ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НААУЧНЫЙ ЦЕНТР ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ ИМЕНИ В. М. ГОРБАТОВА» РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН)

На правах
рукописи

ЮШИНА ЮЛИЯ КОНСТАНТИНОВНА

НАУЧНЫЕ ОСНОВЫ РЕИНЖИНИРИНГА ПРОЦЕДУР ОБЕСПЕЧЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ

Специальность 05.18.04 –технология мясных, молочных и рыбных продуктов холодильных производств

диссертации на соискание ученой степени
доктора технических наук

Научный консультант: **Семенова Анастасия Артуровна**
доктор технических наук,
профессор

Москва–2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 5
ГЛАВА 1. ПРОБЛЕМАТИКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ. АНАЛИЗ СОСТАВЛЯЮЩИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ 16
1.1 Распространенность пищевых инфекций, связанных с потреблением мяса и мясной продукции 23
1.1.1 Пищевой листериоз 23
1.1.2 Пищевой сальмонеллез 28
1.1.3 Пищевой кампилобактериоз 29
1.2 Санитарно-гигиенические процедуры на пищевых предприятиях 32
1.2.1 Основные дезинфицирующие средства для санитарной обработки на предприятиях мясной промышленности 33
1.3 Биопленкообразование как явление, определяющее необходимость реинжиниринга процедур обеспечения миробиологической безопасности ... 42
1.4 Биопленка: краткая характеристика 47
1.4.2 Механизм биопленкообразования 50
1.5 Методы борьбы с микробными биопленками 53
1.6 ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 1 57
ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ 59
2.1 Объекты исследований 61
2.2 Методология и методы исследования 71
Апробация молекулярных методов обнаружения патогенов (метод петлевой изотермической амплификации -LAMP) 72
ГЛАВА 3. АПРОБАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАТОГЕНОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЕ ... 93
3.1 Оценка эффективности метода Lamp для определения *Listeria monocytogenes* 93
3.2 Оценка эффективности метода Lamp для определения 99
Campylobacter spp 99
3.3 Оценка эффективности метода Lamp для определения *Salmonella spp* .. 105

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ 107
4.1 Исследование микробного сообщества производственной среды на примере предприятий мясной промышленности..... 108
4.2 Исследование микробного сообщества производственной среды на примере предприятия птицеперерабатывающей промышленности..... 120
4.3 Исследование сезонных изменений микробных сообществ 128
4.3.1 Закономерности сезонных изменений планктонных форм 129
4.4 Исследование контаминации абиотических и биотических объектов производственной среды отдельными патогенными микроорганизмами 158
4.4.1 *Campylobacter spp.*..... 158
4.4.2 *Listeria monocytogenes*..... 161
4.5 Изучение молекулярно-генетической взаимосвязи патогенных микроорганизмов, циркулирующих в производственной среде 173
4.6 Изучение антибиотикорезистентности выделенной патогенной и сапротрофной микрофлоры..... 179
4.7 ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 4 184
ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ БИОПЛЕНОК ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ 190
5.1 Изучение состава нативных биопленок 190
5.1.1 Микроскопический анализ биопленок..... 190
5.1.2 Результаты таксономического анализа нативных биопленок 199
5.1.3 Закономерности сезонных изменений микробных БП 204
5.2 Разработка методологии идентификации, сбора и оценки наличия биопленочного фенотипа микробных контаминантов пищевого производства 242
5.3 Исследование формирования биопленок патогенами и сапротрофами in vitro. 243
5.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 5 253
ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ МОНО- И ПОЛИВИДОВЫХ БИОПЛЕНОК, СФОРМИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫМИ ПАТОГЕНАМИ И САПРОТРОФАМИ К ВОЗДЕЙСТВИЮ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ, ПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ И ФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДОВ 257

6.1 Исследование устойчивости биопленок к воздействию дезинфектантов 257
6.2 Исследование антибактериальных и антибиопленочных свойств физических методов 260
6.2.1 Сравнительное исследование антибактериальных и антибиопленочных свойств НЧ серебра, золота и меди, полученных методом лазерного переноса 261
6.2.2 Исследование антибактериального воздействие селективного ИК-лазера 264
6.3 Исследование антибактериальных и антибиопленочных свойств поликатионных полимеров 266
6.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 6 271
ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА СХЕМЫ РЕИНЖИНИРИНГА ПРОЦЕДУР ОБЕСПЕЧЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ 273
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ 279
Перечень сокращений и условных обозначений 283
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 284
Приложение 324

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Современные пищевые системы, рассматриваемые от «поля» до «потребителя», представляют собой среду для возникновения, передачи и распространения инфекционных заболеваний. Во всем мире предпринимаются огромные усилия по контролю за распространением заболеваний пищевого происхождения, однако каждый год фиксируются вспышки, связанные с алиментарным путем передачи.

Исследования в разных странах мира показали, что изучение перемещений возбудителей пищевых токсикоинфекций имеет решающее значение для обеспечения безопасности национальных и международных поставок продовольствия. Число пищевых инфекций повсеместно растет. По оценкам ФАО/ВОЗ вспышки инфекций пищевого происхождения ложатся тяжелым бременем на системы здравоохранения и на экономику разных стран. Ежегодно от пищевых инфекций заболевает 600 млн. человек /почти каждый 10-й житель планеты/ и умирает 420 тыс человек. Экономические потери оцениваются на уровне 110 млрд долларов США. 40% бремени пищевых инфекций приходится на детей до 5 лет, эти болезни уносят жизни 125 тыс детей в год [WHO. Foodsafety, 2020]. Антропогенные воздействия на окружающую среду «форсировали» эволюцию микробов и привели к появлению среди традиционных контаминантов продовольственного сырья и пищевых продуктов штаммов с измененными свойствами, резистентных к воздействию окружающей среды, к антибиотикам и пр, с дополнительными факторами патогенности, чем в настоящее время объясняется всё 10 возрастающее количество так называемых «эмерджентных» (возникающих неожиданно) инфекций от пищи. Согласно данным МЭБ/ФАО/ВОЗ к группе таких заболеваний относится около двух сотен заразных болезней, получивших распространение в мире в последнее время, при этом 75% эмерджентных инфекций являются заболеваниями зоогенного происхождения [Макаров В.В., 2012].

Кроме того, циркуляция микроорганизмов порчи значительно сокращает сроки годности продукции и наносит прямой экономический урон предприятиям. Согласно докладу «Проблемы глобальной пищевой промышленности» ООН (2013 г.), более трети всех произведенных продуктов выбрасывается. До 2 млрд. т продовольствия пропадает из-за несовершенного хранения, перепроизводства и чрезмерных оптовых заказов.

Контаминация пищевой продукции через поверхности объектов производственной среды в процессе производства вызывает постоянную обеспокоенность.

Неэффективность применения существующих гигиенических подходов определяется растущим распространением штаммов, резистентных к применяемым дезинфектантам.

Колоссальную опасность для пищевых производств представляют биопленкообразующие микроорганизмы-патогены [Wang, R., 2019], так как БП определяют устойчивость возбудителей инфекций к факторам внешней среды. Активное изучение проблемы началось в конце XX века, когда стало понятно, что многие заболевания вызваны полимикробными биопленками. До сих пор, это направление активно развивается, главным образом, только в медицине [Hall-Stoodley, 2009]. По зарубежным оценкам перекрестное заражение в результате развития БП является риском, вызывающим 25% вспышек пищевых отравлений, тем не менее, до сих пор применяемые в производстве пищевых продуктов планы гигиены не только позволяют БП сформироваться и созревать, но также не могут обеспечить их удаление с поверхностей, контактирующих с пищевыми продуктами [González-Rivas, F. 2018]. В распространении пищевых инфекций, а также в развитии резистентности патогенных бактерий к антибиотикам и дезинфектантам, роль биопленочного роста у пищевых патогенов остается мало изученной. БП составлены сообществами различных бактерий, высокоустойчивыми к действию физических и химических дезинфектантов, они с трудом поддаются уничтожению с использованием стандартных методов дезинфекции. Как

источник антибиотикорезистентных клонов бактерий, БП усугубляют тяжесть пищевых отравлений [Yuan, L. 2019].

Контаминация пищевой продукции через поверхности объектов производственной среды в процессе производства вызывает постоянную обеспокоенность. Объекты производственной среды могут быть изготовлены из различных материалов, иметь разную степень адгезии, что напрямую связано с микробным разнообразием на их поверхности, а также эффективностью применяемых дезинфицирующих средств.

Поиск принципиально новых методов в борьбе с устойчивыми патогенными и условно-патогенными бактериями, в том числе в составе БП, приобретает всё большую актуальность. Перспективным путем считается создание инновационных антибактериальных материалов, сочетающих в себе требуемые эксплуатационные свойства и препятствующие распространению микроорганизмов, в том числе биопленкообразующих. Безопасность пищевых систем и их устойчивость к таким вызовам как вспышки инфекционных заболеваний для нашей страны, обладающей огромными природными ресурсами и активно развивающей национальный агропромышленный комплекс, имеет особое значение.

В связи с этим, одним из путей обеспечения безопасности и хранимоспособности продукции являются новые фундаментальные знания о перемещении и распространении микроорганизмов пищевых систем, в том числе биопленкообразующих с целью реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности мясной продукции.

Разработанность темы исследования

Научными и практическими аспектами микробиологической безопасности пищевых производств занимались многие отечественные и иностранные ученые. Исследованием микробиоты, характерной для мясной промышленности, посвящены труды Казакова А.М., Костенко Ю.Г, Корнелаевой Р.П., Сидорова М.А, Штандфуса Р., Ляйснера Л. и др.; вопросам разработки и внедрения на предприятиях мясной промышленности систем

управления микробиологической безопасностью – труды Чернухи И.М., Макаренковой Г.Ю., Дунченко Н.И. и др.. Характеристика и биооразнобразие патогенных микроорганизмов представлено в трудах Шевелевой С.А., Ефимочкиной С.Р, Тартаковского И.С., Батаевой Д.С., Панина А.Н., Hayama, Y., Indrawattana, N., Jasson, V. Изучением биопленкообразования занимались Романова Ю.М., Плакунов В.К., Николаев Ю.А., Тутельян А.В., Silva, V.O., Bryers, J.D., Høiby, N., Hood, S.K; вопросами дезинфекции - Костенко Ю.Г., Федорова Л.С., Герасимов В.Н. и др.

Тем не менее, в современных условиях вопросы анализа циркуляции микроорганизмов, особенно патогенных, в пищевых системах и связаные с ними меры безопасности требуют дальнейшего изучения и проработки. Актуально и практическое применение полученных знаний, как для производственных процессов, так и для организации мониторинга и контроля.

Цель и задачи исследования.

Целью работы являлась обоснование и разработка научных основ для проведения реинжиниринга (радикального переосмысления и перепроектирования) процедур обеспечения микробиологической безопасности мясной продукции.

Для реализации цели были поставлены и решены следующие задачи:

-разработать и апробировать молекулярные методы определения патогенов, циркулирующих в производственной среде пищевых предприятий

-изучить микробное сообщество абиотических и биотических объектов производственной среды

-изучить таксономический состав нативных биопленок электронно-микроскопическими, микробиологическими и молекулярно-генетическими методами

-изучить молекулярно-генетическую взаимосвязь патогенных микроорганизмов, циркулирующих в производственной среде, с патогенами окружающей среды

-охарактеризовать антибиотикорезистентность патогенных микроорганизмов

-разработать методологию идентификации, сбора и оценки наличия биопленочного фенотипа микробных контаминантов пищевого производства

-изучить устойчивость моно- и поливидовых биопленок, сформированных пищевыми изолятами патогенов и сапрофитов, к воздействию дезинфектантов, физических методов и полимерных комплексов

-разработать схему реинжениринга процедур обеспечения микробиологической безопасности, методические и нормативные документы для применения на предприятиях мясной и птицеперерабатывающей промышленности.

Научная новизна работы.

Концептуально обоснована и разработана методология проведения расширенного микробиологического профилирования предприятий для детализации циркулирующих микроорганизмов, в том числе в составе биопленок. Впервые проведены комплексные исследования биопленочной и свободно циркулирующей микрофлоры пищевых производств, в результате которых установлена способность к образованию биопленок у циркулирующих в производственной среде микроорганизмов.

Впервые получен и обобщен опыт исследования биопленок на пищевых предприятиях Российской Федерации. Изучена морфология и выявлена высокая гетерогенность биопленок по таксономическому разнообразию и по степени зрелости. Подтвержден микроколониальный рост бактерий в биопленках, описано нахождение бактерий в общей капсуле-матриксе. Сделаны важные наблюдения фундаментального свойства о бактериях в биопленках: впервые наблюдали прорастание покоящихся форм путем разрыва толстой оболочки, аналогичное прорастанию спор; локализацию микроколоний в общем матриксе; проиллюстрирована роль мембранных везикул как контейнеров гидролаз и ферментов синтеза полисахаридов, а также их высокое сродство (афинность) к субстрату, мышечным волокнам;

обнаружено новое явление – формирование биопленок из смеси планктонных форм с органическим материалом как первая фаза их формирования. Показана необходимость дифференцирования наблюдаемых биопленок от органических загрязнений (мяса, крови и т.п.).

Впервые предложены подходы к оценке антимикробных свойств различных химических веществ и материалов относительно биопленок патогенных микроорганизмов пищевых систем на разных стадиях их развития (формирующиеся и сформированные), что является принципиально новым подходом при оценке эффективности антимикробных материалов (веществ). Продемонстрировано успешное действие метода лазерного переноса наночастиц на бактериальные биопленки.

Методология и методы исследования. В основу поэтапного плана аналитической и экспериментальной работы положена рабочая гипотеза об необходимости расширенного микробиологического профилирования предприятий с целью формирования адекватных гигиенических мер. Исследования проводились с отбором фактического биологического материала на промышленных предприятиях, который анализировали с использованием современных стандартных и модифицированных методов и приборов в аккредитованных и лицензированных лабораториях. В исследованиях *in vitro* использовали штаммы микроорганизмов, выделенные из производственной среды. Достижение цели исследования подтверждалось решением всех поставленных научных задач, а также разработкой и введением в действие методических, нормативных и технических документов для применения на предприятиях мясной и птицеперерабатывающей промышленности.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Теоретическая значимость диссертационной работы обусловлена разработкой новой методологии определения микробиоты пищевых производств.

В результате проведенной работы показана и научно обоснована необходимость изменения подходов к обеспечению микробиологической

безопасности на предприятиях мясной и птицеперерабатывающей промышленности. В этой связи, была сформулирована, концептуально обоснована и разработана схема реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности пищевых предприятий.

Охарактеризована микробиота объектов производственной среды, в том числе в составе биопленок, исследованы закономерности выявлений патогенных микроорганизмов в сезонной динамике.

Получена новая информация об уровне биопленкообразования, видовом составе биопленок и устойчивости к дезинфектантам в сезонной динамике образования БП на базовом перерабатывающем предприятии.

Разработана методология идентификации, сбора и оценки наличия биопленочного фенотипа микробных контаминантов пищевого производства с учетом выполненных исследований и обобщения литературных данных. На основании проведенных исследованы овормлены методические рекомендации: МР 784-00419779-2021 «Методика создания моделей моно- и мультивидовых биопленок грамотрицательных и грамположительных бактерий»; МР 4.2.0161-19 «Методы индикации биологических пленок микроорганизмов на абиотических объектах».

Проведен комплекс исследований по изучению антимикробных свойств различных материалов, в том числе поликатионных полимеров и наночастиц, синтезированных в результате применения физических методов. На примере поликатионых полимеров апробирован комплексный подход к оценке антимикробной активности с использованием микробиологических методов, метода проточной цитометрии, а также метода флуоресцентной микроскопии.

