, которая основывается на применении естественных антимикробных метаболитов из различных живых источников. При этом, перспективным способом сохранения пищевых продуктов является использование бактериоцинов или бактериоцин-продуцирующих молочнокислых бактерий (МКБ), обладающие, в целом, статусом безопасности (GRAS). Бактериоцины МКБ в отдельности и в синергизме с химическими консервантами способны ингибировать рост сопутствующих микроорганизмов [11]. Пептидные молекулы бактериоцинов в микромолярных концентрациях встраиваются в липидный бислой мембран пассивных клеток за счёт неспецифических электростатических и гидрофобных взаимодействий. При этом они приобретают упорядоченную конформацию и формируют поры, вызывая тем самым диссипацию электрохимических потенциалов и гибель клеток [9].

Богатый состав с полезными для людей ингредиентами (витамины, жиры, свободные аминокислоты, минералы и т.д.) и древние традиции изготовления сырных изделий, а также широкое разнообразие этого ценного продукта обуславливают огромный спрос в них среди населения всего мира, в том числе и стран СНГ [2].

Штаммы *Lactobacillus delbrueckii* spp. *lactis* A7 и *Enterococcus faecalis* S5 были изолированы нами из грудного молока и из традиционного сырного образца, соответственно. Они обладали широким спектром антимикробной активности и ингибировали рост *L. monocytogenes* в условиях *in vitro* [6], [7]. Целью настоящих исследований явилось изучение возможности ингибирования роста *L. monocytogenes* в модельных образцах сыра *in situ* в присутствии этих бактериоциногенных штаммов, а также их антимикробных метаболитов пептидного происхождения.

## 2. Материалы и методы

Образцы сыра были изготовлены из обезжиренного молока (E. Merck, Германия). Для изготовления 100 г

сыра брали 400 г порошка обезжиренного молока, малыми порциями добавляли в 1 л дистиллированную воду (30<sup>0</sup> С), размешивали для полного растворения, затем продолжая данной процедуры добавляли еще 1 л воды. После получения и стерилизации в автоклаве, однородную суспензию всевали 20 мл ночной суспензии активных штаммов-продуцентов по отдельности, ждали 20 мин, затем добавляли сычужный фермент (Maxiren 15L, Нидерланды). Спустя 30 мин полученный творог разрезали на маленькие кубики и ошпаривали при 37 °С в течение 10 мин. Полученную массу прессовали в течение 24 ч при 20 °С. Образцы сыра солили при 120 С в рассоле 20% NaCl (не йодированного) и выдерживали при той же температуре в течение экспериментов.

Для каждого варианта экспериментов отдельно изготавливали (по три для каждого) приблизительно 100 г сыра. В зависимости от цели и задачи опыта, в образцы молока при 300С вводили примерно 103 КОЕ/мл *L. monocytogenes* 302, 20 мл ночной суспензии штаммов-продуцентов и препараты бактериоцина и энтероцина (1600 ПЕ/мл).

В первом образце сыра изучали динамику роста и бактериоцинозного титра штаммов — продуцентов в течение 28 суток, которое соответствует времени созревания сыра. В пяти одинаковых порциях (а, б, в, г, д) второго образца сыра в течение 28 суток исследовали изменение роста *L. monocytogenes* 302 — как контрольный вариант (а), то же самое в присутствии клеток *L. delbrueckii* spp. *lactis* A7 (б), бактериоцина A7 (в), *L. monocytogenes* 302 в присутствии *E. faecalis* S5 (г), *L. monocytogenes* 302 и энтероцин S5 (9).

Пробы сыра отбирали в асептических условиях и анализировали сразу после отбора проб. Гомогенаты сыра готовили в стерильном растворе цитрата натрия и осуществляли серийное разведения в стерильной пептонной воде по методу [10]. *L. monocytogenes* высевали в трех повторениях на PALCAM — агаре (E. Merck, Германия); Чашки Петри инкубировали при 37 °С в течение 48 часов.

