ДОСТИЖЕНИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ НАУКИ И ПРАКТИКИ

УДК 619:614.31

DOI:10.31677/2072-6724-2021-33-3-73–79

ИЗУЧЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРНЫХ РЕЖИМОВ ИНАКТИВАЦИИ *SALMONELLA* READING

¹В.С. Черепушкина, младший научный сотрудник

²Л.Н. Стацевич, кандидат биологических наук, доцент

²О.С. Козлова, преподаватель

³В.Н. Афонюшкин, кандидат биологических наук

¹Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологии РАН

²Новосибирский государственный аграрный университет

³Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

E-mail: loi-2005@yandex.ru

Ключевые слова: сальмонеллы, белки теплового шока, термотолерантность, температурная инактивация сальмонелл, *Salmonella* reading, птицеводство.

Реферат. По заключению экспертов Всемирной организации здравоохранения, сальмонеллез как зооантропонозная инфекция не имеет себе равных по сложности эпизоотологии, эпидемиологии и трудностям борьбы с ним [1] и характеризуется значительными уровнями спорадической и вспышечной заболеваемости населения [2]. Продукты птицеводства (яйца и мясо птицы) по-прежнему являются основными факторами передачи инфекции человеку [2]. Наличие сальмонелл в мясной продукции не допускается как в странах Европейского Союза, так и в Российской Федерации [3, 4]. В связи с этим важным является осуществление микробиологического контроля ввозимых и хранящихся в хозяйстве комбикормов и кормовых ингредиентов, а также воды, используемой для поения птицы. Кормление птицы должно осуществляться комбикормами, прошедшими термообработку (гранулированные корма). Поскольку сальмонеллы – широко представленный вид микроорганизмов, обитающих в разнообразных видах животных, птиц и насекомых, данный факт подразумевает широкий диапазон условий термоинактивации разных их штаммов. Цель исследования – изучить режимы термоинактивации сальмонелл и оценить влияние теплового шока на адаптивность сальмонелл к высоким температурам. Нами была протестирована термочувствительность изолятов сальмонелл, выделенных из различных проб биоматериала на одной из птицефабрик РФ. Был установлен факт значительно повышения термотолерантности сальмонелл после предварительного 40-минутного прогрева при 42 °С. Культуры сальмонелл после предварительной инкубации выживали при нагреве в течение 5 мин и температуре 53,51±2,00 °С. Сравнительный анализ динамических рядов, описывающих зависимость между наличием предварительного нагрева культур сальмонелл, до температуры тела птицы (42 °С) позволяет говорить об увеличении термотолерантности сальмонелл после предварительного нагрева при широком диапазоне времени экспозиции.

Для осуществления всего спектра профилактических мероприятий и мер борьбы с сальмонеллезом на птицеводческих фермах важно знать температуру инактивации возбудителей и учитывать возможность быстрой адаптации бактерий к высокой температуре.

У птиц в просвете пищеварительного канала всегда присутствуют патогенные формы, такие как *Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* и другие группы микроорганизмов в малых концентрациях [5]. При снижении иммунитета, нарушении условий содержания, стрессовых факторах условно-патогенная и патогенная микрофлора начинает получать конкурентное преимущество.

Находясь в желудочно-кишечном тракте, сальмонеллы часто не вызывают клинических симптомов заболевания, но впоследствии они могут контаминировать тушки при ошпаривании, удалении оперения, потрошении и охлаждении [6]. Содержание микрофлоры в воде шпательных чанов увеличивается в десятки и сотни раз через 3–4 ч работы [7].

Бактерии могут быть занесены при транспортировке кормовых составляющих, особенно белковых шротов животного и растительного происхождения, во время их производства и хранения [9].

Птицеводческое предприятие должно стремиться сводить к минимуму риски заражения кормов, поступающего сырья с целью предотвращения заноса (ввоза) возбудителя инфекции [10]. Поскольку сальмонеллы – широко представленный вид микроорганизмов, обитающих в разнообразных видах животных, птиц и насекомых, данный факт подразумевает широкий диапазон условий термоинактивации разных их штаммов.