Разработанная концепция микробиологического профилирования апробирована при проведении работ на ряде предприятий, в том числе, группы компаний «Черкизово», а также использована в работах по госзаданию ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова», и в рамках выполнения крупного научного проекта №075-15-2020-775, поддержанного Министерством науки и высшего образования в 2020 году.

Разработанные принципы легли в основу новой редакции ГОСТ 32031-2011 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* и других видов Listeria (*Listeria* spp.)».

Разработано и апробировано 7 методических рекомендаций определения патогенов. Разработанные методы внедрены более, чем на 15 предприятиях.

Полученные результаты использованы при разработке Инструкций по применению дезинфицирующий средств для санитарной обработки оборудования и помещений на предприятиях мясной промышленности

Результаты исследований используются при проведении курсов повышения квалификации для специалистов мясной отрасли в Учебном центре ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова», а также при подготовке магистерских и дипломных работ Департамента ветеринарной медицины Аграрно-технологического института ФГБОУ ВО «Российский Университет Дружбы Народов» и ФГБОУ ВО РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева.

Положения, выносимые на защиту.

-концепция проведения расширенного микробиологического профилирования пищевого предприятия;

-молекулярные методы определения патогенов, циркулирующих в производственной среде пищевых предприятий;

-данные о составе микробных сообществ абиотических и биотических объектов производственной среды, в том числе о таксономическом составе нативных биопленок;

- процессы формирования БП патогенами и сапротрофами in vitro;

-данные о способности к биопленкообразованию, об антибиотикорезистентности, устойчивости патогенной и сапротрофной микрофлоры, выделенной на предприятиях;

- методология идентификации, сбора и оценки наличия биопленочного фенотипа микробных контаминантов пищевого производства.

- схема реинжениринга процедур обеспечения микробиологической безопасности на предприятиях мясной и птицеперерабатывающей промышленности.

Степень достоверности.

Достоверность полученных результатов подтверждается обширно проведенными экспериментальными исследованиями на промышленных предприятиях и аккредитованных лабораториях, а также широким обсуждением результатов диссертации на международных и отечественных конференциях. В работе использовали микробиологические методы исследований, в том числе общепринятые и современные, а также разработанные в ходе выполнения исследований. Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2019 и Statistica 12.0. Для оценки статистической значимости различий в экспериментальных данных применяли критерий Хи-Квадрат Пирсона и точный тест Фишера. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Апробация результатов. Результаты исследований доложены, обсуждены и получили одобрение на международных и всероссийских форумах, научно-практических конференциях и семинарах, проводимых для специалистов отрасли в различных регионах Российской Федерации и за рубежом в разные годы, в том числе на: Международной научно-практической конференции, посвященная памяти В.М. Горбатова (Москва, 2016); IV Научно-практической конференции с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Нижний Новгород, 2018 г.); XII Международной научно-практической конференции «Безопасность и качество товаров» (Саратов, 2018); Международной научно-практическая конференции «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, 2018 г); XI Международной научной конференции студентов и аспирантов "Техника и технология пищевых производств": материалы конференции (Могилев, 2019); Международной научно-практической конференции

«Инновационные процессы в пищевых технологиях: наука и практика» (Москва, 2019); Всероссийской научно-технической конференции с международным участием "Приоритеты модернизации и технологического развития продовольственного сектора Российской Федерации на современном этапе" (Московская обл., п. Рыбное, 2019), VII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Пищевые инновации и биотехнологии» (Кемерово, 2019); The 60th International Meat Industry Conference MEATCON 2019, (Kopaonik, Serbia 2019); Конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность (Москва, 2020); Международной конференции «Food quality and food safety» («Качество и безопасность продуктов питания») (Москва, 2021); X Международном ветеринарном конгрессе (Москва, 2021); XXIX Международной конференции и Дискуссионном научном клубе «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Республика Крым, Ялта-Гурзуф, 2021 г); 61 The International Meat Industry Conference MEATCON 2021», (Zlatibor, Serbia 2021); V Международной конференции по сверхбыстрой оптике «UltrafastLight-(Москва, 2021 г).

Публикации. Основные положения диссертации опубликованы в 59 печатных работах, в том числе в: 32 статьях в периодических изданиях, рецензируемых ВАК Министерства науки и высшего образования, 12 статьях (4 из которых в высокорейтинговых изданиях первого и второго квартиля) в международных изданиях, входящих в наукометрические базы Scopus and Web of Science. Получен 1 патент Российской Федерации на изобретение.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, семи глав, заключения, списка литературы и приложения. Общий объем диссертации включает 324 страницы, 74 рисунка, 50 таблиц, 283 использованных источников. В приложении представлены документы, подтверждающие внедрение основных результатов диссертационной работы.

Личный вклад автора. Диссертационная работа является обобщением и результатом экспериментальных и аналитических исследований,

выполненных в период с 2010 г. по 2021 г. лично автором и при его прямом участии. Автор осуществлял все этапы выполнения диссертационной работы: обоснование актуальности работы и выбор направления научных исследований, формулирование рабочей гипотезы и научной концепции, постановка цели и задач исследований, планирование, разработка методических походов и проведение экспериментов, обработка полученных данных и их анализ, практическая реализация результатов исследований, в том числе разработка различных видов документации и её апробация в промышленности, внедрение результатов исследований в образовательный процесс.

Благодарности.

Автор выражает глубокую благодарность за бесценную помощь в работе над диссертацией и профессиональную поддержку руководству ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова и своим коллегам: Семеновой А.А., Лисицыну А.Б., Кузнецовой О.А., всем сотрудникам лаборатории «Гигиена производства и микробиологии» и лично Батаевой Д.С, Толордаве Э.Р., Ворониной О.Л, Тартаковскому И.С. (Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи); Николаеву Ю.А., заведующему лабораторией выживаемости микроорганизмов ФИЦ Биотехнологии РАН (Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского);Марданову А. В. заведующему лабораторией геномики микроорганизмов и метагеномики ФИЦ Биотехнологии РАН (Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина); Кудряшову С.И. заведующему лабораторией лазерной нанофизики и биомедицины (Физический институт им. Лебедева); Ярославову А.А, заведующему кафедрой высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ; Тутельяну А.В. руководителю Лаборатории инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора), д-р Бранко В. (Белградский институт гигиены и технологии мяса).

ГЛАВА 1. ПРОБЛЕМАТИКА МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ МЯСНОЙ ПРОДУКЦИИ. АНАЛИЗ СОСТАВЛЯЮЩИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

В настоящее время, в связи с быстрой мутацией патогенных микроорганизмов, проблематика микробиологической безопасности пищевой продукции, включая мясо и мясную продукцию, является в мировой науке важнейшим направлением исследований, актуальность которого растет год от года[1]. Широкое использование антибиотиков и антибактериальных препаратов провоцирует появление большого количества антибиотикорезистентных штаммов, которые представляют большую опасность для здоровья и жизни человека [Ahmed, J., 2017; Kim, J.M., 1995.]

27 февраля 2017 года Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) опубликовала список из 12 патогенных микроорганизмов, представляющих наиболее высокую угрозу для людей, из них 8 наиболее часто встречаются в мясе и мясной продукции. Эти микроорганизмы были названы «приоритетными патогенами». Их подразделили на три категории по уровням приоритетности исследования (табл.1). В первую категорию вошли микроорганизмы, представляющие наибольшую опасность в связи с приобретенной высокой лекарственной устойчивостью; во второй и третьей категории представлены микроорганизмы, вызывающие распространенные заболевания, и демонстрирующие растущую устойчивость к лекарственным средствам. [Ефимочкина, Н.Р., 2017].

Проводимые в мире исследования «приоритетных патогенов» сегодня, в основном, направлены на исключение или минимизацию рисков, связанных с их жизнедеятельностью в пищевой продукции. Основной целью таких

[1] Материал, изложенный в данном разделе, опубликован в статье 276: Юшина, Ю.К. Микробные контаминанты мяса: что нового? / Ю.К. Юшина, Д.С. Батаева, О.В. Соколова // Все о мясе – 2017. — № 4. – С 37

Таблица 1 - Приоритетные патогены, встречающиеся в мясе

Микроорганизм	Общая характеристика
1 категория. Критический уровень приоритетности	
Pseudomonas aeruginosa	Синегнойная палочка. Вызывает цистит, пневмонию, абсцессы, бактериемию, инфекции дыхательных путей и мягких тканей. Устойчив к карбапенемам
Enterobacteriaceae	Семейство энтеробактерий, состоящие из множества родов. Многие представители *Enterobacteriaceae* являются обитателями кишечника человека. Патогенные микроорганизмы, в том числе *Escherichia coli* O157:H7, вызывают колиты, поносы, диареи, бактериемию. Устойчивы к карбапенемам, вырабатывают бета-лактамазы расширенного действия
2 категория. Высокий уровень приоритетности	
Enterococcus faecium	Энтерококк. Входит в состав нормальной микрофлоры тонкого кишечника человека и некоторых млекопитающих. Отдельные штаммы используются при производстве продуктов питания. Является условно-патогенным. В случаях проявления патогенных свойств вызывает спонтанный бактериальный перитонит. Устойчивы к ванкомицину
Staphylococcus aureus	Золотистый стафилококк. Является наиболее патогенным видом стафилококков. Вызывает сепсис, гнойные воспаления кожных покровов, везикулопустулез, абсцесс, конъюнктивит, ринит, ангину, бронхит, пневмонию, менингит, цистит и др. Устойчивы к метициллину и умеренно устойчивы к ванкомицину
Campylobacter spp.	Кампилобактерии. Вызывают кампилобактериоз – заболевание, протекающее с этилогией гастроэнетерита или гастроколита. При кампилобактериозе *Campylobacter* обнаруживают микробиологическим анализом посевов кала, крови и при эндоскопии кишечника. Устойчивы к фторхинолонам
Salmonella spp.	Сальмонеллы. Вызывают сальмонеллез – острую кишечную инфекцию, характеризующуюся поражением желудочно-кишечного тракта с симптоматикой энетроколита. Устойчивы к фторхинолонам
3 категория. Средний уровень приоритетности	
Shigella spp.	Шигеллы. Вызывают бактериальную дизентерию и другие воспалительные заболевания – шигеллёзы. Устойчивы к фторхинолонам.

исследований является повышение микробиологической безопасности продуктов питания. [Информационный бюллетень ВОЗ, 2015]

В соответствии со Стратегией повышения качества пищевой продукции Российской Федерации, одной из приоритетных целевых задач является расширение перечня показателей безопасности пищевой продукции в целях контроля новых потенциально опасных контаминантов химической и биологической природы, создающих риск жизни и здоровью человека или недопустимый риск жизни и здоровью будущих поколений, содержащихся в пищевой продукции [Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года, 2016].

Наибольшие проблемы контаминации мяса и мясной продукции в последние десятилетие связаны с выявлением *Salmonella* spp. [Little, C.L., 2008] *Listeria monocytogenes, Escherichia coli O157:H7*[21], *Campylobacter* spp. [Кампилобактериоз. Информационный бюллетень ВОЗ., 2011]

Согласно действующим законодательным и нормативным документам, на территории Российской Федерации установлен контроль за контаминацией мяса и мясной продукции патогенными микроорганизмами - *Salmonella spp., Listeria monocytogenes*.. Микробная контаминация мяса и мясной продукции контролируется также с использованием показателей, характеризующих общее количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), количество бактерий группы кишечной палочки (БКГП), сульфитредуцирующих клостридий, дрожжей, плесневых грибов и молочнокислых микроорганизмов [Мелисбек, Б., 2016]. Кроме этого, для мясной продукции представляет большой интерес изучение некоторых видов микроорганизмов, вызывающих порчу, например, *Pseudomonas* spp. и *Brochothrix* spp. [Borch, E., 1996].

В последние годы спектр вопросов в изучение проблематики микробной контаминации и ее контроля постоянно расширяется. Наиболее объективное представление об актуальных направлениях исследований в данной тематике дает использование инструментов наукометрического анализа публикаций,

посвященных проблемным (как с позиций безопасности, так и порчи) микроорганизмам в мясной продукции - *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes, Escherichia coli* O157:H7, *Campylobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Brochothrix* spp. [Singh, P., 2015; Кампилобактериоз. информационный бюллетень ВОЗ, 2011]. Для проведения такого анализа были использованы ресурсы научных баз данных - eLIBRARY и ScienceDirect (by Scopus). Поиск осуществляли по ключевым словам, в том числе по выше названным микроорганизмам.

Предварительное сканирование по ключевому слову «патоген» в ядре eLIBRARY показало 1067 (рис. 1.), а в ядре ScienceDirect - 25156 публикаций (рис 2.). Таким образом, наибольшей статистической достоверностью для рассмотрения проблематики контаминантов мяса обладала система ScienceDirect. Тем не менее, анализ публикаций в двух системах представлял интерес для сравнения основных векторов исследований в России и за рубежом.

Представленные на диаграммах (рис. 1 и 2) результаты сканирования показывают распределенность публикаций по группам микроорганизмов. Углубленный анализ публикаций, представленных в ядре eLIBRARY и в ScienceDirect, показал, что интерес отечественных исследователей, в основном, направлен на выявление патогенов в пищевых продуктах и на санитарное состояние производства; в меньшей степени – на усовершенствование методов раннего выявления. Напротив, за рубежом большая часть исследований в отношении патогенов посвящена выявлению путей контаминации пищевых продуктов и ранней идентификации микроорганизмов.

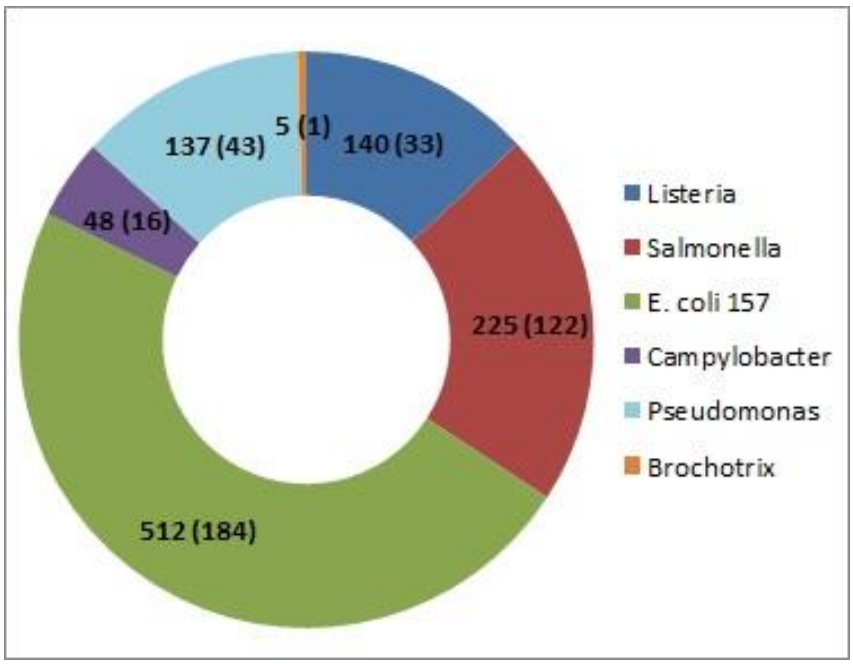


Рисунок 1 - Распределение количества публикаций в ядре eLIBRARY в рубрикаторе «пищевая промышленность» по ключевым словам, соответствующим проблемным контаминантам.

