



УДК 57.083.134+616.9

<https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.37.31>

## Подбор питательной основы и экспериментальная оценка качества бактериологической питательной среды для культивирования листерий

Н. Г. Гефан, С. В. Лукьянова, Н. М. Хаптанова, В. И. Кузнецов,  
Ж. А. Коновалова, Н. М. Андреевская, А. С. Остяк, Е. Ю. Киселева,  
В. С. Косилко

*Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора,  
г. Иркутск, Россия*

*E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru*

**Аннотация.** Разработана питательная среда для культивирования и накопления бактериальной массы *Listeria monocytogenes* 766, которая использовалась в качестве иммуногена при получении диагностической агглютинирующей листериозной сыворотки. Оценены перспективы использования ряда видов морских и пресноводных рыб и беспозвоночных в качестве исходного сырья для панкреатических гидролизатов. На основе данных ЯМР-спектроскопии определён аминокислотный состав гидролизатов. Выявлен оптимальный по показателям содержания аминного азота и стабильности кислотных свойств тип сырья, используемый в качестве основы для питательной среды, установлены оптимальные условия культивирования листерий.

**Ключевые слова:** *Listeria monocytogenes*, гидролизаты, культивирование микроорганизмов, питательная среда, сыворотка.

**Для цитирования:** Подбор питательной основы и экспериментальная оценка качества бактериологической питательной среды для культивирования листерий / Н. Г. Гефан, С. В. Лукьянова, Н. М. Хаптанова, В. И. Кузнецов, Ж. А. Коновалова, Н. М. Андреевская, А. С. Остяк, Е. Ю. Киселева, В. С. Косилко // Известия Иркутского государственного университета. Серия Биология. Экология. 2021. Т. 37. С. 31–42. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.37.31>

### **Введение**

Изучению листериоза, вызываемого грамположительными бактериями *Listeria monocytogenes*, уделяется внимание в связи с его возрастающей ролью в перинатальной и неонатальной патологии, тяжестью клинического течения и высокой (до 30 %) летальностью инфекции. В связи с этим важно своевременно выявить источник инфекции и начать специфическое лечение [Тартаковский, Малеев, Ермолаева, 2002; Диагностика листериоза, 2006; Ибрагимова, 2016; Листерии и листериоз, 2016].

В настоящее время для идентификации возбудителя листериоза наряду с бактериологическими методами дополнительно используют и серологические, которые позволяют в короткие сроки выявить патогенные микроорганизмы в исследуемом материале и, следовательно, своевременно установить

диагноз [Тартаковский, 2000; Листерии и листериоз, 2016; Особенности серологической ... , 2019].

При производстве агглютинирующей листериозной сыворотки большое значение имеет подбор оптимальной питательной среды для культивирования и накопления бактериальной массы *L. monocytogenes*. Сухие коммерческие питательные среды для выделения и культивирования листерий, выпускаемые в Российской Федерации и за рубежом, содержат в своем составе селективные компоненты (хлористый литий и т. д.), не только подавляющие рост посторонней микрофлоры, но и значительно замедляющие рост листерий [Поляк, Сухаревич, Сухаревич, 2008]. Поэтому актуальным направлением микробиологической науки является конструирование питательной среды, которая может использоваться для накопления бактериальной массы листерий при производстве агглютинирующих листериозных сывороток.

При выборе субстрата необходимо учитывать питательные потребности и процессы метаболизма культивируемых микроорганизмов. Известно, что аминокислотный состав микробной массы *L. monocytogenes* включает около 20 аминокислот [Таксономия и различия ... , 2017]. Наиболее важными для роста листерий и стимулирующими его являются аминокислоты лейцин, изолейцин, аргинин, глутамин, метионин, валин и гистидин. Помимо перечисленных, питательная среда для культивирования листерий должна содержать также триптофан, лизин, фенилаланин, глицин, аланин, треонин, аспарагиновую кислоту [Питание и метаболизм ... , 2016]. По данным других исследований, потребность изученных штаммов *L. monocytogenes* в гистидине, триптофане и аспарагине не обнаружена [Siddiqi, Khan, 1989; Premaratne, Hin, Johnson, 1991].

Цель настоящего исследования – сравнительная оценка панкреатических гидролизатов, полученных из рыбы и кальмаров, изучение биологических показателей экспериментальной питательной среды для культивирования и накопления микробной массы листерий.