Действие различных неблагоприятных факторов на популяции бактерий вызывает состояние стресса, которое способствует синтезу стрессорных белков, в частности белков теплового шока (Heat shock proteins – Hsps). Сходство аминокислотной последовательности (гомология) некоторых из них у самых различных организмов от бактерий до человека говорит об их высокой консервативности и эволюции, которая характерна для жизненно важных белков. Их образование запускает механизмы адаптации к неблагоприятным воздействиям, позволяющие организмам выжить [11–13].

Представляет интерес тот феномен, что температура тела птицы достаточна для активации белков теплового шока у бактерий сем. Enterobacteriaceae, что, в свою очередь, должно повышать устойчивость к широкому спектру неблагоприятных факторов. Так, например, известно, что, прогрев клеток при 45 °С уменьшает их чувствительность к последующему воздействию при 54 °С [14].

Цель исследования – изучить режимы термоинактивации *Salmonella reading* и оценить влияние теплового шока на адаптивность сальмонелл к высоким температурам.

Для реализации поставленной цели нами была протестирована термочувствительность изолятов сальмонелл, выделенных из различных проб биоматериала на одной из птицефабрик РФ (табл. 1) и депонированных в коллекции микроорганизмов ИХБФМ СО РАН.

Таблица 1

Список культур микроорганизмов, используемых в экспериментах

№ п/п	Номер культуры	Источник изоляции	Серотип
1	341	Пух с выводного шкафа	<i>S. reading</i>
2	3927	Инкубационное яйцо, пт. 81/3	<i>S. reading</i>
3	3936	Крыло–локтевая часть, пт. 14/2	<i>S. reading</i>
4	2619	Содержимое слепых кишок (убой), пт. 72/3	<i>S. reading</i>
5	633	Селезенка (убой), пт. 77/4	<i>S. reading</i>
6	635-639	Содержимое желточного мешка, пт. 73/3	<i>S. reading</i>

Перед экспериментом культуры выращивали при температуре 25 °C 18 ч с использованием твердой питательной среды LB (Lysogeny broth). Для имитации температуры тела птицы одну часть культур сальмонелл помещали в микротермостат на 40 мин при температуре 42 °C. Другую часть культур оставляли при комнатной температуре (25 °C) в качестве контроля.

Затем все культуры исследуемых микроорганизмов ресуспендировали до 0,5 ед McFarland (1,5·10⁸ КОЕ/мл) и вносили в лунки микропланшета в объеме 50 мкл для тестирования термотолерантности.

Различные режимы термоинактивации создавали с использованием программируемого термощиклера «Реалтайм-амплификатор CFX» (Ltd Bio-Rad Laboratory) с использованием функции температурного градиента в термоблоке данного прибора. После предварительной инкубации были выбраны следующие временные режимы термоинактивации: 5 мин, 3 мин и 10 с.

После термоинактивации осуществляли проверку стерильности каждого температурного режима путем посевов культур сальмонелл на агар Эндо и в селективно-накопительной среде RVS (среда Раппапорта-Вассилиадиса) и культивирования в термостате 24 ч при 37 °C. Рост микроорганизмов на дифференциально-диагностической среде Эндо оценивали визуально — колонии сальмонелл бледно-розовые, 1–2 мм в диаметре, а в RVS — оценивая степень помутнения и изменения цвета среды. Для определения режима термоинактивации культур *Salmonella reading* регистрировали прекращение их роста на питательных средах.

Статистическую обработку полученных данных проводили методами вариационной и непараметрической статистики. Полученные зависимости описывали с использованием полиномиальной функции с помощью программы MS Excel. Статистическую значимость различий оценивали по Вилкоксоу и Манну-Уитни.