(Прим. Первая цифра подписи секторов диаграммы - общее количество публикаций по каждому микроорганизму, вторая цифра в скобках – количество публикаций, посвящённых исследованию конкретного микроорганизма в мясе и мясной продукции)

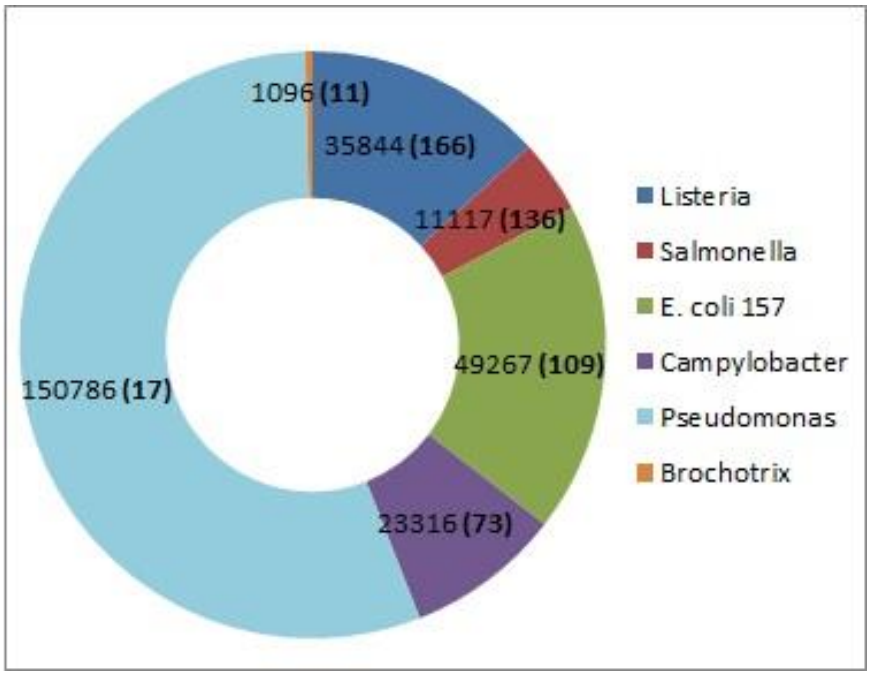


Рисунок 2 - Распределение публикаций в ScienceDirect в рубрикаторе «пищевая промышленность» по ключевым словам, соответствующим проблемным контаминантам.

(Прим. Первая цифра подписи секторов диаграммы - общее количество публикаций по каждому микроорганизму, вторая цифра в скобках – количество публикаций, посвящённых исследованию конкретного микроорганизма в мясе и мясной продукции)

При анализе публикационной активности зарубежных ученых, представленной в ScienceDirect за последние 10 лет (рис. 3), было отмечено, что в 2006-2010 наблюдался стабильный интерес к изучению патогенных микроорганизмов в мясе и мясной продукции. После 2011 года наметился небольшой рост, а в 2014 году количество публикаций по тематике увеличилось почти вдвое и достигло в 2016 году почти 2,9 тысяч в год.

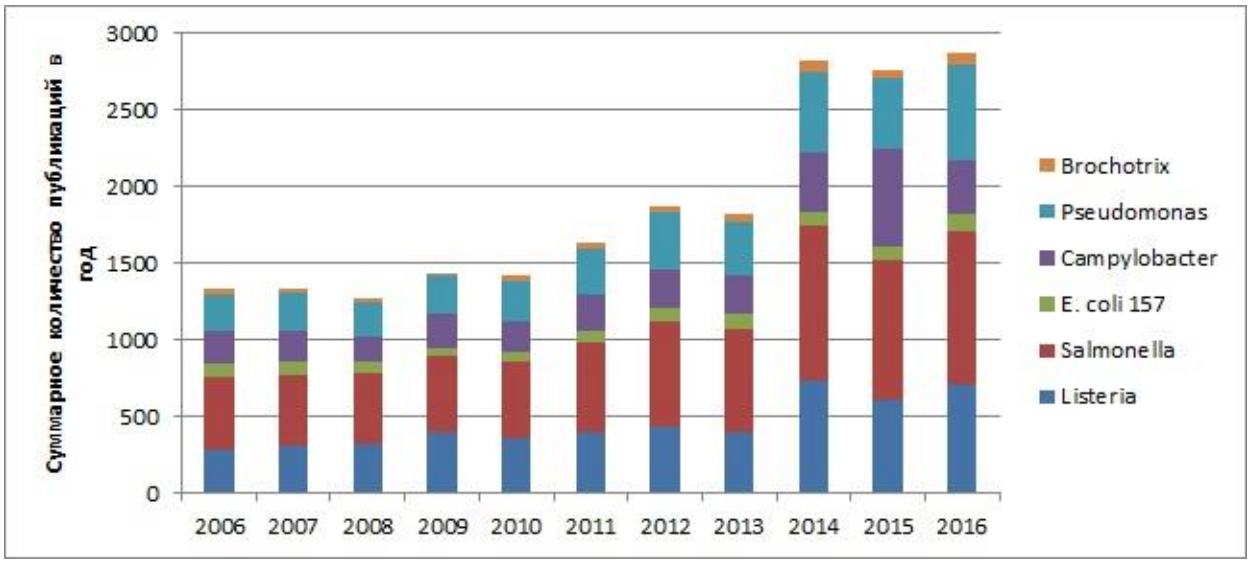


Рисунок 3 - Общая публикационная активность, отражающая международный интерес в отношении изучения контаминантов мяса и мясной продукции (ScienceDirect)

При анализе публикаций в ScienceDirect за период с 2006 по 2019 гг. было отмечено возрастание приоритетности исследований в отношении рассматриваемых микроорганизмов в следующем ряду *Brochothrix spp.* (467 публикаций за 13 лет), *Escherichia coli* O157:H7 (891 публикация), *Campylobacter* spp. (3135), *Pseudomonas* spp. (3876), *Listeria monocytogenes*, (4931), *Salmonella* spp. (7282) (рис. 4).

Наиболее частыми объектами исследований при изучении контаминации мяса и мясной продукции, как в России, так и за рубежом, являются микроорганизмы родов *Salmonella spp*. и *Listeria spp.* (более половины публикаций в отношении этих патогенных контаминантов). Также за последние 10 лет большой интерес зарубежные исследователи проявляли к

Рисунок 4 - Количество публикаций по тематике рассматриваемых групп микроорганизмов за период 2006-2016 гг., (ScienceDirect).

Наибольшее количество публикаций было посвящено *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes*. На третьем и четвертом месте – публикации по *Pseudomonas spp.* и *Campylobacter spp.* Причем в отношении *Brochotrix spp.* и *E. coli* O157:H7 интерес исследователей в течение 10 лет оставался постоянным - от 60 до 100 статей в год. В отношении остальных контаминантов мяса интерес исследователей хотя и носил скачкообразный характер, но наблюдалось стабильное повышение количества исследований с 2010-2013 гг. (рис. 5).

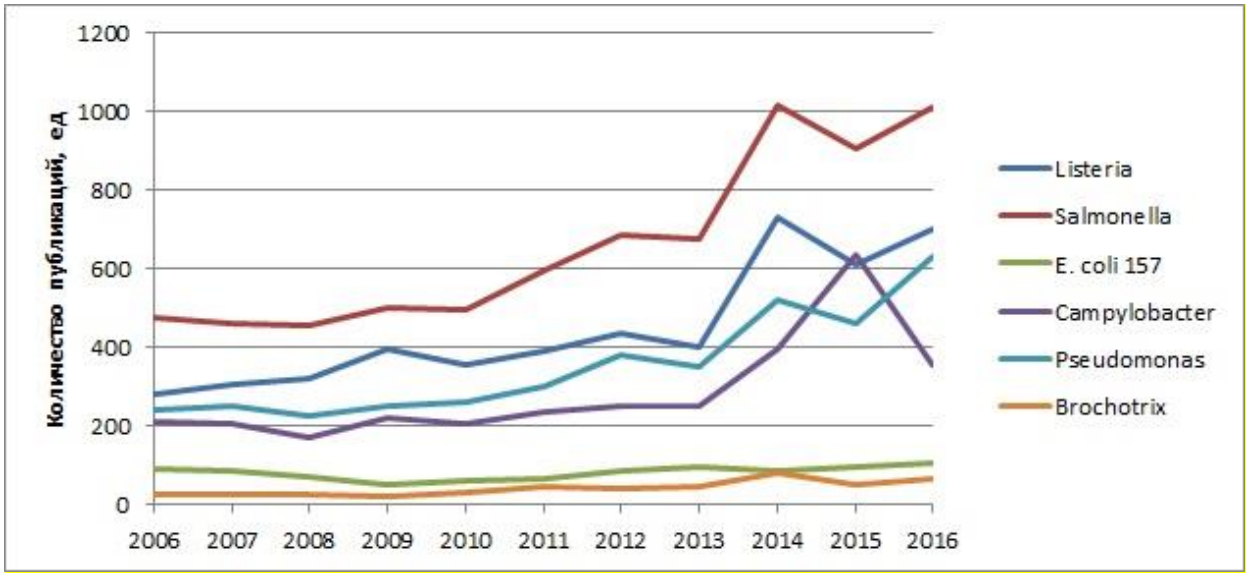


Рисунок 5 - Рост количества публикаций, посвященных изучению контаминантов мяса и мясной продукции, в ScienceDirect.

изучению бактерий рода *Pseudomonas* в пищевой отрасли. Однако исследованиям псевдомонад в Российской Федерации пока уделяется недостаточное внимание (менее 0,1% публикаций от общего количества статей пищевой тематики).

В России наиболее изучаемой группой микроорганизмов являются представители рода *Enterobacteriaceae*. Причем в исследованиях российских ученых, как правило, фигурирует вся группа *Enterobacteriaceae*, в то время как иностранные исследования чаще всего касаются конкретных патогенных штаммов, в частности, *E. coli* O157:H7 [Rajaee, M., 2017; Randall L.P., 2017].

Наименее изученным микроорганизмом, как в России, так и за рубежом, остается *Brochothrix* [Holley, R.A., 2014]. В 2016 году был отмечен спад публикаций по исследованию *Campylobacter*, однако уже в первом квартале 2017 года количество публикаций снова возросло, что, очевидно, связано со вспышками заболеваний, вызванных этим возбудителем.

Учитывая тот факт, что распространенность пищевых патогенов и микроорганизмов порчи в мире и в отдельно взятых странах имеет общие тенденции, следует сделать вывод о необходимости уделять большее внимание изучению *E. coli* O157:H7, *Campylobacter spp.*, *Brochothrix spp.* при исследовании мяса и мясной продукции отечественного производства. Вместе с тем, необходимо продолжать наращивать объемы исследований в отношении и других микробных контаминантов, делая акцент на развитие методов их выявления и изучении причин устойчивого обнаружения в мясе и мясной продукции.

1.1 Распространенность пищевых инфекций, связанных с потреблением мяса и мясной продукции

1.1.1. Пищевой листериоз

Возбудителями являются бактерии рода *Listeria spp.,* которые представляют собой грамположительные аспорогенные палочки с закругленными концами. Капсулы не образуют. Они также могут быть

кокками, одиночными или короткими цепочками, редко – нитями. В штрихах они располагаются в виде кучи, пар, цепей, частичек, параллельных друг другу, в виде римской цифры V [Костенко, Ю. Г., 2015].

Род *Listeria spp.* состоит из 6 видов, межвидовая дифференциация которых основана на гемолитической активности и ферментации углеводов. Патогенными являются 2 вида: *L. monocytogenes* и *L. ivanovii*. *L. monocytogenes* является патогенным как для людей, так и для животных, а *L. ivanovii*– только для животных. К непатогенным видам относят *L. seeligeri, L. innocua, L. grayiu, L. welshimeri*

Микроорганизмы хорошо растут в обычных условиях, анаэробные условиях уменьшают их рост. Растут небольшими (диаметром 0,5-1 мм) прозрачными, слегка выпуклыми округлыми колониями с тонкой структурой на мясопептонном агаре (МПА); в тоже время на бульоне они растут в виде равномерной мутности, которая при встряхивании образует «муаровые» волны. Способны образовывать зоны гемолиза на кровяном агаре [Greenwood, D., 2012].

Listeria monocytogenes можно считать организмом, распространенным повсеместно в природе, окружающей среде и в живых организмах. Этот микроорганизм обладает сапрофитными свойствами, питаясь мертвыми или разлагающимися органическими веществами, и демонстрирует крайне высокую устойчивость к обезвоживанию, воздействию физических факторов и условий окружающей среды. В пыли, грязи и влажных почвах может содержаться большое количество таких бактерий. Кроме того, *Listeria monocytogenes* широко распрострнение в объектах окружающей среды в силосе и наземных водоемах (таких как реки и озера и т.д

L. monocytogenes способна сохранять свою жизнеспособность и размножаться в широком диапазоне температур и значений pH среды, выдерживает высушивание, замораживание, присутствие высоких концентраций соли (10-20%) и фенольных соединений коптильного дыма [Янковский, К. С., 2000; Красильников, А. А., 2015].

Серьезной проблемой для производителей пищевых продуктов является выживание листерий в условиях технологического процесса и технологической обработки сырья и продукции [Gandhi, M., 2007].

Листерии способны игнорировать такие технологические способы защиты пищевых продуктов, как хранение в охлажденном виде, создание кислой среды и повышенной солености, сохраняя при этом способность к размножению в этих условиях [Farber, J.M., 1991]. Листерии способны активно перемещаться из неблагоприятной по условиям среды в более приемлемые для развития и размножения. При этом они успешно конкурируют с другими бактериями и простейшими [Shi, W., 1993]. Основная природная среда обитания листерий — это почвы и водоемы [Годова, Г. В., 2013].

При умеренных и низких температурах эти бактерии сохраняются и размножаются в почве в течение нескольких месяцев и даже лет (до 600 дней) [Sofos, J.N., 2009;]. На фураже они живут до 3 лет, длительно сохраняются в мясе и молоке при температуре 4-6 °С [Бессарабов, Б. Ф., 2007; Боровков, М.Ф., 2013; Янковский, К. С., 2000].

Процесс замораживания и дефростации не приводит к заметному снижению *Listeria monocytogenes*. *Listeria monocytogenes* является психрофильной бактерией, хорошо развивающейся при низких температурах [Захарова, Н.Г., 2015].

В отрубях и овсе они способны сохраняться до 105 суток; в соломе, сене и мясокостной муке - до 134 суток. В жидкой фазе силоса сохраняются до 20 суток, а в недоброкачественном силосе (с повышенным значением pH) возбудитель листериоза жизнеспособен до 2 лет. Это объясняется тем, что, попадая в силос, листерии могут накапливаться в нем, в особенности, если кислотность силоса сдвигается в щелочную сторону. Наиболее интенсивно эти бактерии размножаются в поверхностных слоях силоса под воздействием низких температур окружающей среды. На различных загрязненных поверхностях сохраняются до 3-х месяцев [Гершун, В.И., 1981].

В фекалиях и моче овец листерии сохраняют жизнеспособность от 5 до 12 месяцев, в курином помете - до 20 суток, в утином - до 23 суток, в зарытых в землю трупах - от 1,5 до 4-х месяцев. Прямые солнечные лучи оказывают губительное воздействие на листерий лишь на 5-10 сутки, а рассеянный свет - через 12 суток. На загрязненной навозом почве в теплое время года они способны выживать от нескольких недель и до 115 дней в холодное время года [Бессарабов, Б.Ф., 2007; Бороков, М.Ф., 2007].