### **Материалы и методы**

Для получения панкреатических гидролизатов (ПГ) в качестве исходного сырья использовали морскую рыбу – сельдь *Clupea pallasii* (1), минтай *Gadus chalcogrammus* (2); пресноводную рыбу – плотву *Rutilus rutilus* (3); морепродукты – кальмара *Loligo vulgaris* (4). Источником протеолитических ферментов служила поджелудочная железа крупного рогатого скота в соотношении фермент/субстрат 1:10. В процессе приготовления гидролизата смешивали фарш из исходного сырья, бульон и измельчённую поджелудочную железу. Гидролиз проводили реакторным способом при периодическом перемешивании и автоматической коррекции температуры  $45 \pm 2$  °С [Дятлов, Кутырев, Храмов, 2012]. Для консервации добавляли до 1 % хлороформа от общего объема гидролизата. На протяжении всего процесса гидролиза осуществляли контроль физико-химических показателей: содержание аминного азота методом формольного титрования и водородный показатель (рН). Да-

лее гидролизат фильтровали и высушивали в сублимационной установке LZ-9CP (Frigea, Чехия) в течение  $42 \pm 2$  ч.

Определение качественного состава ПГ проводили на основе данных спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР-спектроскопии). Для определения аминокислотного состава проводили двумерные (2М) ЯМР  $^1\text{H}$  эксперименты с применением методов COSY и TOCSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  НМВС и  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC для отнесения сигналов в спектрах ЯМР  $^{13}\text{C}$ . Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  (400,1 МГц),  $^{13}\text{C}$  (100,6 МГц),  $^{15}\text{N}$  (40,5 МГц) записывали на спектрометрах DPX400 ( $^{13}\text{C}$ ) и AV400 ( $^1\text{H}$  и 2М) (оба Bruker Optik GmbH, Германия) без использования дейтерированных растворителей. Экспериментами  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  НМВС определяли характерные химические сдвиги свободных  $\text{NH}_2$ -групп [Сильверстейн, Вебстер, Кимл, 2011].

На основе лиофилизированных панкреатических гидролизатов сконструированы четыре варианта плотной питательной среды.

Специфическую активность питательных сред (показатель прорастания, чувствительность и эффективность среды, скорость роста, культурально-морфологические, биохимические и серологические свойства микроорганизма) оценивали с применением комплекса микробиологических методов в соответствии с МУК 4.2.2316-08<sup>1</sup> при культивировании тест-штамма *L. monocytogenes* 766 (коллекция патогенных бактерий Иркутского НИПЧИ Роспотребнадзора). Культуру тест-штамма *L. monocytogenes* 766 высевали на мясо-пептонный бульон с 1%-ной глюкозой (пассаж I), затем на мясо-пептонный агар (МПА) с 1%-ной глюкозой (ГОСТ-10444.1<sup>2</sup>, п. 5.12) (пассаж II). Далее по общепринятой методике готовили взвесь культуры, 10-кратно титровали и засевали по 0,1 мл из разведений  $10^{-6}$  и  $10^{-7}$  по три повторности на чашки Петри с питательными средами. Посевы инкубировали в течение 48 ч при  $37 \pm 1$  °С.

При изучении биологических свойств СКЛ контролем служили питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар) (ГНЦ ПМБ, Россия) – контроль 1 и МПА с 1%-ной глюкозой – контроль 2.

Определение биохимических свойств тест-штамма *L. monocytogenes* 766 проводили по ГОСТ 32031-2012<sup>3</sup> и Берджи [Хоулт, Криг, Снит, 1997] с использованием жидких сред Гисса (ГОСТ-10444.1), а также коммерческих сред: агар для идентификации листерий PALCAM (HiMedia, Индия) и полужидкой среды Гисса с индикатором ВР, с маннитом («Биотехновация», Россия).

Способность экспериментальной среды сохранять биологические свойства тест-штамма *L. monocytogenes* 766 в течение 12 мес. изучали при посеве культуры тест-штамма в пробирки на СКЛ, ГРМ-агар, МПА с 1%-ной глюкозой. Для этого посевы после инкубации при  $37 \pm 1$  °С в течение 48 ч поме-

<sup>1</sup> МУК 4.2.2316-08. Методы контроля бактериологических питательных сред : метод. указания. М., 2008. 67 с.

<sup>2</sup> ГОСТ 10444.1-84. Консервы. Приготовление растворов реактивов, красок, индикаторов и питательных сред, применяемых в микробиологическом анализе. М., 2010. 228 с.

<sup>3</sup> ГОСТ 32031-2012. Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*. М., 2014. 26 с.

щали в холодильник и хранили при температуре  $4\pm 1$  °С. Оценку результатов проводили через 3, 6, 9 и 12 мес. хранения. Эффективность оценивали по выходу микробных клеток с 1 мл питательной среды (в млрд м. к./мл).

Полученные в ходе экспериментов данные обрабатывали статистическими методами с определением средней величины  $M$  и ошибки средней арифметической  $m$ . Для переменных, имеющих распределение, близкое к нормальному, применяли критерий параметрической статистики Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

### ***Результаты и обсуждение***

В процессе приготовления панкреатических гидролизатов потеря в массе исходного сырья составила 56 % у кальмаров и 26–38 % у всех видов рыб.

Определяющим процессом в ходе ферментативного гидролиза является накопление низкомолекулярных продуктов белковой деградации, оценку которого можно провести по степени накопления свободных аминокрупп и аминокислот (аминного азота) в полученном продукте.