Микроорганизмы в природе редко находятся в оптимальных условиях, чаще всего жизнь микробов протекает при несбалансированности элементов питания и при неблагоприятных физико-химических условиях, к которым бактерии могут адаптироваться. Разные способы приготовления кормов для сельскохозяйственной птицы предусматривают использование высокотемпературных режимов обработки, при которой микробная обсеменённость снижается. Однако на этапе охлаждения кормовой смеси, за счёт увеличения влажности, повышается риск реконтаминации корма сальмонеллами, которые, возможно, могут становиться более устойчивыми к воздействию высоких температур.

После проведения исследования на термочувствительность нами была осуществлена оценка интенсивности роста *Salmonella reading*, полученной с пуха из выводного шкафа, инкубационного яйца, локтевой части крыла, а также из внутренних органов (содержимое слепых кишок, селезенка и содержимое желточного мешка) на дифференциально-диагностической среде Эндо и селективно-накопительной среде RVS.

Рост сальмонелл после термоинактивации на агаре Эндо сопровождался появлением бледно-розовых колоний. Рост сальмонелл в жидкой среде RVS вызывал ее помутнение. Было выяснено, что протестированные культуры сальмонелл (см. табл. 1), предварительно инкубированные при температуре 25 °C, прекращали рост на среде Эндо после 5-минутного прогрева при температуре 49,08±0,80 °C.

Наибольший интерес представляет факт значительного повышения термотолерантности сальмонелл после предварительного 40-минутного прогрева при 42 °C. Культуры сальмонелл после предварительной инкубации выживали при нагреве в течение 5 мин до температуры 53,51±2,00 °C (табл. 2), тогда как микроорганизмы, инкубированные при температуре 25 °C, прекращали рост при 49,08±2,07 °C. Различия были статистически значимыми по Манну-Уитни (P<0,01).

Нагрев культур сальмонелл в течение 3 мин независимо от температуры предварительной инкубации обеспечивал прекращение их роста при температуре 52,6±0,00 °C (P>0,05).

Нагрев в течение 10 с сальмонелл, предварительно культивируемых только при комнатной температуре, показал их инактивацию при температуре $62,80 \pm 1,86$ °C. Предварительный прогрев сальмонелл до температуры тела кур сопровождался статистически значимым повышением минимальной температуры термоинактивации до $67,7$ °C ($P < 0,05$) (см. табл. 2).

Таблица 2

Средние значения по времени инактивации *Salmonella reading* ($M \pm SD$)

Режим термоинактивации (время)	Температура предварительной инкубации	
	25 °C	42 °C
5 мин	$49,08 \pm 2,07$	$53,51 \pm 2,00^{**}$
3 мин	$52,60 \pm 0,00$	$52,60 \pm 0,00$
10 с	$62,80 \pm 1,86$	$67,70 \pm 4,96^{*}$

* Различия в зоне неопределенности ($P < 0,05$), ** различия существенны ($P < 0,01$).

Действие неблагоприятных факторов на микробные клетки приводит к активности соединений, наиболее известными из которых являются белки теплового шока, появляющиеся под воздействием высокой температуры. У патогенных микроорганизмов они могут действовать как факторы вирулентности, выполняют роль шаперонов, блокируя образование третичной и четвертичной структуры вновь синтезируемых белков. Эти протеины участвуют в формировании правильной трехмерной конформации вновь синтезированных полипептидов, поддерживают функциональную активность внутриклеточных белков и элиминацию поврежденных белковых форм, а также обеспечивают транспорт протеинов через клеточные мембраны, процессы ассоциации-диссоциации внутриклеточных надмолекулярных комплексов, защиту белков от агрегации. Кроме этого, белки теплового шока обладают анти- и проапоптотической функцией.

Можно предположить, что белки теплового шока позволяют сальмонеллам после предварительной инкубации сохранять рост при нагреве в течение 5 мин до температуры $53,51 \pm 2,00$ °C.

Учитывая вышеизложенное, возможно предположить, что при изготовлении кормов создаются условия, сопровождающиеся действием высоких температур на микроорганизмы, в результате чего повышается дальнейшая их устойчивость к подобному влиянию.