При нагревании до 70°С они погибают через 30 минут, а при 100°С — спустя 15 минут. Убиваются обычными дезинфектантами. Формалин и едкий натр обезвреживают их в течение 20 минут, 70-90° винный (этиловый) спирт — за 5 минут [Янковский, К. С., 2000].

L.monocytogenes устойчива к консервантам, широко используемым при производстве пищевых продуктов. Эффективность консервантов направлена на снижение бактериальной нагрузки, но не ее ликвидацией. Их действие напрямую зависит от многих факторов, например, активности воды, pH, наличия конкурирующей микрофлоры, температуры и пр. [Willey, J., 2016].

Листерии попадают на пищевые предприятия различными путями - с основным и вспомогательным сырьем, с тарой, и т.д., вызывая контаминацию объектов производственной среды. Контаминация готового продукта, также может происходить при несоблюдении персоналом предприятия правил личной гигиены, при наличии бактерионосителей среди работников. [Malley, T. J., 2014].

L. monocytogenes может вызывать тяжелые заболевания пищевого происхождения [Warriner, K., 2009]. Европейское управление по безопасности пищевых продуктов (EFSA) и Европейский центр профилактики и контроля заболеваний (ECDC) сообщили, что в 2008–2016 гг. в Европе наблюдался рост случаев листериоза у людей с тяжелыми последствиями: 2536 случаев, из них 97,7% - с госпитализацией заболевших, а 16,2% - с летальным исходом [EFSA и ECDC, 2017 г. [EFSA and ECDC. 2017].

По разным оценкам, более 99% случаев листериоза у людей возникает в результате употребления загрязненных пищевых продуктов, готовых к употреблению, таких как мясные деликатесы, молочные продукты (например, мягкие сыры), копченая рыба [Allerberger, F., 2010; Koch, J., 2010].

Исследование в супермаркетах и на открытых рынках в пригородах Бангкока показало, что 15,4% (16 из 104) образцов сырого мяса были заражены *L. monocytogenes* [Indrawattana, N., 2011]. В Марокко *L. monocytogenes* присутствовала в 2,3% от общего количества (426) образцов различных видов мяса, в том числе мяса птицы [Ennaji, H., 2008].

Листериоз может протекать почти всегда спорадически и, как правило, имеет следующие клинические проявления: лихорадка, миалгия, усталость, головная боль, боль в животе, диарея, тошнота, рвота и т.д. Значительно реже встречаются и системные формы, которые протекают тяжело, такие, как энцефалит и менингит, септические – септицемия, со стороны репродуктивной системы – выкидыши, преждевременные роды и перинатальные инфекции. Инкубационный период может продолжаться от 1 до 70 дней. Это означает, что практически невозможно отследить пищевой источник, вызвавший заболевание [Ennaji, H., 2008].

Стандартные методы обнаружения этого патогена в пищевых продуктах основаны на методах культивирования [Law, J., 2015], которые, хотя и являются надежными, имеют такие недостатки, как трудоемкость и длительность. Это особенно серьезные недостатки, когда речь идет об исследовании пищевых продуктов с коротким сроком годности, для проведения анализа вспышек и для самомониторинга на производственных предприятиях [Garrido-Maestu, 2014; Shan, X., 2012]. Появление молекулярных методов, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР) и ПЦР в реальном времени (кПЦР), позволяет преодолеть эти недостатки.

В последнее время все больший интерес вызывают подходы изотермической амплификации ДНК, являющиеся одними из самых популярных петлевых изотермических амплификаций (LAMP). Они имеют

несколько преимуществ по сравнению с ПЦР такие, как выполнение при постоянной температуре или более высокая специфичность из-за большего количества праймеров [Abdulmawjood, A., 2016]. Таким образом, развитие быстрых методов в идентификации возбудителей листериоза ставит контроль за этим патогеном на новый современный уровень, достигая высоких результатов даже при низких уровнях инокулума *L. monocytogenes*.

1.1.2 Пищевой сальмонеллез

Бактерии рода *Salmonella* являются наиболее частой причиной болезней пищевого происхождения. Для снижения заболеваемости сальмонеллезом необходим комплексный подход к обеспечению безопасности пищевых продуктов «от фермы до стола».

Бактерии рода *Salmonella* представляют собой Г- палочку **[**Food Safety and Inspection Service U.S. Department of Agriculture. Illness and Pathogens, 2017**].**

Штамм *Salmonella enterica* является основной причиной гастроэнтерита человека во всем мире. При этом многие из более чем 2500 сероваров, связаны с болезнями пищевого происхождения. Серовары *Typhimurium и Enteritidis* штамма *S. enterica subsp. enterica* являются преобладающими сероварами, так как имеют широкий диапазон заражающих и колонизирующих животных [Herikstad, H., 2002].

Штаммы сальмонелл, не вызывающие сальмонеллез у животных, могут быть причиной заболевания людей, и наоборот. Присутствие сальмонелл в пищевых продуктах не оказывает влияния на вкусоароматические характеристики. Основное место локализации сальмонелл кишечные тракты зараженного человека и животных [Food Safety and Inspection Service U.S. Department of Agriculture. Illness and Pathogens, 2017]**.**

В отчете, составленном Европейским центром профилактики и контроля заболеваний (ECDC) и Европейским агентством по безопасности пищевых продуктов (EFSA) была представлена информация, что в ЕС с 2014 года

случаи заражения людей *Salmonella enteritidis* увеличивались на 3%. В тот же период выявляемость сальмонелл увеличилась с 0,7 % до 1,21 % у кур-несушек [European Food Safety Authority, 2017].

В ЕС на долю *S. enteritidis* приходится 59% всех случаев. Заражение, в основном, было связано с употреблением яичных продуктов, мяса птицы и яиц [European Food Safety Authority, 2017].

В ЕС в 2018 г. бактерии рода *Salmonella* вызвали почти каждую третью вспышку инфекций пищевого происхождения [European Food Safety Authority, 2019]**.** На Словакию, Испанию и Польшу пришлось 67 % из 1581 случаев вспышки сальмонеллеза, связанные с употреблением яиц [European Food Safety Authority, 2019]**.**

В Соединенных Штатах каждый год сальмонеллы вызывают около 1,35 миллиона случаев заболевания людей, 26 500 госпитализаций и 420 смертей. При этом пища являлась основным источником большинства этих случаев [Center for Disease Control and Prevention, 2022].

1.1.3 Пищевой кампилобактериоз

Кампилобактериоз по-прежнему остается одним из наиболее серьезных инфекционных заболеваний, которые могут бросить вызов глобальному здоровью в ближайшие годы [Kaakoush, N.O., 2015].

Микроорганизмы рода *Campylobacter* являются одной из основных причин гастроэнетритов в мире. Наиболее частым источником заражения является употребление птицы, не прошедшей достаточную термообработку [Информационный бюллетень ВОЗ. Кампилобактериоз, 2011].

Кампилобактериоз - одна из 4 основных причин диарейных заболеваний в мире [WHO. A report about Campylobacter, 2020]. Кампилобактериоз является наиболее распространенным зоонозным заболеванием в ЕС. В 2018 году государства-члены ЕС сообщили о 246 571 случае. Самый высокий уровень контаминации этим патогеном был обнаружен в курином мясе (37,5%) и мясе индейки (28,2%) [EFSA and ECDC, 2019].

В Великобритании кампилобактериями мясо заражено чаще, чем сальмонеллами. Причем, в ягнятине, баранине, крольчатине уровень обнаружения кампилобактерий был выше, чем в свинине. Во всех образцах преобладали *C. jejuni*, обладающие широкой резистентностью к протимомикробным препаратам, включая хинолоны [Little, C.L., 2008].[2]

В России диагностика кампилобактериоза проводится редко, что свидетельствует об отсутствии четкой информации о распространенности этого заболевания. Оценка микробиологического риска пищевого кампилобактериоза практически не проводится [Юшина, Ю.К., 2017].

В тоже время, согласно исследованиям ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», из 148 проб пищевых продуктов (листовые салаты, овощи, сырое молоко, мясо цыплят, куриные сырые субпродукты, индейка, перепела, говядина и смывы с различных поверхностей) было выделено 50 штаммов *Campylobacter,* большая часть которых идентифицировано как *C. jejuni* [Ефимочкина, Н.Р., 2016].

В последние годы кампилобактерии распространяются всё шире и приобретают всё более широкую лекарственную устойчивость в связи с чем, возрастает количество вспышек заболеваний. Источники контаминации пищевых продуктов могут быть являться поверхности основного и вспомогательного оборудования. Микроорганизмы рода Campylobacter трудно культивируемый возбудитель и с низким уровнем лабораторной диагностики.

Исследования показали, что около 50-70% случаев кампилобактериоза человека может быть связано с потреблением птицы и продуктов птицеводства [Allos, B.M., 2001]. Различные исследования продемонстрировали высокие уровни Campylobacter у бройлеров, туш

[2] Часть материала, изложенного в данном разделе, опубликованы в статьях: 276-Юшина, Ю.К. Микробные контаминанты мяса: что нового? / Ю.К. Юшина, Д.С. Батаева, О.В. Соколова // Все о мясе – 2017. — № 4. – С 37; Prevalence of Campylobacter spp. in a poultry and pork processing plants./ Yushina, Y., Bataeva, D., Makhova, A., &Zayko, E. (2020).// Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences, 14, 815–820. https://doi.org/10.5219/1422Q3, IF 0.26.

бройлеров и цыплят в розничной торговле [Zhao, C., 2001]. Передача инфекции обычно происходит при употреблении недоваренной птицы или при обращении с сырой птицей [Altekruse, S.F., 1999]. Этот патоген был обнаружен, не только в тушках после потрошения, но и в транспортных ящиках (как в грязных, так и в чистых), в кипящей воде, на машине для удаления кожи и на поверхности разделочных столов в конце рабочего дня [Perez-Arnedo, I., 2019]. Основными критическими точками перекрестного заражения туш были определены удаление оперения, потрошение и окончательная промывка тушек [Facciolà, A., 2017].

Установлено, что при низких положительных температурах *Campylobacter jejuni* NCTC11168 в мясном фарше может сохранять жизнеспособность не менее 7 дней [Bataeva, D.S., 2018]. Напротив, исследование козьего и овечьего молока в Чешской Республике показало отсутствие *Campylobacter* в этой продукции [Bogdanovičová, K., 2015].

Выживаемость *Campylobacter spp.* изучали на птицеперерабатывающих предприятиях. Аппарат для удаления внутреннего жира, потрошитель, пол, раковина, конвейерная лента, навешивающие устройства и мясо бройлеров были исследованы на присутствие *C. jejuni* и *C. coli*. Результаты показали, что распространенность *C. jejuni* и *C. coli* составила 94,5% и 5,5%, соответственно [Sánchez, L., 2017].

В некоторых исследованиях было показано, что уровень контаминации тушек был выше, чем уровень в клоакальных мазках, это указывало, по мнению авторов, на перекрестное заражение во время процесса убоя [Borges, K.A., 2020].

В ряде стран ЕС колонизация цыплят *Campylobacter* имеет четкий сезонный характер, с самыми высокими темпами летом или осенью [EFSA, 2010]. Причины сезонных колебаний до конца не изучены, но, вероятно, связаны с частотой и характером заражения стад *Campylobacter spp*. Есть еще одно свидетельство того, что климатические факторы, такие как температура,

коррелируют как с заражением стада бройлеров, так и с инфицированием людей [Jorgensen, F., 2011].

Также сообщалось, что Campylobacter демонстрирует циклический характер заражений: уровень загрязнения постоянно увеличивается и уменьшается в зависимости от сезона [Hinton, Jr, A., 2004]. Несмотря на то, что домашняя птица является важным резервуаром и источник кампилобактериоза человека, вкладом других путей передачи также нельзя пренебрегать [Hayama, Y., 2011].

Если у домашней птицы преобладающим видом является *C. jejuni*, преобладающим видом *Campylobacter* у свиней является *C. coli* [Fosse, J., 2009; Horrocks, S. M., 2009;]. При этом, наибольшим уровнем загрязнения характеризовались туши после нутровки, и уровень контаминации туш значительно уменьшились после их охлаждения [Lee, S. K., 2017]. Было показано, что надлежащая очистка оборудования, применение противомикробных препаратов и соблюдение гигиены имеют решающее значение для предотвращения более высокого загрязнения свиных туш [Wideman, N., 2015; Berrang, M. E., 2000].

1.2 Санитарно-гигиенические процедуры на пищевых предприятиях

Неотъемлемой частью производства пищевой продукции является производственный контроль, основанный на оценке опасных факторов и рисков. Производственный контроль на предприятиях мясной промышленности играет ключевую роль в выпуске безопасной пищевой продукции. В план производственного контроля должны быть включены такие элементы, как контроль поступающего на предприятие мясного сырья, контроль за соблюдение ветеринарно-санитарных правил предприятия. Контроль за продукцией осуществляется вплоть до процесса её реализации в местах продажи, как оптовых, так и розничных [Бунецкая, О., 2011].

При изготовлении мясной продукции на поверхностях технологического

оборудования остаются жир, кровь, колбасный фарш, белково-жировые эмульсии, гидратированные белки и пр. Под влиянием внешних факторов эти вещества начинают взаимодействовать друг с другом, частично коагулировать, высыхать и трансформироваться в устойчивые загрязнения. Полностью удалить такую грязь достаточно сложно. Для успешного осуществления этих процессов требуются современные моющие средства, в составе которых содержатся ПАВ [Бунецкая, О., 2011].

В случае, если на пищевом предприятии неудовлетворительно осуществляются операции по мойке и дезинфекции технологического оборудования, производственных площадок, рук рабочего персонала, возникает высокая вероятность появления загрязнений животного происхождения и, как следствие, выпуск продуктов неудовлетворительного качества [Бунецкая, О., 2011].

Внедрение мер, обеспечивающих безопасность и качество пищевых продуктов по всей пищевой цепи, является одним из основных приоритетов для снижения риска возникновения пищевых инфекций. Прежде всего, это организация надлежащей практики гигиены и санитарии на пищевом производстве [Бунецкая, О., 2011].

1.2.1 Основные дезинфицирующие средства для санитарной обработки на предприятиях мясной промышленности

Основными средствами достижения санитарного благополучия объектов производственной среды являются ДС[3].

Обработка ДС является главным методом снижения риска перекрёстного загрязнения продукции при поверхностном контакте. ДС,

[3] Материал, изложенный в данном разделе, опубликован в статье: Юшина, Ю.К. Обзор дезинфицирующих средств, актуальных для санитарной обработки на пищевых предприятиях / Ю.К. Юшина, Н.А. Насыров, М.А. Грудистова, Д.С. Батаева // Все о мясе. – 2022. – № 2. – С. 54-57. DOI: 10.21323/2071-2499-2022-2-54-57.

используемые на протяжении всего процесса производства пищевой продукции, имеют различные действующие вещества и определённые ограничения.

В настоящее время на пищевых производствах для санитарной обработки активно применяют несколько групп дезинфицирующих средств с разными действующими веществами. Эффективность дезинфекции зависит от предварительных процедур, а именно мойки (основного и вспомогательного оборудования, инвентаря, тары и помещений) в соответствии с действующими документами по проведения санитарной обработки для каждого типа перерабатывающего предприятия такими как, например, «Инструкция по санитарной обработке технологического оборудования и производственных помещений на предприятиях мясной промышленности» [Костенко, Ю.Г., 2003].