Динамику ферментативного процесса определяли по нарастанию аминного азота. Полученные данные представлены на рис., а.

Во всех полученных гидролизатах наблюдалось увеличение содержания аминного азота в течение 13 сут. (в среднем до  $570\pm 20$  мг%), что свидетельствует о высокой степени расщепления белка до аминокислот и пептидов. Прекращение нарастания аминного азота свидетельствует об окончании ферментативного процесса.

Наибольшее содержание аминного азота в конце ферментативного гидролиза выявлено в гидролизате плотвы –  $600\pm 10$  мг%. Также установлено, что этот показатель в гидролизате плотвы оставался стабильным с 6-х до 13-х сут. процесса гидролиза, что свидетельствует о более быстрой фазе гидролиза в этом образце. Наименьшие показания аминного азота отмечены в гидролизате минтая ( $540\pm 10$  мг%). Во всех образцах степень гидролиза увеличивалась в течение первых трёх (в среднем на  $90\pm 20$  мг%) и на 6-е сут. ( $120\pm 20$  мг%) по сравнению с первыми сутками ферментализации, а затем отмечалась стабилизация значений степени гидролиза (в среднем увеличение на 20 %) (рис., а).

Отмечено, что в гидролизате плотвы значения рН, как и аминного азота оставалось стабильным с 6- до 13-х сут. процесса гидролиза (рН 7,2). В гидролизате сельди значения рН с 6-х по 13-е сут. были близки к нейтральным значениям, а в гидролизатах кальмара и минтая после 3 сут. гидролиза – приближались к слабощелочным (от 7,4 до 7,7), что, вероятнее всего, связано с особенностями исходного сырья (рис., б).

В ходе определения качественного состава ПГ методом ЯМР-спектроскопии выявлено, что питательные основы содержат такие свободные аминокислоты, как аланин, валин, треонин, аргинин, лизин, лейцин, метионин, фенилаланин, глицин, которые являются наиболее важными для роста листерий и стимулирующими его. Доля гистидина, тирозина, триптофана составляет 5 %.

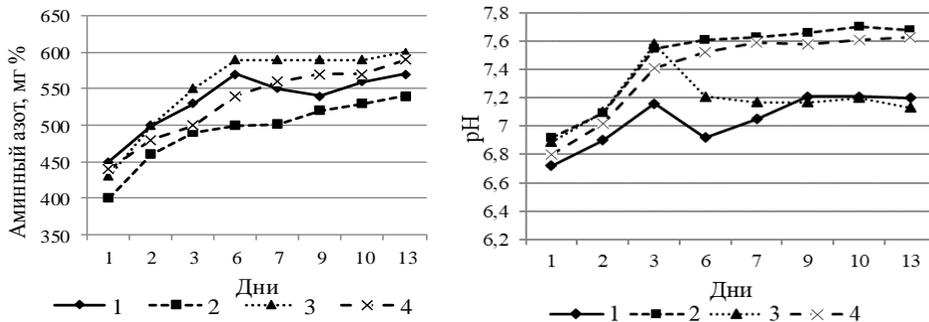


Рис. Изменение содержания аминного азота (а) и значения рН (б) в панкреатических гидролизатах рыб и кальмара. 1 – сельдь (*Clupea pallasii*), 2 – минтай (*Gadus chalcogrammus*), 3 – плотва (*Rutilus rutilus*), 4 – кальмар (*Loligo vulgaris*)

На следующем этапе эксперимента из полученных лиофилизированных гидролизатов сконструированы четыре варианта плотных питательных сред, изучены их ростовые свойства. В первом (сельдь) и третьем (плотва) вариантах питательных сред через 24 ч инкубации тест-штамма *L. monocytogenes* 766 отмечали типичный рост колоний, достаточный для визуального подсчета ( $d = 1-1,5$  мм), у второго (минтай) и четвертого (кальмар) вариантов наблюдали типичный рост культуры только через 48 ч инкубации. Данные о количестве, диаметре и морфологии колоний *L. monocytogenes* 766 через 48 ч инкубации при  $37 \pm 1$  °С, показывают, что по количеству выросших колоний изучаемые среды (1, 2 и 4-я) отличались между собой незначительно (в среднем  $99,7 \pm 1,7$  %), за исключением питательной среды, включающей гидролизат плотвы ( $112,0 \pm 1,6$  %), который превосходил другие питательные среды ( $p > 0,05$ ). Также наблюдалось увеличение размера колоний листерий ( $d = 3,0-4,0$  мм) по сравнению с другими питательными средами ( $d = 2,0-3,5$  мм).