Рост в сыре *L. delbrueckii* spp. *lactis* A7 и *E. faecalis* S5 определяли в средах MPC-агар (1,5%) и M17-агар, соответственно, подсчетом клеток, через каждый определенный промежуток времени, в течение экспериментального периода. Титр бактериоцина и энтероцина в составе сыра определяли методом диффузии. С этой целью гомогенат сыра (10 г) в дистиллированной воде (90 мл) центрифугировали при 20 000 г в течение 15 мин при 4 °С. Супернатант фильтровали через фильтр Millex GV с размером пор 0,22 мм (Millipore, France). pH супернатанта повышали до 6,5 с помощью стерильного

Таблица 1. Динамика роста *L. delbrueckii* spp. *lactis* A7, *E. faecium* S5 (log КОЕ/г сыра) и титр их оцинов (ПЕ/г сыра) при созревании сыра (температура созревания 120С)

Варианты	Время (сутки)					
	0	3	7	14	21	28
Рост <i>L. delbrueckii</i> spp. <i>lactis</i> A7	3±	4,30,3	6,2±	6,8±	7,1±	7,2±
Титр бактериоцина	0	800	1200	1000	400	400
Рост <i>E. faecium</i> S5	3±	3,8±	5,1±	5,4±	5,9±	6,1±
Титр энтероцина	0	1200	2200	1600	1200	1000

2М NaOH и использовали для определения активности обоих активных пептидов. В чашку Петри вносили, в качестве индикаторного организма, 0,1% суспензию *L. monocytogenes* 302 в 1,5% BHI-агаре (20 мл), содержащем каталазу (150 МЕ/мл) для исключения возможного антимикробного эффекта перекиси водорода на клетки пассивного штамма. После остывания среды вырезали в ней лунки с диаметром 9 мм и вносили туда 200 мкл препарата бактериоцина. Оставили 24 ч при 370С, далее измерили диаметр светлой зоны вокруг лунок. Активность определяли в двух повторениях, выражали ПЕ/г сыра, которая соответствует обратной величине наивысшей степени разведения препарата, проявившая антимикробную активность.

### 3. Результаты и их обсуждение

В таблице суммированы результаты экспериментов по изучению динамики роста и титра бактериоцина штамма *L. delbrueckii* spp. *lactis* A7 и энтероцина штамма *E. faecalis* S5 в сырных образцах в период их созревания. Из таблицы видно, что процесс созревание сыра в течении месяца сопровождался значительным ростом обеих видов молочнокислых бактерий, вносимых в молоко при изготовления этого кисломолочного продукта. При этом рост штамма *L. delbrueckii* spp. *lactis* A7 был выше по сравнению с ростом штамма *E. faecalis* S5 на 1,1 log единиц. Так, при одинаковом количестве начального посевного материала (log 3 КОЕ/г сыра), в конце периода созревания сыра в образце с лактобациллы было обнаружено 7,2 log единиц живых клеток *L. delbrueckii* spp. *lactis* A7, а в образце с энтерококки — 6,1 log единиц *E. faecalis* S5.

Наблюдаемая динамика роста исследуемых штаммов может быть связано с широким спектром питательных компонентов в составе сыра, которые создают более благоприятную среду для клеток лактобацил, чем энтерококков [8].

Интенсивный рост бактерий-продуцентов в период созревания образцов сыра сопровождался синтезом и накоплением в среде оцинов — бактериоцина A7 и энтероцина S5 (таблица). При этом, не смотря на срав-

нительно слабый рост *E. faecium* S5, титр энтероцина S5 превышало бактериоцина A7 почти в два раза. Как видно из таблицы, максимальный титр обеих оцинов в среде был обнаружен в конце первой недели процесса созревания сыра. Так, антимикробная активность бактериоцина A7 в этот период составила 1200 ПЕ/г, а энтероцина S5—2200 ПЕ/г. В последующие недели титр оцинов начал снижаться и такая тенденция продолжалась до конца эксперимента: в конце второго недели титр бактериоцина A7 составил 1000 ПЕ/г, а в последние две (III и IV) недели — 400 ПЕ/г. Аналогичные показатели для энтероцина S5 составили 1600 ПЕ/г, 1200 ПЕ/г и 1000 ПЕ/г, соответственно.

Анализ данных, представленных в таблице, показывает, что максимальный титр оцинов в составе сыра наблюдается к концу экспоненциальной фазы роста продуцентов. Однако, в обоих вариантах эксперимента, не смотря на достоверный рост численности популяции, титр оцинов уменьшается. По литературным данным, причиной такой тенденции могут быть связывание бактериоцинов с клеточной мембраной самих продуцентов и с компонентами сыра, инактивация протеазами, изменения растворимости и заряда молекул оцинов и т.д [5].