Такие документы устанавливают порядок проведения санитарной обработки, которая предусматривает предварительную механическую очистку, ополаскивание обрабатываемых объектов водой, затем мойку с использованием моющих средств. Конечным этапом санитарной обработки является дезинфекция [Костенко, Ю.Г., 2003].

В табл. 2 приведены ДВ современных ДС, разрешённых к использованию на пищевых предприятиях.

Представленные в табл. 2 данные свидетельствуют о том, что каждый класс химических дезинфектантов оптимизирован под конкретные задачи и обладает индивидуальным набором преимуществ и недостатков [Ölmez, H., 2009].

Таблица 2 - ДВ современных ДС, разрешённых к использованию на пищевых предприятиях [Ölmez, H., 2009]

ДВ	Преимущество	Недостатки
Хлоактивные соединения	Низкая стоимость, высокая активность, быстрота действия	Вызывают коррозию металлов. Инактивируются органическими соединениями. Растворы хлоактивных перпаратов нестабильны, однако в сточных водах не разлагаются, а образуют устойчивые галогенорганические соединения
Четвертичные аммониевые соединения (ЧАС)	Детергентная активность	Подавление эффективности в присутствии органических материалов. Нет спороцидного эффекта, отсутствие эффективности против гидрофильных вирусов. Легко абсорбируются и нейтрализуются многими материалами (хлопок, шерсть). Несовместимы с мылом из-за щёлочности. Некоторые могут быть контаминированы грамотрицательными микроорганизмами
Перекись водорода (H_2O_2)	Может способствовать снятию органического загрязнения, не фиксирует кровь. Не требует активации. Без запаха, нетоксична. Безопасна для окружающей среды. Легко удаляется	При попадании в глаза может вызывать ожоги. Обладает обесцвечивающим эффектом и несовместима с такими металлами как латунь, цинк, медь, никель, серебро
Надуксусная кислота (НУК)	Быстрота действия при низких концентрациях и температурах. Эффективность в присутствии органических материалов. Не требует активации. Совместима с многими другими дезинфектантами	Дорогостоящая. Концентрат может вызывать ожоги кожи и слизистых. Нестабильна

ДС, которые не рекомендованы для использования в пищевой промышленности, например, йодактивные соединения, вызывают коррозию металлов, ухудшают качество резины и некоторых пластмасс, могут вызывать ожоги тканей или инактивируются органическими материалами. Спирты имеют свойства к возгораемости, могут вызывать раздражение кожи, инактивируются органическими веществами. Фенолы могут вызывать раздражение и депигментацию кожи, инактивируются органическими материалами, разъедают резину и некоторые пластмассы. Формальдегиды имеют потенциальное канцерогенное действие: ограничение прямого контакта, резкий запах и раздражающее действие. Глутаровый альдегид имеет нестабильность, высокую стоимость и нуждается в активации, может вызывать ожоги кожи и слизистых, фиксирует белковые загрязнения [Ölmez, H., 2009].

Хлорсодержащие ДС действуют благодаря высвобождению активного хлора или окислительной способности ионов хлора, как правило, в положительной степени окисления. ДВ в хлорсодержащих ДС подразделяются на неорганические, среди них – гипохлорит кальция/натрия, гипохлорит лития, хлорная известь и проч., а также на органические: натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты, натриевая соль трихлоризоциануровой кислоты, хлорамины и проч.

Хлорсодержащие ДС весьма популярны, так как они обладают значительным дезинфицирующим эффектом. С декабря 2019 года в Китае и других странах было зарегистрировано растущее число случаев пневмонии, инфицированной новым коронавирусом [Chaoyu, T., 2021]. Хлорсодержащие ДС сыграли жизненно важную роль в предотвращении эпидемий, препятствуя распространению этого вируса. Они также эффективны против вегетативных форм бактерий [Бахир, В.М., 2003]. При этом эффективность зависит от pH среды. Они взаимодействуют с органическими веществами с образованием побочных (возможно, и канцерогенных) продуктов, таких как тригалометаны. Наиболее

признанным из них является хлороформ. В связи с этим в некоторых европейских странах, включая Германию, Нидерланды, Швейцарию, Данию и Бельгию, его использование запрещено [Rico, D., 2007]. Кроме этого, значительное использование дезинфицирующих средств, содержащих хлор, повышает устойчивость микроорганизмов к антибиотикам и дезинфицирующим средствам, тем самым усугубляет проблемы экологической безопасности во всём мире. Например, гипохлорит натрия в концентрации 100 мг/л может повышать устойчивость к дезинфектантам и антибиотикам *Pseudomonas* spp., которые являются основными микроорганизмами порчи мяса. Реакция SOS (консервативный ответ на повреждение ДНК), вызванная окислительным стрессом делает бактерии устойчивыми к хлору.

Дс и побочные продукты дезинфекции могут способствовать горизонтальному переносу генов устойчивости к антибиотикам и вызывать множественную лекарственную устойчивость у бактерий [Lv, L., 2014; Zhang, Y., 2017].

Помимо устойчивости к антибиотикам, злоупотребление ДС также способствует устойчивости к дезинфектантам [Zhang, Q., 2019].

Бактериальная резистентность к ДС развивается путём приобретения экзогенных мобильных генетических элементов или за счёт врождённой генетической адаптации, такой как экспрессия генов и мутации, вызванные антимикробным средством [Kim, M.R., 2018; Carlie, S., 2020], в том числе связанные с генами, отвечающими за мембранные белки и другие механизмы транспорта сквозь клеточные мембраны [Bragg, R., 2014; Kim, M.R., 2018; Youngmee, J., 2018].

Однако связь между хлорсодержащими ДС и развитием устойчивости бактерий к хлору до сих пор не ясна. Кроме того, отсутствие научных программ и управления возникающей резистентностью к дезинфектантам снижает эффективность ДС, что влияет на здоровье человека и на безопасность пищевой продукции [Brath, E., 2009; Youngmee, J., 2018].

Возможно, что хлорсодержащие ДС вызывают окислительный стресс у бактерий из-за их сильных окислительных свойств и приводят к устойчивости к антибиотикам и дезинфектантам [Chaoyu, T., 2021].

ДС на ЧАС являются катионными мембраноактивными антибактериальными агентами и широко используются в здравоохранении, сельском хозяйстве, быту и пищевой промышленности. Механизм их действия основан на изменении плазматической проницаемости в результате взаимодействия с липидно-белковыми мембранами микробных клеток [Gerba, C.P, 2015; Tezel, U., 2015].

Являясь основным классом катионных поверхностно-активных веществ, ЧАС эффективны против широкого спектра микроорганизмов и обычно используются для дезинфекции поверхностей объектов производственной среды на пищевых предприятиях [Gerba, C.P, 2015]. Однако они не обладают хорошей моющей способностью. Применяемые концентрации ДС на основе ЧАС не являются токсичными и не обладают кожно-раздражающим действием [Xinyi, P., 2020].

ДС на основе перекиси водорода (H2O2) используются, в основном, в пищевой промышленности, для дезинфекции оборудования, соприкасающегося с продукцией, а также пищевой упаковки. Концентрация H2O2 в растворах может варьировать. Например, 6 % раствор H2O2 проявляет бактерицидные свойства, а в концентрации 10-30 % обладает спороцидным действием. Растворы H2O2 можно использовать для обработки различных поверхностей из полимерных материалов [Chen, J. 2021].

H_2O_2 не выделяет токсичных паров в рабочем помещении и является экологически чистой альтернативой хлору для обеззараживания пищевых продуктов, без затруднений разлагается в воде и кислороде, образование канцерогенных побочных продуктов дезинфекции отсутствует [Tofant, A., 2006].

НУК широко используется в качестве ДС во многих пищевых отраслях, особенно при производстве мяса птицы [Chen, J., 2021].

Дезинфекция средствами, имеющих в своём составе НУК, осуществляется за счёт бактериостатического и бактерицидного действия, основанного на высвобождении азота, способного окислять сульфгидрильные связи ферментов, действующих на ДНК, и препятствует определённым жизненно важным метаболическим процессам [Zoellner, C., 2018].

Последнее обуславливает сложность выбора химически активных ДС для регулярного использования в природоохранных зонах в значительных количествах. При выборе препаратов для дезинфекции учитывают и другие факторы. Так, ряд препаратов не находят широкого применения ввиду высокой стоимости (НУК, глутаровый альдегид), потенциальной канцерогенности (формальдегид, фенолы), быстрой разлагаемости под воздействием активных факторов внешней среды (ЧАС, перекись водорода). Высокая пожароопасность спиртов также является препятствием для применения в производственных зонах. Таким образом, класс галогенактивных соединений (а, именно, производных хлора), наиболее часто рекомендуется, с некоторыми ограничениями, для решения задач дезинфекции промышленных объектов, в том числе в природоохранных зонах [Ölmez, H., 2009].

Увеличение времени обработки ДС может быть менее эффективным по сравнению с эффектом концентрации ДС, хотя между бактериальными штаммами могут наблюдаться некоторые различия в отношении влияния времени. Подобные результаты были также получены в исследованиях, проведённых учёными [Yuk, H.G., 2005; Yuk, H.G., 2006], показывая, что эффективность обработки хлором и (НУК) томатов, болгарского перца и огурцов незначительно различалась через 60 и 120 с. Это может быть связано с тем, что уничтожение бактерий дезинфицирующим средством имеет две цели: быструю инактивацию слабо прикреплённых бактерий в

первый момент обработки, за которой следует более медленная инактивация бактерий, скрытых глубоко внутри продукта, в оставшиеся время обработки. Тем не менее, считается, что инактивация бактерий, в основном, происходит в изначальный момент воздействия и небольшое увеличение времени воздействия раствора ДС не может значительно повысить эффективность дезинфекции [Vandekinderen, I., 2009].

Использование некоторых ДС оказывает селективное давление и способствует появлению устойчивых к ним микроорганизмов в производственной среде пищевого предприятия [Baquero, F., 1998; Russell, A., 2000]. Бактерии, устойчивые к ДС, могут быть причиной порчи пищевых продуктов и влиять на ферментативные процессы. Кроме микроорганизмов порчи, устойчивые к дезинфектантам, патогены, также могут представлять проблему, в качестве инфекционных агентов. Комбинированная устойчивость к ДС и антибактериальным химиотерапевтическим веществам также является проблемой как для пищевых предприятий, так и для здравоохранения в целом. Перекрёстная резистентность к дезинфектантам и антибиотикам, возникающая у пищевых патогенов, может привести к серьёзным последствиям для здоровья населения [Bessems, E., 2003].

В обеспечении бактериальной безопасности ключевую роль играют следующие факторы:

- соблюдение сроков и технологии санитарной обработки;
- применение эффективных ДС;
- адаптация системы дезинфицирующих мер к особенностям конкретного предприятия [Банников, В.Н., 2017].

Учитывая особенности пищевых производств и выпускаемого сырья (продукции), для каждой отрасли формируется свой перечень наиболее часто используемых ДС.На российском ветеринарном рынке представлено большое количество разнообразных дезинфектантов (около 400), которые можно условно разделить на три группы:

- препараты на основе хлора, фенолов, формальдегидов;

- препараты на основе НУК;
- комбинированные препараты на основе ЧАС [Малеев, Б. В. 2008].

Выбор конкретного препарата, как правило, зависит от ряда факторов, среди которых: широты биоцидного действия реагента по отношению к потенциально патогенным микроорганизмам; уровня безопасности для персонала и животных; свойств обрабатываемых поверхностей; проникающей способности в загрязнитель; экономичности, соотношения концентрации и цены реагента и особенностей предприятия [Поломошнова, И.А., 2015].

Лимонная и уксусная кислоты обычно используются для мытья фруктов и овощей, а также используются в качестве консервантов для пищевых продуктов, например, добавляются во фруктовые соки в виде уксуса и лимонного сока [Lynch, K.M., 2019].

Молочная кислота также часто используется в пищевой промышленности для сокращения микробных популяций. Исследования на цикории, помидорах, салате и других продуктах, показали, что она является эффективным противомикробным средством. Однако ни одно исследование ещё не продемонстрировало ее противомикробную эффективность на ягодах [Lafarga, T., 2019].

Существуют многочисленные исследования эффективности органических кислот против патогенных бактерий и микробиоты фруктов и овощей. Однако информации об эффективности против вирусов гораздо меньше [Lafarga, T., 2019].

Кислотные ДС, состоящие из перекиси водорода и перуксусной кислоты, оказались значительно более эффективными, чем соединения хлора при тестировании в мясных системах. Некоторые исследователи сообщают об аналогичных результатах, в то время как другие обнаруживают одинаковую эффективность двух ДС или даже противоположную эффективность [Jessen, B., 2003].

ДС, при определённых обстоятельствах, демонстрируют ограниченную эффективность в снижении микробной нагрузки. Это может быть связано с инактивировацией органическими веществами или зависимостью от pH. Но основным ограниченим всё же является способность ДС, как, например, у хлора, образовывать вредные для здоровья побочные продукты, в том числе канцерогенные и мутагенные соединения такие, как хлороформ и другие тригалометаны, хлорамины и галоуксусные кислоты при взаимодействии с органическими молекулами. Кроме того, хлор вызывает коррозию и был включён в ориентировочный список Директивы о промышленных выбросах [IPPC, 2007/0286 (COD)], направленной на сокращение вредных промышленных выбросов в ЕС, что приносит пользу окружающей среде и здоровью человека. Его использование уже запрещено в некоторых странах Европы (Бельгия, Дания, Германия и Нидерланды) [Meireles, A., 2016].

1.3 Биопленкообразование как явление, определяющее необходимость реинжиниринга процедур обеспечения миробиологической безопасности

Микроорганизмы образуют БП как на биотических, так и на абиотических поверхностях[4] [Silva, V.O., 2014].

Для пищевой отрасли наиболее опасное явление – развитие БП на абиотических поверхностях. Большинство основного и вспомогательного оборудования на предприятиях пищевой отрасли имеет абиотическую поверхность, характеризующуюся шероховатостью, или пористую, со стыками, швами и прочими труднодоступными участками, т.е. имеются

[4] Материал, изложенный в данном разделе, опубликован в статье 270:. Тутельян А.В. Образование биологических пленок микроорганизмов на пищевых производствах / А.В. Тутельян, Ю.К. Юшина, О.В. Соколова, Д.С. Батаева, А.Д. Фесюн, А.В. Датий, // Вопросы питания. – 2019. – Т. 88, № 3. – С. 32-43. DOI: 10.24411/0042-8833-2019-10027.

хорошие условия для локализации БП, образованных микроорганизмами [Tomaras, A.P., 2014; Huhu, W., 2015; Кравченюк, Х.Ю., 2016].

В отличие от планктонных клеток, БП устойчивы к воздействиям ДС [Akinbobola, A.B., 2017; Wang, H., 2018].

Исследования последних лет доказывают, что способность патогенов образовывать БП взаимосвязана сих антибиотикорезистентностью [Murakami, K., 2017; Frieri, M., 2017; Høiby, N., 2010]. Более того, гены толерантности микроорганизмов играют существенную роль в механизме формирования БП [Rossi, G. I., 2017].

Явление биопленкообразования было открыто в середине1980-х годов [Characklis, W.G., 1983; Marshag, P.A., 1989; Bryers, J.D., 1994]. Однако в течение последующих лет исследований БП было доказано, что биопленкообразование присуще большому количеству патогенных и условно-патогенных микроорганизмов [Somers, E.B., 1994; Costerton J.W., 1999; Gristina A.G., 1994], а некоторые исследователи рассматривают биопленкообразование как фактор патогенности [Lin, S., 2017].