Как следует из графика (рисунок), сокращение длительности нагрева может резко повысить термотолерантность сальмонелл (по результатам экстраполяции на основании формулы, отраженной в диаграмме), до значений, близких, например, к температуре грануляции кормов.

Сравнительный анализ динамических рядов, описывающих зависимость между термотолерантностью и предварительным нагревом культур сальмонелл до температуры тела птицы (42 °С) по методу Вилкоксона (вычисление парного критерия Т), позволяет говорить об увеличении термотолерантности сальмонелл после предварительного нагрева при широком диапазоне времени экспозиции ($T_{\text{эмп}} < T_{\text{кр}}$, $P < 0,01$).

Полученные данные позволяют предполагать, что сокращение экспозиции нагрева должно усиливать негативное влияние предварительного нагрева сальмонелл, на термотолерантность.

По данным П. Сурай, Т.И. Фотиной «...корм является одним из основных поставщиков сальмонеллы в пищевую цепь. Если кормовая масса представляет собой продукт переработки растительного сырья, то в неё в значительной мере переходит эпифитная микрофлора сырья, а также микроорганизмы, находящиеся на оборудовании для переработки, в цехах, складских помещениях. При этом сальмонелла очень часто обнаруживается в комбикормах, даже в тех, которые подверглись термической обработке. Сальмонеллы в кормах могут быть защищены жиром и при этом могут вызывать инфекцию при попадании в организм в маленьком количестве. При этом инфекционная доза сальмонелл может быть очень низкой, если организм находится в условиях стресса. Например, у молодняка птиц инфекционная доза сальмонеллы может составлять менее одной колонии на 1 г корма. Существует тесная связь между контаминацией кормовых ингредиентов или же комбикормовых заводов сальмонеллой и инфекцией с теми же самыми серовариантами у цыплят, индеек, поросят и КРС...» [15].

Возможное содержание сальмонелл в кормовых составляющих предъявляет повышенные требования к вопросам безопасности на всех этапах технологического процесса изготовления кормов. По данным ряда авторов [9, 15, 16], термическая обработка обычно используется во время кондиционирования, гранулирования или экструдирования корма и считается эффективным способом борьбы с микробами в кормовых компонентах или комбикормах. Анализ исследований, проведённый А.К. Берг, свидетельствует о том, что «...нагревание корма до 80–85 °С на 1 минуту может уничтожить сальмонеллу. При этом этот процесс зависит от уровня контаминации и выбранной температуры. Тепловая обработка более чем на 30 секунд до 75 °С позволяет сократить заражение сальмонеллой до 3 log...» [17].

Большая теплоемкость технологического оборудования подразумевает медленный нагрев, в том числе нагрев до температур, не подавляющих метаболизм сальмонелл, что может активировать их защитные механизмы. Повышение скорости нагрева технологического оборудования создает предпосылки для снижения максимальной температуры нагрева, а значит, уменьшает риски высушивания остатков кормовых масс и понижает их теплопроводность (за счет которой также может увеличиться выживаемость сальмонелл).

Наибольшую проблему представляет относительно низкая теплопроводность сухого корма, налипшего на шнеки, что обеспечивает теплоперенос в основном за счет инфракрасного излучения с нагретого металла. Представляется перспективной стерилизация линий кормораздачи нагретым паром ввиду его высокой теплопроводности и текучести с последующей сушкой горячим воздухом (что будет экономичнее в сравнении с электронагревом, если использовать природный газ в качестве источника энергии).

На основании полученных данных можно сделать следующие выводы.

1. Сальмонеллы, попавшие в организм птицы (голубей, кур) с температурой выше 40 °С, активируют собственные механизмы адаптации к тепловому шоку, что может способствовать их выживанию при температурной инактивации кормов.

2. После 5-минутного прогрева в термостате рост культур *Salmonella reading*, предварительно культивированных при комнатной температуре 25 °С, прекращался при температуре 49,08±0,80 °С, а культур, предварительно прогретых при температуре 42 °С, – при 53,51±2,00 °С.