По результатам наших исследований в качестве питательной основы при конструировании СКЛ выбрали панкреатический гидролизат плотвы, разработали питательную среду для культивирования и накопления бактериальной массы листерий, провели оценку её физико-химических и биологических свойств [Конструирование питательной среды, 2020]. Установлено, что через 24 ч инкубации при температуре  $37 \pm 1$  °С питательная среда СКЛ обеспечивала рост типичных колоний листерий. Показатель прорастания составлял 85 %, что выше по сравнению с ростом культуры на МПА с 1%-ной глюкозой и ГРМ-агаре в среднем на 21 % ( $p < 0,05$ ). Эффективность испытуемой питательной среды была выше по сравнению с ГРМ-агаром и МПА с 1%-ной глюкозой в 1,3 и 2,2 раза соответственно ( $p < 0,05$ ) и составляла 5,5 млрд м. к./мл питательной среды.

Для более полной характеристики СКЛ проведена оценка способности экспериментальной среды сохранять биологические свойства тест-штамма *L. monocytogenes* 766 при длительном хранении на плотных питательных

средах. В качестве контрольных сред использовали ГРМ-агар и МПА с 1%-ной глюкозой.

В результате опытов установлено, что минимальное время инкубации (скорость роста) на питательных средах после пересева со сред хранения через 3 мес. составило 24 ч только в случае СКЛ и ГРМ-агара, через 6 мес. только на СКЛ, затем время роста культуры увеличивалось и через 12 мес. на средах СКЛ и ГРМ-агар скорость роста составляла 48 ч, а на МПА с 1%-ной глюкозой рост отсутствовал (табл.).

Таблица

Биологические характеристики тест-штамма *L. monocytogenes* 766 в зависимости от сроков хранения на различных питательных средах при  $4 \pm 1$  °C,  $M \pm m$

Наименование среды	Срок хранения, мес.	Показатель прорастания колоний, %	Чувствительность, КОЕ	Культуральные признаки тест-штамма <i>L. monocytogenes</i> 766	Скорость роста, ч
		$10^{-6}$	$10^{-7}$		
СКЛ	3	105,7±2,4*	15,0±1,8**	S-форма; $d = 1,1-1,5$	24
	6	101,7±4,4*	13,0±1,8*	S-форма; $d = 1,5-2,0$	24
	9	–	–	Росинчатый рост; $d = 0,5-0,8$	36
		50,3±1,5*	7,0±0,6*	S-форма; $d = 1,8-2,0$	48
	12	–	–	Росинчатый рост; $d = 0,5-0,8$	24
		47,7±1,5	6,0±0,6	S-форма; $d = 1,8-2,0$	48
ГРМ-агар	3	65,0±2,9	11,7±0,9	S-форма; $d = 0,5-1,5$	24
	6	61,7±1,7	6,0±0,6	S-форма; $d = 0,5-1,5$	36
	9	43,3±1,7	3,6±0,9	R-форма; $d = 1,0-1,2$	36
	12		R-форма; $d = 2,5-3,0$	48	
МПА с 1%-ной глюкозой	3	92,6±1,5	8,3±0,5	S-форма; $d = 2,0-2,2$	36
	6	81,7±1,7	7,7±0,5	S-форма; $d = 1,8-2,0$	48
	9	45,3±0,8	3,0±0,6	S-форма; $d = 0,8-1,1$	48
	12	Нет роста	Нет роста	Нет роста	–

Примечание:  $d$  – диаметр колоний, мм; «–» – подсчёт колоний не проводился при  $d < 1$ ; \* –  $p < 0,05$  при сравнении с показателем в контроле 1 (ГРМ-агар) и 2 (МПА с 1%-ной глюкозой); \*\* –  $p < 0,05$  при сравнении с показателем в контроле 2.

Экспериментальная среда СКЛ после 3–9 мес. хранения на ней микроорганизма по показателю прорастания колоний превосходила значения контрольных сред ( $p < 0,05$ ), а также обладала высокой чувствительностью ( $10^{-7}$ ), поскольку позволяла обнаружить рост колоний при посеве единичных микробных клеток. При посеве культуры *L. monocytogenes* 766 из разведения  $10^{-7}$  на всех засеянных чашках выросло в среднем  $10,25 \pm 1,2$  бесцветных прозрачных круглых колоний во все сроки наблюдения, что превышало значения контрольных сред после 3 мес. ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем 2), а также после 6 и 9 мес. ( $p < 0,05$  по сравнению с контролем 1 и 2). При определении морфологии листерий в мазках отмечались типичные характерные мелкие грамположительные палочки.

Культура листериозного микроба, выращенная на плотных питательных средах, после длительного хранения изменилась по культурально-

морфологическим свойствам. Установлено, что после 3 и 6 мес. хранения на всех средах, взятых в опыт, колонии тест-штамма *L. monocytogenes* 766 вырастали в S-форме. После 9 мес. S-форму сохраняли листерии только на средах СКЛ и МПА с 1%-ной глюкозой. На среде ГРМ-агар наблюдалась диссоциация культуры в R-форму. После 9 и 12 мес. хранения культуры листерий только питательная среда СКЛ обеспечивала при посеве тест-штамма *L. monocytogenes* 766 из разведения  $10^{-7}$  на всех засеянных чашках рост не менее пяти колоний типичной S-формы. На МПА с 1%-ной глюкозой после 9 мес. число колоний составляло  $3,0 \pm 0,6$ , а после 12 мес. рост отсутствовал (см. табл.).