Изначально микробные БП считали механизмом выживания бактериям в сложных условиях. Однако последние исследования указывают на то, что БП являются естественной формой существования микробов, в то время как планктонные формы представляют собой промежуточную стадию развития [Глушанова, Н.А., 2015].

Кроме того, в состоянии БП, при достижении определённой плотности, бактерии начинают обмениваться между собой сигналами [Swaminathan, B., 2007; Николаев, Ю.А., 2007; Solano, C., 2014; de Almeida, F.A, 2018]. Это свойство, называемое Quorum sensing («чувство кворума»), позволяет одноклеточным микроорганизмам проявлять свойства многоклеточных организмов и создавать сообщества внутри одного каркаса БП. БП, образованная одним видом микроорганизмов, например непатогенным, может содержать патогенный штамм, что в свою очередь способствует выживаемости последнего [Хмель, И.А., 2008].

Так *Ralstonia insidiosa,* вид протеобактерий, обитающий в окружающей среде (речная и прудовая вода, почва, системы водораспределения, предприятия по переработке свежесрезанных растительных продуктов), был продемонстрирован как сильный производитель БП, обладающий свойствами «мостиковой бактерии», значительно усиливающий включение нескольких пищевых бактериальных патогенов в БП. При совместном культивировании с *R. insidiosa* количество *E. coli O157: H7, L. monocytogenes*, в БП значительно увеличивается при различных условиях испытаний [Liu, N.T., 2016].

Температурный диапазон, оптимальный для процесса образования БП, до сих пор не является общепризнанным и постоянно обсуждается. Так, по данным одних авторов [Bridier, A. 2015; Пономарева, А.Л., 2016], формирование БП происходит наиболее интенсивно при температурах от 8˚С до 37˚С. Другие же исследователи, наоборот, отмечают, что в интенсивное биопленкообразование происходит лишь в интервале от 15˚С до 37˚С, а при температуре ниже 10˚С биопленкообразования не происходит [Han, N., 2016].

При этом все авторы сходятся во мнении, что температура активного формирования БП зависит от вида биопленкообразующего микроорганизма и поверхности, на которой происходит адгезия.

Ряд исследователей наблюдали, что БП образуются непосредственно в продуктах питания. [Zottola, E.A., 1994; Hood, S.K., 1995; Wirtanen, G., 1992].

Для мясной промышленности БП представляют колоссальную опасность в связи с тем, что мясо, в том числе и мясной сок, содержат большое количество питательных веществ и является идеальной питательной средой для размножения большинства микроорганизмов [Drosinos, E.H., 1994; Brown, H.L., 2014], а также инициирует биопленкообразование [Li, J., 2017].

БП образуются на поверхностях основного и вспомогательного оборудования [Wang, H., 2015; Xianqin, Y., 2018]. Температура производственных помещений мясоперерабатывающих производств, как правило, поддерживается не выше 12°С [Iliadis, I., 2018; Puga, C.H., 2016], в связи с этим риск возникновения БП высок. В случаях, если БП образуются в

труднодоступных местах производства, они могут стать постоянным источником контаминации [Pina, M., 2009].

В ряде случаев образование БП ассоциировано с процессами порчи мясной продукции [Wang, H., 2017].

Устойчивость к антимикробным препаратам усугубляет опасность биопленкообразующих патогенов. Опасность БП состоит в том, что их прикрепление может происходить как на поверхностях оборудования, продуктов или полуфабрикатов, так и на слизистых оболочках кишечника, вызывая клинические проявления инфекций [Ferreira, S., 2015; Lebeaux, D.1., 2012].

Так, в 2012 году в Индии, были проведены исследования, в результате которых было установлено, что у штаммов *E. coli*, вызвавших вспышку геморрагической диареи у детей, образование БП связано с несколькими генами вирулентности. Важной характеристикой патогенности штаммов является высокое продуцирование БП [Lebeaux, D.I., 2014].

В Бразилии проведено исследование по изучению биопленкообразования бактерий – возбудителей диареи, которыми являлись *E. coli*. Выделенные изоляты обладали способностью образовывать БП. Причем образование БП ингибировалось в присутствии цинка [Wani, S.A., 2012].

Исследования, проведенные совместно с сербскими и английскими учеными, продемонстрировали, особенности и пути перекрестной контаминации мясных продуктов патогенными листериями. В результате исследования 240 смывов из различных производственных зон мясоперерабатывающего предприятия, в 53 были идентифицированы бактерии рода *Listeria*. Они были обнаружены на линиях убоя, обвалки, нарезки, упаковки, зоны отгрузки, холодильных камерах, на поверхности трапов цеха упаковки в МГА. Восемь штаммов были идентифицированы как *Listeria monocytogenes*. Молекулярное генотипировние с использованием полногеномного секвенирования показало, что эти изоляты *L. monocytogenes*

были представлены тремя разными серотипами, обладавшими способностью к биопленкообразованию. Причем наиболее сильным биопленкообразователем оказался штамм, выделенный из смыва со стационарной пилы, а наиболее слабым - штамм, выделенный из трапа в зоне упаковки в МГА [Pereira, A.L., 2010].

L. monocytogenes, обладавшие способностью к биопленкообразованию, выделенные из смывов с линии убоя, были генетически аналогичны изолятам, полученным в смывах в зоне упаковки в МГА, холодильных камерах и зоне отгрузки. Таким образом, попадание *L. monocytogenes,* обладающих способностью к биопленкообразованию, вначале цепи производства и переработки мяса приводит к контаминации всех ее звеньев [Pereira, A.L., 2010].

Для птицеперерабатывающей промышленности микроорганизмы рода *Salmonella* являются доминирующими контаминантами продукции. Их способность образовывать БП не только при переработке, но и на птицефермах представляет серьезную эпидемиологическую проблему. Выделенные с объектов птицеперерабатывающих предприятий более 40 штаммов и идентифицированные как *S. typhimurium, S. enteritidis* и *S. Typhi,* обладали биопленкообразующими свойствами [Nastasijevic, I., 2017].

В настоящее время основной упор исследователи делают на обнаружение БП сальмонелл в целях предотвращения контаминации мяса птицы [Merino, L., 2019]. Большое значение в образовании БП играет последовательность обвалки тушек, а также вид упаковки [Wang, H., 2018].

В результате исследования биопленкообразующей способности бактерий рода *Arcobacter*, выделенных из птицы, оказалось, что более 2/3 выделенных штаммов обладали свойством образовывать БП [Nair, A., 2015].

В ряде исследований была определена генетическая взаимосвязь между биопленкообразованием и антибиотикорезистсентностью *Salmonella spp.* - с большей долей вероятностью БП образуются микроорганизмами, обладающими устойчивостью к антибиотикам [Chuah, L.O.,2018].

На предприятиях птицеперерабатывающей промышленности в качестве биопленкообразующих микроорганизмов следует рассматривать бактерии рода *Campylobacter* [WHO. The global view of campylobacteriosis, 2013; Информационный бюллетень ВОЗ, 2011]. Более половины кампилобактерий, выделенных из продуктов переработки птицы в 2017 году корейскими исследователями, обладали свойством образовывать БП. [Kim, S.H., 2017]

Биопленкообразующие штаммы *Campylobacter* обнаруживаются практически на всех объектах производственной среды предприятий птицеперерабатывающей промышленности (пол, столы, мойка и т.д.), а также в сточных водах [Balogu, T.V., 2014].

Результаты исследований, полученные российскими учеными, также свидетельствуют о высокой циркуляции биопленкообразующих штаммов *Campylobacter* на предприятиях птицеперерабатывающей промышленности Российской Федерации [Шевелева, С.А., 2016].

1.4 Биопленка: краткая характеристика

1.4.1 Строение и свойства биоплёнки

Компонентами БП являются микроорганизмы и внеклеточный матрикс, представляющий собой сложную биохимическую смесь полисахаридов, гликопептидов, нуклеиновых кислот и липидов [Silva Fernandes, M., 2015]. Особенность структуры БП состоит в увеличении доступности питательных веществ для клеток микроорганизмов, при одновременной защите их от действия различных воздействий средств. Содержание экзополисахаридного матрикса может составлять до 90% общей сухой массы БП [Flemming, H., 2010].

Поскольку БП – это способ организации живых бактерий, то состав экзополисахаридного матрикса не постоянен и может меняться в зависимости от штамма, условий роста и доступности питательных веществ. Главная функция его состоит в обеспечении целостности структуры БП, путем влияния

на местную клеточную активность и конкурентное или синергетическое межвидовое, иногда межкластерное, взаимодействие [Boudarel, H., 2018].

Встроенные белки составляют значительное количество биомассы для БП. Они играют роль в фиксации БП на биотической и/или абиотической поверхностях. Существуют специфические белки, которые занимаются связыванием биотических матриц, например, хитина [Kassinger, S.J., 2010].

С помощью метода конфокальной сканирующей лазерной микроскопии было показано, что микроорганизмы внутри матрикса представляют собой микроколонии в виде колонн или трехмерного гриба (рис. 6).

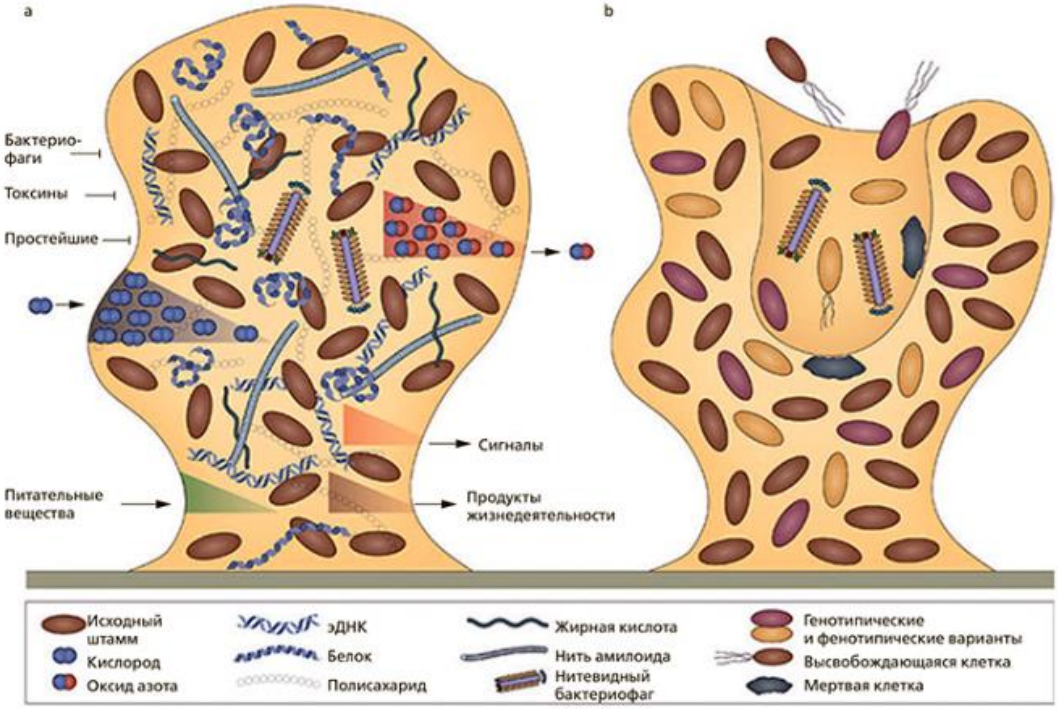


Рисунок 6 - Основные структурные элементы бактериальных биоплёнок [Хрянин, А.А., 2020; McDougald, D., 2011].

Существуют также более простые надклеточные структуры - кластеры, по-другому, «агрегаты» или «конгломераты», чаще всего образуемые кокками. Например, скопление стафилококков, похожее, на гроздь винограда [Koo, H., 2016; Чеботарь, И.В., 2010].

Внеклеточный матрикс играет главную роль в устойчивости микробных БП к физико-химическим воздействиям. С одной стороны, он осуществляет барьерные функции, снижая проницаемость путем затруднения диффузии или

связывая химические ингибиторы, а, с другой стороны, предотвращает выход из БП осмо- и термопротекторных веществ, оказывающих защитное действие на находящиеся внутри нее микроорганизмы. Внеклеточный матрикс зрелых БП способствует повышению устойчивости биопленочных микроорганизмов к осмотическому [Плакунов, В.К., 2008] и тепловому шоку [Ганнесен, А. В., 2015]. Показано также, что более устойчивых к антибиотикам Г(-) бактерий защищают чувствительные к антибиотикам Г(+) бактерии в составе бинарных БП, что подчеркивает важнейшую роль взаимодействия микробных компонентов мультивидовых БП, борьбу с которыми такое взаимодействие может существенно усложнять [Журина, М. В., 2019; Плакунов, В.К., 2019а].

Проницаемость матрикса, а также наличие каналов для перемещения питательных веществ и градиентов кислорода придает БП пористую структуру. Проницаемость БП, в том числе и механические свойства зрелой БП, зависят от размера пор, неоднородности и внутренней структуры матрикса [Boudarel, H., 2018].

В структуре БП особое место занимают особые клетки, так называемые, персистеры, формирующиеся в нижней части БП при снижении питательных веществ и уровня кислорода. Они интересны сильно сниженным обменом веществ и наличием белков, позволяющих блокировать действие антибиотиков, формируя мультитолерантность [Høiby, N., 2010].

БП могут включать не только отдельные виды бактерий, но и эукариотические микроорганизмы: дрожжи, мицелиальные грибы, водоросли и даже жгутиковые простейшие организмы [Bogino, P.C., 2013; Silva, V. O., 2014; Costa-Orlandi, C. B., 2017; Raghupathi, P. K., 2017].

БП, сформированные различными микроорганизмами, обладают различными свойствами. Так, важным свойством БП *L. monocytogenes*, способствующим длительному сохранению их в охлажденном и замороженном мясе, является адаптация к низким температурам [Tasara, T., 2006].

Возбудитель листериоза неприхотлив к виду поверхности, проявляя широкую толерантность в процессе биоплёнкообразования к стеклу, пластику, нержавеющей стали и резине [Bonsaglia, E.C.R., 2014].

1.4.2 Механизм биопленкообразования

Любая твердая поверхность (как биотическая, так и абиотическая) при контакте с жидкостью покрывается так называемой первичной пленкой, содержащей в том числе субстраты, которые микроорганизмы могут усваивать и использовать для роста [Costerton, J.W., 1978].

Цикл биопленкообразования описан в многочисленных исследованиях, и представляет собой пятиступенчатый процесс.

Первичное прикрепление микроорганизмов к поверхности (адгезия, адсорбция) из окружающей среды (обычно жидкости). Это этап собственно микробной адгезии, когда микроорганизмы обратимо прикрепляются к твердой поверхности. На этом этапе действуют неспецифические физико-химические силы взаимодействия между молекулами и структурами на поверхностях микроорганизма и твердого субстрата [Van Loosdrecht, M.C.H., 1988.]. Эта стадия обратима.

Окончательное (необратимое) прикрепление, иначе называемое фиксацией. На этой стадии бактерии выделяют внеклеточные полимеры, обеспечивающие прочную адгезию. Эта фаза, в свою очередь, состоит из нескольких самостоятельных этапов формирования биопленки. Детальные исследования экспрессии генов и функционирования регуляторных систем показывают, что бактерии обладают своеобразным «чувством поверхности», причем взаимодействие с поверхностью запускает экспрессию ряда генов, в регуляции которых принимает активное участие сигнальная система [Chien-Yi, C., 2018]. В течение некоторого времени после прикрепления к поверхности клетки могут перемещаться вдоль поверхности посредством жгутиков и пилей. Затем клетки теряют подвижность и начинают синтезировать внеклеточные полимеры (полисахариды, липиды, белки,

внеклеточную ДНК и другие компоненты), формируя. В результате деления клеток возникают компактные микроколонии, объединенные этим матриксом ВПМ [Zhurina, M.V., 2014; Muhammad, M.H., 2020].