Следующая серия экспериментов, результаты которых суммированы на рисунке 1, посвящена к изучению изменение роста *L. monocytogenes* 302 в процессе созревания сыра в присутствии *L. delbrueckii* spp. *lactis* A7 и *E. faecium* S5, а также их оцинов. С этой целью для каждого оцинсинтезирующего штамма были использованы три ровные порции одного образца сыра. В первую порцию сразу после добавления сычужного фермента вносили *L. monocytogenes* 302 (3 logКОЕ/г) и исследовали изменение ее роста (контрольный вариант). Из графика видно, что в течении первых 3 суток был обнаружен незначительный прирост патогена, а в последующие недели периода созревания сыра наблюдался сильное увеличение плотности популяции патогена. Так, в отсутствии ингибирующих факторов количество первичного посевного материала в сыре увеличилось в 2,5 раза и в конце периода созревания достигало до 7,6 logКОЕ/г. Такой обильный рост *L.*

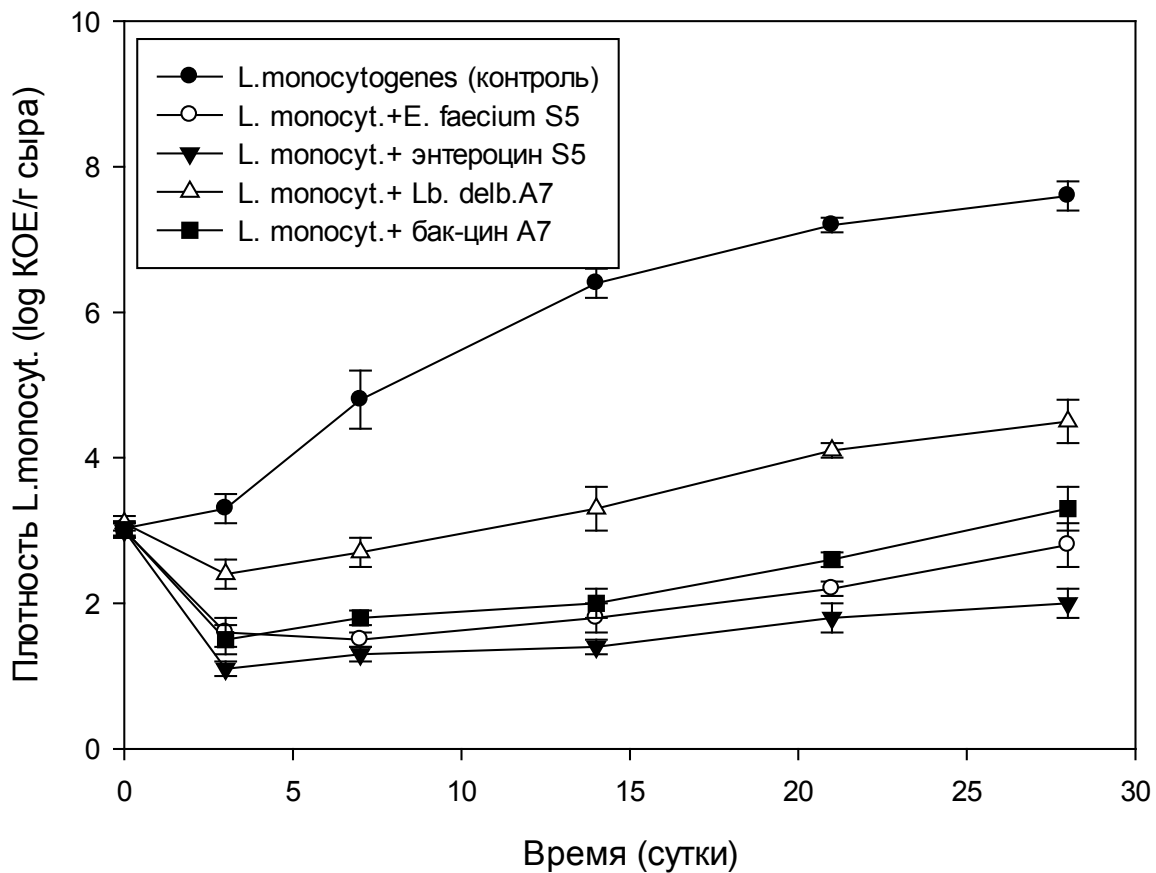


Рис. 1. Изменение роста *L. monocytogenes* 302 в процессе созревания сыра в присутствии штаммов *L. delbrueckii* spp. *lactis* A7, *E. faecium* S5 и их оцинов (принадлежность кривых указана внутри графика)

*monocytogenes* в составе различных продуктов ферментации были отмечены и в других исследованиях [8].