Эффективность питательных сред через 3 и 6 мес. составила: для СКЛ 5,1 млрд м.к./мл среды; для ГРМ-агара 2,1 млрд м.к./мл среды и 4,5 млрд м.к./мл среды для МПА с 1%-ной глюкозой; через 9 мес. эффективность испытуемых сред незначительно снизилась и составила: для СКЛ 4,5 млрд м.к./мл среды; для ГРМ-агара 1,7 млрд м.к./мл среды и 3,5 млрд м.к./мл среды для МПА с 1%-ной глюкозой.

В течение всего срока наблюдения штамм *L. monocytogenes* 766 сохранял свои типичные биохимические свойства по способности ферментировать маннозу, мальтозу, глюкозу и отсутствию способности ферментировать ксилозу, маннит и дульцит при культивировании на всех питательных средах. В течение всего срока наблюдался и положительный каталазный тест.

Оценка биологических показателей тест-штамма после хранения на различных питательных средах свидетельствует, что сконструированная питательная среда для культивирования листерий имеет преимущество в сравнении с МПА с 1%-ной глюкозой, ГРМ-агаром и пригодна для длительного хранения тест-штамма *L. monocytogenes* 766. Тест-штамм *L. monocytogenes* 766, выращенный на СКЛ, обладал всеми типичными для листерий свойствами, не диссоциировал, давал положительную реакцию агглютинации с листериозной сывороткой.

### **Заключение**

В ходе проведённых исследований установлено, что высокие ростовые показатели экспериментальной СКЛ достигнуты за счёт сочетанного использования оптимальных концентраций питательной основы и компонентов, стимулирующих рост листерий, что в совокупности обеспечивает значительное накопление бактериальной массы микроорганизма в минимальные сроки. В последующих этапах работы данная питательная среда использовалась для получения иммуногена при производстве листериозной сыворотки. Полученные данные подтвердили способность экспериментальной среды в течение 12 мес. сохранять биологические свойства тест-штамма *L. monocytogenes* 766.

### **Список литературы**

Диагностика листериоза / Г. В. Гальцева, Л. М. Федоренко, В. Б. Инжеватова, Е. Е. Буланова // Успехи современного естествознания. 2006. № 1. С. 52–53. URL: <http://natural-sciences.ru/ru/article/view?id=14133> (дата обращения: 22.01.2021).

Дятлов И. А., Кутырев В. В., Храмов М. В. Питательные среды для выделения, культивирования и идентификации возбудителей особо опасных инфекций бактериальной природы. М., 2012. 415 с.

Ибрагимова М. А. Современные аспекты листериозной инфекции // Вестник Алма-тинского государственного института усовершенствования врачей. 2016. № 1. С. 84–91.

Конструирование питательной среды для культивирования листерий / Н. М. Хаптанова, С. В. Лукьянова, В. И. Кузнецов, Н. Г. Гефан, Н. М. Андреевская, Ж. А. Коновалова, А. С. Остяк, В. С. Косилко // Acta Biomedica Scientifica. 2020. Т. 5, № 4. С. 60–66. <https://doi.org/10.29413/ABS.2020-5.4.8>

Листерии и листериоз / И. А. Бакулов, Д. А. Васильев, Н. Е. Ковалева, И. Ю. Егорова, Ю. О. Селянинов. Ульяновск : Изд-во Ульян. гос. сельхоз. акад., 2016. 334 с. URL: <http://lib.ugsha.ru:8080/handle/123456789/2668>

Особенности серологической диагностики листериоза (обзор литературы) / Н. М. Хаптанова, Н. М. Андреевская, С. В. Лукьянова, Ж. А. Коновалова, Н. Г. Гефан, А. С. Остяк, Е. Г. Токмакова // Acta Biomedica Scientifica. 2019. Т. 1, № 103. С. 43–49. <https://doi.org/10.29413/ABS.2019-4.1.7>

Питание и метаболизм патогенных микроорганизмов / Л. Я. Телишевская, Н. К. Букова, А. А. Комаров, В. Т. Ночевный. М. : Научная библиотека, 2016. 155 с.

Поляк М. С., Сухаревич В. И., Сухаревич М. Э. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. СПб. : ЭЛБИ-СПб., 2008. 352 с.

Сильверштейн Р., Вебстер Р., Кимл Д. Спектрометрическая идентификация органических соединений, М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 557 с.

Таксономия и различия в химических свойствах *Listeria monocytogenes* и *Erysipelothrix rhusiopathiae* / Л. Я. Телишевская, А. В. Сорокин, Л. Г. Цатурян, О. Д. Скляр, А. А. Комаров // Ветеринарная патология. 2017. Т. 1, № 59. С. 40–48.