Созревание. Клетки, прикрепившиеся к поверхности, облегчают прикрепление последующих клеток, внеклеточный матрикс удерживает вместе всю колонию. Накапливаются питательные вещества, клетки начинают делиться. Одновременно с увеличением толщины БП формируются ее специфические структуры - полости, каналы, выросты, поры [Muhammad, M.H., 2020].

Рост. Эта стадия нарастания зрелой БП в благоприятных условиях продолжается достаточно долго. На процесс формирования БП и их свойств влияют факторы окружающей среды и свойства клеток самого микроорганизма. Наиболее важными внешними факторами являются величина pH, концетрация солей, осмолярность, парциальное давление кислорода, доступность источников питания, а также степень гидрофобности поверхности раздела фаз, сила и тип движения жидкости относительно этой поверхности. Важную роль в адгезии играет гидрофобность поверхности микробных клеток. [Van Loosdrecht, M.C.H., 1988]. Заряд поверхности также влияет на адгезию микроорганизмов. Так, отрицательный заряд ингибирует адгезию *P. fluorescens*, тогда как присутствие на поверхности субстрата катионов Fe^{3+} значительно увеличивает количество адгезированных анаэробных бактерии *Desulfomoniletiedjei*, *Syntrophomonaswolfei*, *Syntrophobacterwolinii* и *Desulfovibrio spp*. (клетки этих бактерий заряжены отрицательно) В процесс формирования БП вовлекается ряд биохимических и генетических механизмов (стадия возникновения «биопленочного» фенотипа) [Busalmen, J.P, 2001].

Дисперсия (выброс бактерий). Фаза высвобождения «свободноплавающих» (планктонных) микроорганизмов, что способствует распространению БП на новые поверхности. В результате деления от БП периодически отрываются отдельные клетки, способные через некоторое

время прикрепиться к поверхности и образовать новую колонию (рис.7) [Lebeaux, D., 2014].

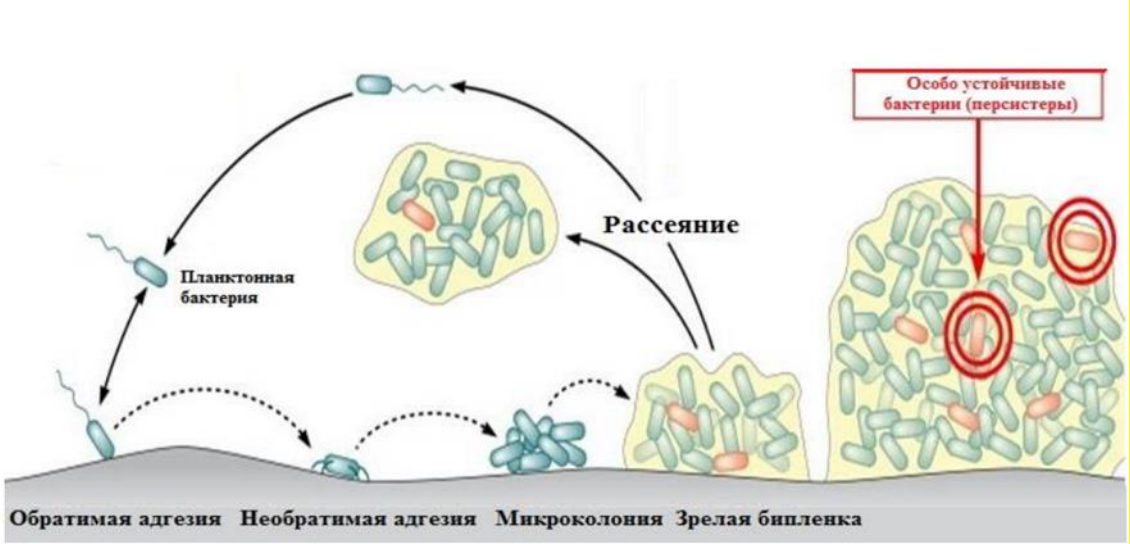


Рисунок 7 - Динамика развития биопленки [Марданова А.М., 2016; Lebeaux, D., 2014]

Важным условием для образования БП является наличие у бактерий жгутиков и пилей, обеспечивающих их подвижность. Ключевым фактором образования БП является адгезия или прикрепление бактерий к различным поверхностям [Flemming, H., 2010].

Также в развитии БП важным фактором является уровень подвижности бактерий, крайне необходимый на стадии фиксации к абиотическим поверхностям, а также облегчающий распространение БП путем «выплевывания» планктонных клеток во внешнюю среду. Структурными элементами бактериальной клетки для обеспечения подвижности являются пили, жгутики и курли или кудрявая форма амилоидных волокон [Balogu, T. V., 2014].

В результате жизнедеятельности нескольких микроорганизмов происходит «сливание» и уплотнение экзополисахаридных образований - созревание БП. В зрелой БП микроорганизмы долгое время могут существовать, не проявляя активность. Стадия дисперсии микроорганизмов при разрушении БП наступает при образовании клетками ферментов. Из БП

выходят планктонные клетки, которые образуют новые БП. Таким образом, цикл образования БП повторяется [Окулич, В.К., 2017].

Формирование БП сопровождается образованием ЭПМ, который вырабатывается самими клетками и является базовым структурным компонентом БП. ЭПМ составляет порядка 85% массы БП, а бактерии - 15% [Мальцев, С.В., 2011; Марданова, А.М., 2016].

Наиболее сложной и малоизученной стадией называют высвобождение планктонных культур из БП (дисперсия). Ряд исследователей предполагают, что причинами разрушения Бп и дисперсии микроорганизмов являются как внешние факторы, так и внутренние, к которым относится энзиматическая деградация, происходящая в результате снижения количества необходимых для развития микроорганизмов веществ и микроорганизмы переходят в планктонное состояние [Hunt, S.M., 2004; Petrova, O.E., 2016; Swaminathan, B., 2007].

На процесс формирования БП в значительной степени влияет доступность «пищевых» факторов, например, известна связь между общим составом жирных кислот и биоплёнкообразующей способности бактерий [Hunt, S.M., 2004].

1.5 Методы борьбы с микробными биопленками

Для управления ростом БП наибольшее распространение получили методы воздействия на начальные этапы их формирования как максимально эффективные, поскольку зрелые БП чрезвычайно устойчивы к ингибиторному действию экстремальных физико-химических факторов среды [Стрелкова, Е.А., 2013], антибиотиков [Стрелкова, Е. А., 2012], а также дезинфицирующих веществ и биоцидов [Плакунов, В.К., 2017; Saxena, P., 2018].

Изложенные выше данные подтверждают необходимость предотвращения формирования БП, поскольку зрелые Бп более устойчивы к повреждающим воздействиям. Второе важное обстоятельство состоит в определяющей роли ВПМ в этой устойчивости, следовательно,

антибиопленочные воздействия, в первую очередь, должны быть направлены на подавление синтеза или повреждение ВПМ, что делает биопленочные микроорганизмы чувствительными к обычным антимикробным агентам. [Плакунов, В. К., 2019б].

Основные антибиопленочные агенты нацелены на две главные мишени, определяющие устойчивость БП:

- подавление функционирования глобальных регуляторных систем, определяющих переход планктонных микробных популяций к «прикрепленному» способу существования, т.е. на предотвращение проявления «биопленочного» фенотипа;

- подавление синтеза или разрушение определенных компонентов ВПМ, играющих основную роль в сохранении устойчивой архитектуры БП [Емшанов, О.В., 2020; Roy, R., 2018; Zhou L., 2020; Brackman, G., 2015].

В последнее время приобрел популярность оригинальный подход, заключающийся в «перепрофилировании» уже широко используемых в разных областях медицины лекарственных средств путем использования их в качестве антибиопленочных агентов. При этом, концентрации некоторых препаратов, которые оказывали слабый эффект или не влияли вовсе на рост планктонных культур, могут ингибировать формирование БП. Среди таких веществ, перспективными представляются клиохинол, пипемидовая кислота, цефуроксим, два сурфактанта (тилоксапол и тонзониум бромид) и противовирусный препарат азидотимидин [Teteneva, N.A., 2020].

Другой подход в борьбе с формированием БП на производственных поверхностях состоит в модификации последних [Плакунов В. К., 2020]. Такая модификация может быть проведена с использованием полимеров и предусматривает придание антимикробных свойств поверхности [Çaykara, T., 2020], в том числе с использованием НЧ металлов (золота, серебра и пр.) [Joshi, A.S., 2020], оксидов металла [Shkodenko, L., 2020] и других соединений [Shepherd, J., 2020; Balhaddad, A.A., 2018]. Антимикробные пептиды также

показывают в некоторых случаях активность против биопленок [Patrulea, V., 2020].

Интересным направлением против патогенных микроорганизмов является применение пленкообразующих веществ. БП патогенов, в частности, листерий, образуются на поверхностях, но, если покрыть поверхность неким веществом, которое также образует пленку, и при этом имеет известный состав с антимикробными добавками, патогенные микроорганизмы будут ингибированы. Такие вещества называют активными пленками. Они могут представлять собой желатиновую матрицу с добавками биологически активных веществ. В качестве антимикробных добавок против БП *L. monocytogenes, S. aureus и B. cereus* могут быть также использованы бактериоцины и биофлавоноиды. Такие активные пленки может быть использованы и для покрытия поверхностей пищевых продуктов [Ibarguren, C., 2015].

Образуемые листериями БП имеют гетерогенную структуру, основным веществом которой является тейхоевая кислота. Эта кислота обладает свойством блокирования фаговых рецепторов [Brauge, T., 2015].

Рутин ингибирует образование БП *E. coli* пленкообразование. [Al-Shabib, N.A., 2017]. Способность к пленкообразованию у *Pseudomonas aeruginosa* существенно снижается при воздействии кларитромицином и его генериками [Терещенко, В.С., 2014].

Одним из направлений борьбы с БП является применение специфичных бактериофагов. Фаги способны инактивировать *Pseudomonas*, а кроме того, с использованием бактериофагов как агентов распознавания, возможно ускорить обнаружение и идентификацию псевдомонад [Yue, H., 2017; Kwiatek, M., 2017].

Микроорганизм порчи *Brochothrix thermosphacta* также обладает свойством пленкообразования. Обработка холодной плазмой после упаковывания мяса в МГА способствует разрушению БП, образуемых *B. thermosphacta* [Patange, A., 2017].

При упаковывании говядины с эфирными маслами тимьяна и розмарина в МГА, бактериальные клетки не отмирали *B. thermosphacta*, но образованная ими БП разрушалась [Nowak, A., 2012]

Важнымы факторами в борьбе с БП являются условия окружающей среды и воздействия. БП обладают свойством защищать микроорганизмы от внешних воздействий. Этот эффект осложняет борьбу с *Listeria monocytogenes*. Наиболее активное пленкообразование отмечалось в диапазоне температур от 8 ^{o}C до 32 ^{o}C, причем при повышении температуры окружающей среды образование БП интенсифицировалось. При недостаточной дезинфекции поверхностей БП не разрушаются, а находящиеся под ними микроорганизмы становятся причиной дальнейшей контаминации [Bridier, A., 2015; Пономарева, А.Л., 2016; Подволоцкая, А.Б., 2016].

Под защитой БП могут расти и развиваться сообщества разных микроорганизмов. Это явление было изучено на примере *Ralstonia indiosa*. Микроорганизм изначально был отнесен к роду *Pseudomonas*, но позднее вынесен как отдельный род. Ралстонии не являются патогенами, однако они получили название «мостиковых» микороорганизмов за то, что обладают свойством образовывать БП, ассоциированные с патогенными *Listeria*, *Salmonella* и энтерогеморрагическими *E. coli* [Liu, N.T., 2016].

Кампилобактерии также образуют БП: до 18% выделяемых штаммов обладают способностью образовывать БП. Однако в отношении них не отмечена корреляция между способностью к формированию БП и антибиотикорезистентностью. Считается, что подвижные штаммы кампилобактерий не образуют биопленки [Kim, Se-Hun., 2017].

Для борьбы с образованием БП предлагается также использовать природный антагонизм бактерий. Так, комменсальный коагулазоотрицательный стафилококк предотвращает образование БП патогенов, вызывающих мастит [Isaac, P. 2017].

1.6 ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 1

В условиях всё возрастающей численности населения в мире и глобализации в сфере производства продуктов питания и транснациональных поставок продовольствия проблема переноса и распространения пищевых инфекций постоянно возрастает. Эта проблема усугубляется еще и тем, что в производстве продуктов питания задействовано огромное количество людей и тем, что требуется разведение и содержание еще большего количества сельскохозяйственных животных и птицы. Патогенные микроорганизмы давно приспособились к обитанию, размножению и перемещению среди всех живых организмов и продолжают постоянно в этом эволюционировать.

Результаты наукометрического изучения научной литературы в отношении микробных контаминантов мяса показали рост публикационной активность ученых за последние 10 лет в отношении изучения опасных патогенных микроорганизмов, обнаруживающихся в мясе и мясных продуктах - *Listeria, Salmonella, Campylobacter*.

Ситуацию усугубляет тот факт, что практически все патогенные микроорганизмы могут расти и развиваться в составе БП, что значительно усложняет подходы к контролю и методам борьбы с ними.

Рассмотрены аспекты формирования БП патогенными микроорганизмами на предприятиях пищевой промышленности с точки зрения потенциальной опасности заражения и колонизации производственной среды биопленкообразующими штаммами. БП являются предпочтительной формой существования бактерий. В состоянии БП бактерии защищены от неблагоприятных факторов внешней среды и антибактериальных веществ, они часто устойчивы к стандартным процедурам очистки и дезинфекции. Образование БП на биотических и абиотических поверхностях является потенциальной опасностью, способствуя постоянной циркуляции патогенов в условиях пищевых производств и контаминации пищевой продукции. Проблема биопленкообразования характерна для всех пищевых предприятий.

Проведён анализ литературы о ДС, используемых для обеззараживания поверхности производственных помещений и технологического оборудования при производстве пищевой продукции. Показаны ограничения, существующие при их использовании. Наиболее востребованными остаются ДС с хлоактивными соединениями, ЧАС, перекисью водорода, НУК.

Рассмотрены сведения о строении и свойствах БП. Показано, что БП – это способ организации живых бактерий. Состав БП не постоянен и может меняться в зависимости от штамма, условий роста и доступности питательных веществ. Ключевым фактором образования БП является адгезия или прикрепление бактерий к различным поверхностям.

Продемонстрировано, что растущая резистентность микроорганизмов, в том числе в составе БП, к антибиотикам и дезинфектантам диктует необходимость выбора мер и средств при дезинфекции только на основании научных знаний и научной оценки последствий. В настоящее время в пищевой промышленности назрела острая необходимость пересмотреть существующие еще с прошлого века инструкции по санитарной обработке и дезинфекции и создать новую стратегию, основанную не на применении одного-двух дезсредств, а на комплексном подходе, эффективно сочетающем использование антимикробных материалов и биоцидных покрытий, препятствующих образованию БП микроорганизмами, физических методов обработки сред (воздуха, воды, пищевых систем и пр.) и химических и биохимических средств, ингибирующих микробную контаминацию объектов производственной среды, без формирования резистентных форм микроорганизмов.