3. Нагрев культур *Salmonella reading* в течение 3 мин прекращал рост микроорганизмов при 52,6±0,00 °С независимо от температуры их инкубации.

4. Культуры *Salmonella reading*, предварительно проинкубированные при комнатной температуре 25 °С, при нагреве в течение 10 с прекращали рост при температурах выше 62,80±1,86 °С.

5. У культур *Salmonella reading*, предварительно прогретых при температуре 42 °С, температура инаktivации после 10-секундного температурного воздействия составила 67,70±4,96 °С.

6. Сокращение длительности нагрева может резко повысить термотолерантность *Salmonella reading*.

Работа выполнена при частичной поддержке ПФНИ ГАН (2013–2020), VI.55.1.1 «Биология бактериально-вирусных сообществ» (2017–2020 гг.).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Рождественская Т.Н., Яковлев С.С., Кононенко Е.В. Профилактика сальмонеллеза птиц // Farm Animals. – 2012. – № 1. – С. 54–56.
2. Шубин Ф.Н., Соловьева А.С., Радкевич М.А. Динамика заболеваемости населения Приморского края на фоне начального этапа вакцинации кур против сальмонеллеза на бройлерной птицефабрике // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2017. – № 5 (72). – С. 5–10.
3. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования к безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов: утв. Гл. гос. сан. врачом РФ 06.11.2001.
4. World Health organization (WHO). Control of Salmonellosis // Part Played by Veterinary Science and Nutrition Hygiene. – 11–12 June 1991. – Geneva, Switzerland: WHO, 1991. – (WHO/CDD/SER/91.14) – P. 436–437.
5. Лаптев Г.Ю., Йылдырым Е.А., Ильина Л.А. Здоровый микробиом кур // Ценовик. Сельскохозяйственное обозрение. – 2018. – № 8. – С. 44–52.
6. Профилактика сальмонеллеза при выращивании и переработке птицы / А.Н. Панин, А.В. Куликовский, А.Д. Давлеев, П.П. Сорокин // Птица и птицепродукты. – 2010. – № 6. – С. 37–41.
7. Зараженность сальмонеллами продукции птицеводства / Е.О. Чугунова, Н.А. Татарникова, Т.С. Прохорова, О.Г. Мауль / [Электронный ресурс] // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 6. – Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=15850> (дата обращения: 10.03.2021).
8. Плотникова Е.М. Индикация факторов вирулентности энтеробактерий, дифференциальная диагностика эшерихиоза птиц: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – М., 2014. – 24 с.
9. Соболева О.М., Колосова М.М., Филипович Л.А. Микробиологическая контаминация кормов и электрофизический метод ее снижения // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32, № 12. – С. 50–52.
10. Пименов Н.В., Лашиевцев А.И. Современные методы эпизоотического и эпидемиологического мониторинга в птицеводческой отрасли на примере сальмонеллезной инфекции // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. – № 64. – С. 257–269.
11. Кулаева О.Н. Белки теплового шока и устойчивость растений к стрессу // Соросовский образовательный журнал. – 1997. – № 2. – С. 5–13.
12. Кайгородова Е.В. Молекулярные механизмы регуляторного влияния белков теплового шока на апоптоз опухолевых клеток: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Томск, 2012. – С. 3.
13. Arya R., Mallik M., Lakhota S.C. Heat shock genes integrating cell survival and death // J. Biosci. – 2007. – Vol. 32, N 3. – P. 595–610.