Однако в присутствии, как самих оцинпродуцирующих штаммов, так и их оцинов наблюдалось очевидное ингибирование роста *L. monocytogenes*. При этом, ингибирующий эффект *E. faecium* S5 и энтероцина S5 проявился значительно выраженно по сравнению со штаммом *L. delbrueckii* spp. *lactis* A7 и бактериоцином A7. Так, в порциях сыра в присутствии самих исследуемых штаммов (A7 и S5) в течении первых 3 суток количество клеток патогена уменьшилось на 0,6 log единиц и 1,4 log единиц, соответственно, что указывает на бактерицидный механизм действия обеих оцинов. Видимо, в этот период в сыре накапливается достаточное концентрация пептидных метаболитов с антимикробным свойством для лизиса определенного количества клеток патогена, который пока находится на лаг фазе роста.

Однако, в конце первой недели проведения экспериментов наблюдалось увеличение численности попу-

ляций в порции сыра со штаммом A7, и такая тенденция наблюдалась до конца периода его созревания. За этот период времени общий прирост клеток патогена в присутствии штамма A7 составил 1,5 раза и достигал до 4,5 log COE/г, что было на 2,1 log единиц меньше по сравнению с контрольным вариантом. А в варианте со штаммом S5 продолжался спад в плотности патогена до конца недели, затем наблюдалось ее увеличение до конца периода его созревания, достигнув отметки всего 2,8 log COE/г, что на 4,8 log единиц меньше по сравнению с контрольным вариантом. «Ослабление» антимикробной активности штаммов-продуцентов в течении последующих недель может быть связано с тем, что в переходившей на экспоненциальную фазу роста популяции, скорость повышения численности клеток патогена опережает проявлении тотальной антимикробной активности их антимикробных метаболитов в среде.

На рисунке 1 отражены также результаты по изучению динамики численности клеток *L. monocytogenes* 302 в процессе созревания сыра в присутствии бак-

териоцина А7 и энтероцина S5. В этих экспериментах клетки *L. monocytogenes* 302 (3 logKOE/г) вносились одновременно с препаратами оцинов (1600 ПЕ/мл). Полученные результаты показали идентичный характер влияния обеих активных метаболитов: добавление оцинов привело к значительному ингибированию роста *L. monocytogenes* в процессе созревания сыра. При этом, энтероцин S5 оказался более сильным ингибитором, чем бактериоцин А7. Соответствующие кривые показывают, что уже в середине первой недели созревания сыра численность популяции патогена в присутствии бактериоцина А7 сократилась на половину — до 1,5 logКОЕ/г, а в присутствии энтероцина S5 — сократилось еще больше, до отметки 1,1 logKOE/г. Однако, в конце первой недели, наблюдалось медленное, но достоверное увеличение численности популяций в обеих вариантах, и такая тенденция наблюдалась до конца периода созревания. В это время в присутствии бактериоцина А7 плотность популяции приравнивалась первоначальной концентрации посевного материала (3 log КОЕ/г), что было на 2,5 раза меньше по сравнению с численностью популяции патогена в контрольном варианте (7,5 log КОЕ/г). А в варианте с более активным энтероцином, аналогичный показатель составил 2 logKOE/г, что было на 3,8 раза меньше по сравнению с численностью популяции патогена в контрольном варианте.

Переход к медленному росту патогена в составе сыре после первого недели созревания может быть связано с тем, что под воздействием различных факторов среды титр оцинов в нем снижается. В частности, его молекулы могут необратимо связываться с компонентами сыра, полипептидная цепочка может быть атакована протеолитическими ферментами патогена, которые высвобождаются после лизиса клеток, могут

изменяться растворимость и заряд активной молекулы бактериоцина и т. д. [1], [5].

Таким образом, самым сильным ингибитором роста *L. monocytogenes*, оказался энтероцин S5. Необходимо отметить, что присутствие вирулентных генов в геноме некоторых МКБ ограничивает применение этих бактерий в пищевых ферментациях. В частности, представители рода *Enterococcus* в этом плане обладают плохой репутацией. Например, *E. faecium* S5, хотя и обладает строгой и сильной антимикробной активностью, чем *L. delbrueckii* spp. *lactis* А7, в виду присутствия в геноме некоторых вирулентных генов (*cylLs*, *cylM* и *ace*), не рекомендуется в качестве стартовой культуры для ферментации. Поэтому, этот штамм является перспективным в плане выделения большого количества энтероцина, с дальнейшим применением его для контроля роста нежелательной микрофлоры. С этой целью было подобрано оптимальное условие для роста и синтеза энтероцина S5, после чего авторы добились 32-кратного увеличения его титра в среде [7].