Тартаковский И. С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т. 2, № 2. С. 20–30.

Тартаковский И. С., Малеев В. В., Ермолаева С. А. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. М. : Медицина для всех, 2002. 200 с.

Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. Определитель бактерий Берджи : в 2 т. М. : Мир, 1997. Т. 1. 429 с.

Premaratne R. J., Hin W., Johnson E. A. Development of an improved chemical defined minimal medium for *Listeria monocytogenes* // Appl. Environ. Microbiol. 1991. Vol. 57, N 10. P. 3046–3048. <https://doi.org/10.1128/AEM.57.10.3046-3048.1991>

Siddiqi R., Khan M. A. Amino acid requirement of six strains of *Listeria monocytogenes* // Zentralbl. Bakteriologie. 1989. Vol. 271, N 2. P. 146–152. [https://doi.org/10.1016/s0934-8840\(89\)80067-2](https://doi.org/10.1016/s0934-8840(89)80067-2)

## **Selection of the Nutrient Base and Experimental Quality Assessment of a Bacteriological Growth Medium for the Cultivation of *Listeria***

N. G. Gefan, S. V. Lukyanova, N. M. Khaptanova, V. I. Kuznetsov, Zh. A. Konovalova, N. M. Andreevskaya, A. S. Ostyak, E. Yu. Kiseleva, V. S. Kosilko

*Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation*

**Abstract.** The causative agent of listeriosis refers to pathogens when clinical diagnosis is difficult due to the polymorphism of the manifestation of the disease. In this regard, the use of ex-

press methods of laboratory diagnostics, which include the agglutination reaction, is an urgent need for rapid diagnosis and timely treatment. To obtain an experimental diagnostic listeriosis agglutinating highly specific serum, a sufficient volume of immunogen is required, the source of which is the inactivated bacterial mass of *Listeria monocytogenes* 766. The development of a bacterial nutrient medium for the cultivation of listeriosis microbe is caused by need to ensure high growth of listeria biomass in a short time. Pacific herring (*Clupea pallasii*), pollock (*Gadus chalcogrammus*), roach (*Rutilus rutilus*) and European squid (*Loligo vulgaris*) were used as raw materials for obtaining hydrolysates. Comparative physico-chemical studies of tested nutrient bases have shown that optimal basis of nutrient medium is pancreatic hydrolysate of roach, in which the maximum indicators of enzymatic process speed, the content of amine nitrogen, stable preservation of acidic properties for a long time are determined. Using the method of NMR spectroscopy, the amino acid composition of the nutrient medium for accumulation of listeria biomass was established, which is represented by alanine, valine, threonine, arginine, lysine, leucine, methionine, histidine, tyrosine and tryptophan and the amino acids phenylalanine and glycine, which are most important for the growth of listeria. It was found that nutrient medium based on pancreatic hydrolysate of roach had advantages over other bases (Pacific herring, pollock and European squid pancreatic hydrolysates) in terms of germination, sensitivity and efficiency, growth rate of the nutrient medium for listeria cultivation, while maintaining the typical listeria cultural-morphological, biochemical and serological properties. It has been established that effectiveness of experimental nutrient medium f, designed by specialists of laboratory of nutrient media of Irkutsk Anti-Plague Institute, is not inferior to such commercial medical products as GRM-agar and meat-peptone agar. Experimental results confirmed the ability of culture medium for the cultivation of listeria to preserve the biological properties of test strain *L. monocytogenes* 766 (collection of pathogenic bacteria of the Irkutsk Anti-Plague Institute) for one year. Based on the data obtained, we concluded that the high growth rates of listeria on proposed nutrient medium were achieved through use of pancreatic roach hydrolysate and components optimal concentrations that stimulate the growth of listeria, providing a significant accumulation of bacterial mass in shortest possible time.

**Keywords:** *Listeria monocytogenes*, hydrolysates, cultivation of microorganisms, nutrient medium, serum.

**For citation:** Gefan N.G., Lukyanova S.V., Khaptanova N.M., Kuznetsov V.I., Konovalova Zh.A., Andreevskaya N.M., Ostyak A.S., Kiseleva E.Yu., Kosilko V.S. Selection of the Nutrient Base and Experimental Quality Assessment of a Bacteriological Growth Medium for the Cultivation of Listeria. *The Bulletin of Irkutsk State University. Series Biology. Ecology*, 2021, vol. 37, pp. 31-42. <https://doi.org/10.26516/2073-3372.2021.37.31> (in Russian)

## References

Galceva G.V., Fedorenko L.M., Inzhevatova V.B., Bulanova E.E. Diagnostika listerioza [Diagnostics of Listeriosis]. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya* [Advances in Current Natural Sciences]. 2006, no. 1, pp. 52-53. (in Russian) URL: <http://natural-sciences.ru/ru/article/view?id=14133> (date of access: 22 Jan. 2021).