14. Баснакьян И.А. Стресс у бактерий. – М.: Медицина, 2003. – 136 с.
15. Сурай П., Фотина Т.И. Сальмонелла в пищевой цепи – есть ли свет в конце тоннеля? [Электронный ресурс] // Безопасность кормов. – Режим доступа: <http://agro.press/storage/journal/76/parts/1027/893f19ba9b67c0ca4fa4907196e95189.pdf> (дата обращения: 10.03.2021).
16. Соболева О.М., Колосова М.М., Филипович Л.А. Микробиологическая контаминация кормов и электрофизический метод ее снижения // Достижения науки и техники АПК. – 2018. – Т. 32, № 12. – С. 50–52.
17. Берг А.К. Борьба с патогенными микроорганизмами в кормах: новая эффективная возможность сохранить безопасность кормов и продуктов [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.dairynews.ru/news/borba-s-patogennymi-mikroorganizmami-v-kormakh-nov.html> (дата обращения: 21.03.2021).

REFERENCES

1. Rozhdestvenskaya T.N., Yakovlev S.S., Kononenko E.V., *Farm Animals*, 2012, No. 1, pp. 54–56. (In Russ.)
2. Shubin F.N., Solov'eva A.S., Radkevich M.A., *Zdorov'e. Medicinskaya ekologiya. Nauka*, 2017, No. 5 (72), pp. 5–10. (In Russ.)
3. *SanPiN 2.3.2.1078-01*, November 06, 2001.
4. World Health organization (WHO). Control of Salmonellosis, *Part Played by Veterinary Science and Nutrition Hygiene*, 11–12 June, 1991, Geneva, Switzerland: WHO, 1991, (WHO/CDD/SER/91.14), P. 436–437.
5. Laptev G.Yu., Jyldyrym E.A., Il'ina L.A., *Cenovik*. 2018, No. 8, pp. 44–52. (In Russ.)
6. Panin A.N., Kulikovskij A.V., Davleev A.D., Sorokin P.P., *Ptica i pticeprodukty*, 2010, No. 6, pp. 37–41. (In Russ.)
7. <https://science-education.ru/ru/article/view?id=15850> (March 10, 2021)
8. Plotnikova E.M. *Indikatsiya faktorov virulentnosti enterobakterij, differencial'naya diagnostika esherihiozaptic* (Indication of enterobacteria virulence factors, differential diagnosis of avian escherichiosis), Extended abstract of candidate's thesis, Moscow, 2014, 24 p. (In Russ.)
9. Soboleva O.M., Kolosova M.M., Filipovich L.A., *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2018, Vol. 32, No. 12, pp. 50–52. (In Russ.)
10. Pimenov N.V., Laishevcev A.I., *Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences*, 2017, No. 64, pp. 257–269. (In Russ.)
11. Kulaeva O.N. Belki teplovogo shoka i ustojchivost' rastenij k stressu // *Sorosovskij obrazovatel'nyj zhurnal*, 1997, No. 2, pp. 5–13. (In Russ.)
12. Kajgorodova E.V. *Molekulyarnye mekhanizmy reguljatornogo vliyaniya belkov teplovogo shoka na apoptoz opuholevyh kletok* (Molecular mechanisms of the regulatory effect of heat shock proteins on tumor cell apoptosis), Extended abstract of Doctor's thesis, Tomsk, 2012, p. 3. (In Russ.)
13. Arya R., Mallik M., Lakhota S.C., Heat shock genes integrating cell survival and death, *J. Biosci*, 2007, Vol. 32, No. 3, P. 595–610.
14. Basnak'yan I.A. *Stress u bakterij* (Stress in bacteria), Moscow, Medicina, 2003, 136 p.
15. Suraj P., Fotina T.I., *Bezopasnost' kormov*, <http://agro.press/storage/journal/76/parts/1027/893f19ba9b67c0ca4fa4907196e95189.pdf> (March 10, 2021)
16. Soboleva O.M., Kolosova M.M., Filipovich L.A., *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2018, Vol. 32, No. 12, pp. 50–52. (In Russ.)
17. Berg A.K. Bor'ba s patogennymi mikroorganizmami v kormah: novaya effektivnaya vozmozhnost' sohranit' bezopasnost' kormov i produktov, <https://www.dairynews.ru/news/borba-s-patogennymi-mikroorganizmami-v-kormakh-nov.html> (March 21, 2021)