#### 4. Заключение

Штаммы *L. delbrueckii* spp. *lactis* А7 и *E. faecium* S5 способны контролировать численность клеток одной из опасных патогенных бактерий — *L. monocytogenes* в составе сыра. Ингибирующий эффект этих бактерий обусловлен *in situ* продуцированием антимикробных метаболитов пептидного происхождения, так называемых оцинов. Контроль роста патогена можно осуществить как штаммами продуцентами оцинов, так и очищенными препаратами самих оцинов. Самым сильным ингибитором роста *L. monocytogenes*, оказался энтероцин S5.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Aasen W., Grindheim L.T., Waters J. The outdoor environment as a site for children's participation, meaning-making and democratic learning: Examples from Norwegian kindergartens. *Education*, 2009, 3–13. 37(1). p 5–13
2. Akhmedov A.I. Merchandizingyng produktov pitaniya. Uchebnyk dlya vuzov. Peresmotrennoye i polnoye vtoroye izdaniye. Baku: Izdatel'stvo «Universitet Iktisad», 2006, — 480 str [in Azerbaijani]
3. Baka, M., Noriega, E., Mertens, L., Van Derlinden, E., Van Impe, J.F.M. Protective role of indigenous *Leuconostoc carnosum* against *Listeria monocytogenes* on vacuum packed Frankfurter sausages at suboptimal temperatures. *Food Res. Int.*, 2014, 66. p 197–206.
4. Boerlin, P., F. Boerlin-Petzold, E. Bannerman, J. Bille, and T. Jemmi. Typing *Listeria monocytogenes* isolates from fish products and human listeriosis cases.// *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63:1338–1343.
5. Gänzle, M.G., Weber S., Hammes W.P. Effect of ecological factors on the inhibitory spectrum and activity of bacteriocins.// *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, 46. p 207–212
6. Gulakhmadov S.G., Nazarli V.S., Valiyeva G.A (2017). Antimikrobnaya aktivnost' molochnokislykh bakteriy, vydelennykh iz obraztsov grudnogo moloka.// *Vestnik Bakinskogo Universiteta. Seriya yestestvennykh nauk*, № 1. s. 61–66 [in Azerbaijani]
7. Guseynova N.F., Gyulakhmedov S.G. Akhmedova A.F. i dr. Chastichnaya ochistka i kharakteristika shtamma bakteriyosina *Enterococcus faecium* S5, vydelennogo iz azerbaydzhanskogo syra.// *Doklady Natsional'noy akademii nauk Azerbaydzhana.*, 2009, T. LXV. № 5. S. 95–103. [in Russian]
8. Irene M., Alicia R., Josuee D., Juan J.C. Strategies for Biocontrol of *Listeria monocytogenes* Using Lactic Acid Bacteria and Their Metabolites in Ready-to-Eat Meat- and Dairy-Ripened Products (Review)// *Foods*, 2022, 11/542. p 1–18.

9. Minahk C.J., Fariás M.E., Sesma F. Effect of Enterocin CRL35 on *Listeria Monocytogenes* Cell Membrane // *FEMS Microbiol. Lett.*, 2000. V. 192. No 1. P. 79–83.
10. Nunez M., Rodriguez J.L., Garcia E., Gaya P., Medina M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by enterocin 4 during the manufacture and ripening of Manchego cheese // *Journal of Applied Microbiology.*, 1997, 83. p 671–677
11. Wang Y, Wei Y, Shang N and Li P. Synergistic Inhibition of Plantaricin E/F and Lactic Acid Against *Aeromonas hydrophila* LPL-1 Reveals the Novel Potential of Class IIb Bacteriocin. // *Front. Microbiol.*, 2022, 13:774184. doi: 10.3389/fmicb.2022.774184
12. World Health Organization. WHO Estimates of the Global Burden of Foodborne Diseases: Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group 2007–2015; I. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2015; p. 255, ISBN978 92 4 156516 5.

© Зулфигарова Вусала Шахин ( nazarli.vusala@gmail.com ),

Гюльяхмедов Саиб Гурбан ( sahib66@gambler.ru ), Бахшалиева Коңул Фарух ( konul.baxsh@mail.ru ).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



г. Баку