Dyatlov I.A., Kuttyrev V.V., Khramov M.V. *Pitatelnye sredy dlya vydeleniya, kul'tivirovaniya i identifikatsii vozbuditelei osobo opasnykh infektsii bakterialnoi prirody* [Growth media for the isolation, cultivation, and identification of pathogens of extremely dangerous bacterial infections]. Moscow, 2012, 415 p. (in Russian)

Ibragimova M.A. Sovremennye aspekty listerioznoi infektsii [Modern aspects of a listeria infection (review)]. *Herald of Almaty St. Inst. of Advanced Medical Education*, 2016, no. 1, pp. 84-91. (in Russian)

Khaptanova N.M., Luk'yanova S.V., Kuznetsov V.I., Gefan N.G., Andreevskaya N.M., Konovalova Zh.A., Ostyak A.S., Kosilko V.S. Konstruirovaniye pitatel'noi sredy dlya kultiviro-

vaniya listerii [Constructing of media for Listeria cultivating]. *Acta Biomedica Scientifica*, 2020, vol. 5, no. 4, pp. 60–66. (in Russian). <https://doi.org/10.29413/ABS.2020-5.4.8>

Bakulov I.A., Vasiliev D.A., Kolbasov D.V., Kovaleva E.N., Egorova I.Yu., Selyaninov Yu.O. *Listerii i listerioz* [Listeria and listeriosis]. Ulyanovsk, Ulyanovsk St. Agric. Acad. Publ., 2016, 334 p. (in Russian) URL: <http://lib.ugsha.ru:8080/handle/123456789/2668>

Khaptanova N.M., Andreevskaya N.M., Luk'yanova S.V., Konovalova Zh.A., Gefan N.G., Ostyak A.S., Tokmakova E.G. Aspects of serological diagnostics of listeriosis (overview). *Acta Biomedica Scientifica*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 43-49. (in Russian). <https://doi.org/10.29413/ABS.2019-4.1.7>

Telishhevskaya L.Ya., Bukova N.K., Komarov A.A., Nochevnyi V.T. *Pitanie i metabolismizm patogennykh mikroorganizmov* [Nutrition and metabolism of pathogenic microorganisms]. Moscow, Nauchnaya Biblioteka Publ., 2016, 155 p. (in Russian)

Polyak M.S., Sukharevich V.I., Sukharevich M.E. *Pitatelnye sredy dlya meditsinskoi i sanitarnoi mikrobiologii* [Growth media for medical microbiology]. St. Petersburg, ELBI-SPb Publ., 2008, 352 p. (in Russian)

Silverstein R., Webster R., Kiml D. *Spektrometricheskaya identifikatsiya organicheskikh soedinenii* [Spectrometric identification of organic compounds]. Moscow, BINOM. Laboratoriya Znaniy Publ., 2011, 557 p. (in Russian)

Telishhevskaya L.Ya., Sorokin A.V., Tsaturyan L.G., Sklyarov O.D., Komarov A.A. Taksonomiya i razlichiya v khimicheskikh svoystvakh Listeria monocytogenes i Erysipelotrix rhusiopathiae [Taxonomy and differences in the chemical properties of Listeria monocytogenes and Erysipelotrix rhusiopathiae]. *Veterinarnaya patologiya* [Veterinary pathology], 2017, vol. 1, no. 59, pp. 40-48. (in Russian)

Tartakovskij I.S. Listerii: rol v infektsionnoi patologii cheloveka i laboratornaya diagnostika [Listeria: role in human infectious pathology and laboratory diagnostics]. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* [Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy], 2000, vol. 2, no. 2, pp. 20-30. (in Russian)

Tartakovskij I.S., Maleev V.V., Ermolaeva S.A. *Listerii: rol v infektsionnoj patologii cheloveka i laboratornaya diagnostika* [Listeria: Role in Human Infectious Pathology and Laboratory Diagnostics]. Moscow, Medicina dlya vsekh Publ., 2002, 200 p. (in Russian)

Khoul Dzh., Krig N., Snit P. *Opredelitel' bakterii Berdzhii: v 2 tomakh* [Bergey's manual of systematic bacteriology]. Moscow, Mir Publ., 1997, vol. 1, 429 p. (in Russian)

Premaratne R.J., Hin W., Johnson E.A. Development of an improved chemical defined minimal medium for Listeria monocytogenes. *Appl. Environ. Microbiol.* 1991, vol. 57, no. 10, pp. 3046-3048. <https://doi.org/10.1128/AEM.57.10.3046-3048.1991>

Siddiqi R., Khan M. A. Amino acid requirement of six strains of Listeria monocytogenes. *Zentralbl. Bakteriol.*, 1989, vol. 271, no. 2, pp. 146-152. [https://doi.org/10.1016/s0934-8840\(89\)80067-2](https://doi.org/10.1016/s0934-8840(89)80067-2)

Гефан Наталья Геннадьевна  
кандидат медицинских наук  
заведующая отделом  
Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт  
Роспотребнадзора  
Россия, 664047, г. Иркутск,  
ул. Трилиссера, 78  
e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Gefan Natalya Gennadyevna  
Candidate of Sciences (Medicine)  
Head of Department  
Irkutsk Antiplague Research Institute of  
Siberia and Far East  
78, Trilisser St., Irkutsk, 664047,  
Russian Federation  
e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

Лукьянова Светлана Владимировна  
кандидат биологических наук  
научный сотрудник

Luk'yanova Svetlana Vladimirovna  
Candidate of Sciences (Biology)  
Research Scientist

*Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт  
Роспотребнадзора  
Россия, 664047, г. Иркутск,  
ул. Трилисера, 78  
e-mail: svetalukyan@mail.ru*

*Irkutsk Antiplague Research Institute of  
Siberia and Far East  
78, Trilisser St., Irkutsk, 664047,  
Russian Federation  
e-mail: svetalukyan@mail.ru*

*Хаптанова Наталья Маркеловна  
младший научный сотрудник  
Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт  
Роспотребнадзора  
Россия, 664047, г. Иркутск,  
ул. Трилисера, 78  
e-mail: khaptanchik@mail.ru*

*Khaptanova Natalya Markelovna  
Junior Research Scientist  
Irkutsk Antiplague Research Institute  
of Siberia and Far East  
78, Trilisser St., Irkutsk, 664047,  
Russian Federation  
e-mail: khaptanchik@mail.ru*

*Кузнецов Владимир Ильич  
кандидат биологических наук  
заведующий лабораторией  
Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт  
Роспотребнадзора  
Россия, 664047, г. Иркутск,  
ул. Трилисера, 78  
e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru*

*Kuznetsov Vladimir Ilyich  
Candidate of Sciences (Biology)  
Head of Laboratory  
Irkutsk Antiplague Research Institute  
of Siberia and Far East  
78, Trilisser St., Irkutsk, 664047,  
Russian Federation  
e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru*

*Коновалова Жанна Анатольевна  
кандидат биологических наук  
старший научный сотрудник  
Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт  
Роспотребнадзора  
Россия, 664047, г. Иркутск,  
ул. Трилисера, 78  
e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru*

*Konovalova Zhanna Anatol'evna  
Candidate of Sciences (Biology)  
Senior Research Scientist  
Irkutsk Antiplague Research Institute  
of Siberia and Far East  
78, Trilisser St., Irkutsk, 664047,  
Russian Federation  
e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru*

*Андреевская Нина Михайловна  
кандидат биологических наук  
старший научный сотрудник  
Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт  
Роспотребнадзора  
Россия, 664047, г. Иркутск,  
ул. Трилисера, 78  
e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru*

*Andreevskaya Nina Mikhailovna  
Candidate of Sciences (Biology)  
Senior Research Scientist  
Irkutsk Antiplague Research Institute  
of Siberia and Far East  
78, Trilisser St., Irkutsk, 664047,  
Russian Federation  
e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru*

*Остык Александр Сергеевич  
научный сотрудник  
Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт  
Роспотребнадзора  
Россия, 664047, г. Иркутск,*

*Ostyak Aleksandr Sergeevich  
Research Scientist  
Irkutsk Antiplague Research Institute  
of Siberia and Far East  
78, Trilisser St., Irkutsk, 664047,  
Russian Federation*

ул. Трилисера, 78  
e-mail: [ostyakalex@mail.ru](mailto:ostyakalex@mail.ru)

e-mail: [ostyakalex@mail.ru](mailto:ostyakalex@mail.ru)

*Киселева Евгения Юрьевна*  
врач-бактериолог  
Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт  
Роспотребнадзора  
Россия, 664047, г. Иркутск,  
ул. Трилисера, 78  
e-mail: [adm@chumin.irkutsk.ru](mailto:adm@chumin.irkutsk.ru)

*Kiseleva Evgeniya Yurievna*  
Physician Bacteriologist  
Irkutsk Antiplague Research Institute of  
Siberia and Far East  
78, Trilisser St., Irkutsk, 664047,  
Russian Federation  
e-mail: [adm@chumin.irkutsk.ru](mailto:adm@chumin.irkutsk.ru)

*Косилко Варвара Сергеевна*  
врач-бактериолог  
Иркутский научно-исследовательский  
противочумный институт  
Роспотребнадзора  
Россия, 664047, г. Иркутск,  
ул. Трилисера, 78  
e-mail: [adm@chumin.irkutsk.ru](mailto:adm@chumin.irkutsk.ru)

*Kosilko Varvara Sergeevna*  
Physician Bacteriologist  
Irkutsk Antiplague Research Institute of  
Siberia and Far East  
78, Trilisser St., Irkutsk, 664047,  
Russian Federation  
e-mail: [adm@chumin.irkutsk.ru](mailto:adm@chumin.irkutsk.ru)

**Дата поступления:** 12.04.2021  
**Received:** April, 12, 2021