На основании анализа современных научных знаний о микробиологических сообществах были сформулированы цели и задачи диссертационной работы, приведенные в разделе «Введение».

ГЛАВА 2. МЕТОДОЛОГИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Основные теоретические и экспериментальные исследования проведены в лаборатории «Гигиена производства и микробиология» ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

Общая схема проведения эксперимента приведена на рис. 8.

На первом этапе был осуществлен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы о современном состоянии микробиологических исследований в целях обеспечения пищевой безопасности, рассмотрены пути распространения микроорганизмов. На втором этапе сформированы методологические инструменты, для выполнения этапов анализа представленные на рис. 9, а также алгоритм проведения расширенного микробиологического профилирования предприятий.

Далее проведена апробация молекулярных методов определения патогенов, циркулирующих в производственной среде. Показана их высокая эффективность и целесообразность использования при оценке циркуляции патогенных микроорганизмов.

Следующий этап заключался в изучении микробного сообщества абиотических и биотических объектов производственной среды предприятий мясной и птицеперерабатывающей промышленностии. Исследованы сезонные изменения микробных сообществ, изучены закономерности их изменнений. Изучена контаминация абиотическх и биотических объектов отдельными патогенными микроорганизмами, продемонстрирована молеклярно-генетическая взаимосвязь патогенных микроорганизмов.

Рисунок 8 - Организационно-иерархическая структура диссертационной работы

Рисунок 9 – Методология идентификации микробиоты производств

Пятый этап заключался во всестороннем изучении БП пищевых производств *in vitro* с использованием различных методологических подходов. В результате выполнения данного этапа разработана методология идентификации, сбора и оценки наличия биопленочного фенотипа микробных контаминантов. Изучена устойчивость БП к воздействию дезинфектантов, полимерных комплексов и физических воздействий.

На заключительном этапе предложена схема реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности для применения на предприятиях мясной и птицеперерабатывающей промышленности.

2.1 Объекты исследований

В настоящей работе в качестве объектов исследований на разных этапах были:

- при апробации молекулярных методов обнаружения патогенов (LAMP)

- *L.monocytogenes:* говядина, свинина, полуфабрикаты из свинины, полуфабрикаты из говядины, мясные продукты; модельные образцы фарша из говядины, свинины, (по 1 образцу в 5 повторностях); штаммы *L. monocytogenes* 1 / 2a (ATCC BAA 679), 1 / 2b (ATCC BAA 839) и 4b (ATCC 13932) из

Американской коллекции типовых культур (Манассас, штат Вирджиния, США);

- ***Campylobacter spp:*** модельные образцы фарша из свинины и мяса кур (по 1 образцу в 5 повторностях); штаммы из Американской коллекции типовых культур (Манассас, Вирджиния, США (табл. 3); штаммы *Campylobacter spp.*, выделенные из объектов окружающей среды предприятий по переработке птицы.

Таблица 3 - Штаммы *Campylobacter spp.* из Американской коллекции типовых культур (Манассас, Вирджиния)

No	Штаммы микроорганизмов	Источник
1	*Bacillus cereus*	ATCC 11778
2	*Citrobacter freundii*	ATCC 43864
3	*Enterococcus faecalis*	ATCC 29212
4	*Escherichia coli*	ATCC 25922
5	*Klesiella pneumonia subsp. pneuonia*	ATCC 13883, NCTC 9633
6	*Proteus mirabilis*	ATCC 35659
7	*Pseudomonas aeruginosa*	ATCC 27853
8	*Salmonella enterica subsp.enterica serovar Typhimurium*	ATCC 14028
9	*Listeria innocua serotype 4a*	ATCC 33090, NCTC 11288
10 11 12	*Salmonella enterica subsp.enterica serovar Enteritidis* *C. jejuni subsp. jejuni* *C. coli*	11272 ATCC 8841 ATCC 33559

- смывы с объектов производственной среды на предприятиях по переработке птицы (152 образца) и мясоперерабатывающих предприятиях (156 образец) в Центральном регионе России.

- ***Salmonella spp:*** образцы свиного фарша, говядины и вареной колбасы;

- штаммы *Salmonella enterica subsp. Enterica serovar enteritidis* 11272, *Esherichia coli* ATCC 25922 и *Citrobacter freundii* ATCC 43864.

- при изучении микробного сообщества абиотических и биотических объектах производственной среды: образцы (смывы) планктонной и биопленочной микрофлоры, отобранные на предприятиях мясной и

птицеперерабатывающей промышленности Москвы, Московской области и Центрального региона России. Местами отбора проб были объекты производственной среды, отбиравшиеся по технологическому процессу от приемки сырья до выпуска готовой продукции и по типу (основное технологическое оборудование, вспомогательное оборудование, инвентарь, конструкции) (табл. 4).

Таблица 4 - Места отбора образцов для исследования планктонной микрофлоры

Производственное помещение (цех, отделение, участок)	Тип объекта производственной среды	Наименование объекта производственной среды	Шифр образца, присвоенный при отборе
1	2	3	4
Предприятие I (мясокомбинат)			
Убойный цех, участок ветеринарно-санитарной экспертизы свиных голов	Вспомогательное оборудование	Стол из нержавеющей стали для ветеринарно-санитарной экспертизы свиных голов	А20
		Вешала для свиных голов	А21
Участок обработки субпродуктов (ливера)	Технологическое оборудование	Моечный барабан непрерывного действия (станина из нержавеющей стали)	А3
	Вспомогательное оборудование	Транспортер подачи субпродуктов на обработку (лента из полимерного материала)	А2
		Стол из нержавеющей стали для приема и сортировки субпродуктов	А1
		Транспортер для перемещения обработанных и упакованных субпродуктов (лента из полимерного материала)	А10

Продолжение таблицы 4.

1	2	3	4
	Инвентарь	Инструмент из нержавеющей стали для направления и подачи субпродуктов	А9
		Шланг для мойки из полимерного материала	А4
		Фартук влагозащитный из ПВХ	А7
		Швабра из полимерного материала	А8
		Бак для сбора мусора	А13
Сырьевой цех	Сырье, поступающее на разделку, обвалку, жиловку	Свиная полутуша в шкуре (внешняя сторона)	А14
		Свиная полутуша в шкуре (внутренняя сторона)	А15
	Технологическое оборудование	Дисковая пила для распиловки свиных полутуш (центральная часть диска из нержавеющей стали)	А19
	Вспомогательное оборудование	Транспортер для подачи свиных полутуш на распиловку (лента из полимерного материала)	А6
		Стол для обвалки мяса из нержавеющей стали со столешницей из полимерного материала (полипропилен)	А5
		Транспортер для сбора жилованного мяса (лента из полимерного материала)	А11
		Раковина из нержавеющей стали для мытья рук (наружная поверхность сливной трубы)	А23
	Инвентарь	Перчатки кольчужные из нержавеющей стали	А12
		Нож обвалочный из нержавеющей стали с рукояткой из полимерного материала	А16
		Пластиковый контейнер (ящик) для сбора жилованного мяса	А17
		Емкость из полимерного материала для мытья полов	А25

Продолжение таблицы 4.

1	2	3	4
	Конструкции	Люк канализационный №1 (крышка из нержавеющей стали)	А22
		Люк канализационный №2 (крышка из нержавеющей стали)	А24
Отделение шоковой заморозки мясной продукции, участок загрузки в скороморозильные аппараты	Конструкция	Стена, окрашенная масляной краской (расстояние от пола 1,55-1,60 м)	А18
Предприятие II (птицекомбинат)			
Цех убоя и первичной обработки тушек, участок удаления пера	Конструкция	Стена, выложенная кафелем (расстояние от пола 1,55-1,60 м)	А37
Цех убоя и первичной обработки тушек, участок потрошения	Технологическое оборудование	Машина для удаления внутренностей (металлическая цепь)	А35
Участок охлаждения парных тушек	Технологическое оборудование	Ванна из нержавеющей стали для охлаждения тушек (внешняя поверхность корпуса)	А26
		Ванна из нержавеющей стали для охлаждения тушек (вода из ванной)	А39
	Вспомогательное оборудование	Конвейер в туннеле охлаждения тушек (цепь металлическая)	А29
		Тележка напольная (емкостью 200 л) для транспортирования сырья (колесо из полимерного материала)	А30
	Инвентарь	Пластиковый контейнер для сбора тушек	А27
	Конструкция	Стена, выложенная кафелем (расстояние от пола 1,55-1,60 м)	А28

Продолжение таблицы 4.

1	2	3	4
	Сырье	Тушки кур, упакованные в полиэтиленовые пакеты	С1
		Тушки кур, обработанные средством на основе надуксусной кислоты и перекиси водорода и упакованные в полиэтиленовые пакеты	С2
Цех разделки и упаковки мяса птицы	Технологическое оборудование	Машина для взвешивания и перенавески тушек (станина из нержавеющей стали)	А36
		Машина для обвалки бедра (мясной сок, скапливающийся на неподвижных металлических поверхностях)	А33
		Машина для обвалки бедра (станина из нержавеющей стали, без видимого загрязнения сырьем/мясным соком)	А34
		Оборудование для упаковки мяса птицы (подающая лента из полимерного материала)	А 31
	Вспомогательное оборудование	Стол из нержавеющей стали для формовки тушек перед упаковкой (доработка кожи шеи)	А32
		Кондиционер (фильтр из полимерных материалов)	А40
	Воздушная среда	Проба воздуха, собранная вакуумным насосом (смыв с фильтра из полимерного материала с размером пор не более 0,2 мкм)	А38
Предприятие III (МПЗ)			
Участок подготовки мясного сырья	Вспомогательное оборудование	Стол из нержавеющей стали для приемки и растаривания замороженных мясных блоков	III-1
		Стеллаж из нержавеющей стали для размещения и размораживания мясного сырья	III-2
		Гидравлическая тележка для транспортирования упакованных мясных блоков и поддонов	III-5

Окончание таблицы 4.

1	2	3	4
		Емкость из нержавеющей стали для размещения и размораживания мясного сырья	III-3
	Конструкция	Стена, окрашенная масляной краской (расстояние от пола1,55-1,60 м)	III-6
Сосисочный цех, машинное отделение	Технологическое оборудование	Пила ленточная (корпус из нержавеющей стали)	III-4
		Машина для измельчения замороженных мясных блоков (приемный стол из нержавеющей стали)	III-7
		Фаршемешалка (станина из нержавеющей стали)	III-13
		Фаршемешалка (корпус электродвигателя из нержавеющей стали)	III-16
		Шприц для формования сосисок (внутренняя сторона загрузочной воронки из нержавеющей стали)	III-17
		Шприц для формования сосисок (корпус из нержавеющей стали)	III-19
		Эмульситатор (внешняя сторона загрузочной воронки из нержавеющей стали)	III-8
		Льдогенератор (корпус из нержавеющей стали)	III-9
	Вспомогательное оборудование	Стол из нержавеющей стали (борт)	III-12
		Транспортер для подачи сырья (борт из нержавеющей стали)	III-14
		Транспортер для подачи сырья (цепь металлическая)	III-21
		Тележка напольная (емкостью 200 л) для транспортирования сырья (внешняя сторона)	III-15
	Инвентарь	Емкость на 620 л из полимерного материала (биг-бокс) для сырья	III-11
	Конструкция	Стена 1, выложенная кафелем (рядом со льдогенератором, расстояние от пола 1,55-1,60 м)	III-10
		Стена 2, выложенная кафелем (рядом со шприцом, расстояние от пола1,55-1,60 м)	III-18
Сосисочный цех, термическое отделение	Технологическое оборудование	Камера интенсивного охлаждения сосисок	III-20

- при исследовании контаминации абиотических и биотических объектов производственной среды отдельными патогенными микроорганизмами: *Campylobacter spp.* - 233 образцов с объектов производственной среды и продукции; *Listeria monocytogenes* - 2777 образцов мяса, в том числе мяса кур, также мясной продукции, в том числе из мяса птицы;

- при исследовании сезонных изменений микробных сообществ:

- 36 образцов (смывы) планктонной микрофлоры птицекомбината – А26-А37 (межсезонье), А83-А94 (зима) и А133-А144 (лето) (табл 5А).

Таблица 5А - Места отбора проб планктонных культур

Номер образца			Место отбора
Межсезонье	Зима	Лето	
А26	А83	А133	Ванна охлаждения 1
А27	А84	А134	Тара/чистая зона
А28	А85	А135	Стена 2/чистая зона
А29	А86	А136	Цепь тоннеля охлаждения
А30	А87	А137	Колесо тележки тоннеля охлаждения
А31	А88	А138	Лента/упаковка
А32	А89	А139	Стол
А33	А90	А140	Машина б/к бедра 1
А34	А91	А141	Машина б/к бедра 2ж
А35	А92	А142	Смыв с цепи конвейера субпродуктов
А36	А93	А143	Машина перенавески/ стойка
А37	А94	А144	Смыв со стены цеха ПП

- 26 образцов предположительно биопленочной микрофлоры птицекомбината – А42-А50 (межсезонье), А112-А118 (зима) и А146-А153 (лето) (табл. 5Б).

Таблица 5Б – Места отбора образцов для исследования биопленок

Номер образца			Место отбора
Межсезонье	Зима	Лето	
-*	А112	А145	Шнек ванны охлаждения
А 42	А113	А146	Со стока на полу под ванной Морриса
А43	А114	А147	Ступень/охлаждение
А44	А115	А148	Колесо тележки 1/упаковка
А45	А116	А149	Стена/охлаждение (в помещении для охлаждения тушек)
А46	А117	А150	Колеса тележки 2 /упаковка
А47	А118	А151	Трап цеха потрошения
А48	-	А152	Потолок/участок охлаждения
А49	-	А155	Тефлоновый ролик участка охлаждения
А50	-	А153	Потолок, цех потрошения
Примечание. * - не отбирался по техническим причинам			

Из образцов (смывов) планктонной и биопленочной микрофлоры были выделены 785 изолятов, из них:

- 48 штаммов были отобраны с объектов производственной среды птицекомбинатов и предприятий мясной промышленности для изучения их биопленкообразующей способности *in vitro,* 20 штаммов *Pseudomonas spp.;* 19 штаммов *Listeria spp*. (в том числе, культура №71, выделенная с внешней поверхности тележки для транспортирования сырья; культура №72, выделенная с конвейера для разделки мясного сырья; культура №73, изолированная с корпуса ленточной пилы, культура №76, выделенная из трапа), а также 9 штаммов *Salmonella spp*. (мясоперерабатывающие заводы);

-при изучении антибиотикорезистентности некоторых патогенных штаммов: 3 антибиоткоустойчивых штамма *Salmonella* spp, выделенных из мясной продукции;

-при изучении молекулярно-генетической взаимосвязи патогенных микроорганизмов, циркулирующих в производственной среде: *L. welshimeri и L. monocytogenes*, выделенные с объектов производственной среды мясоперерабатывающих предприятий;

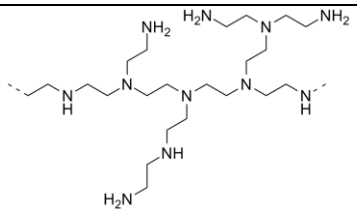
- при изучении микроскопического и таксономического состава БП: БП с объектов производственной среды МПЗ (табл.6);

Таблица 6 – Места обора БП на МПЗ

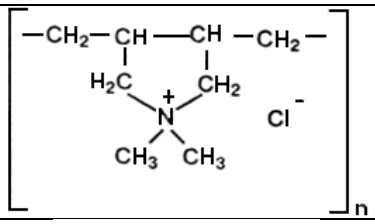
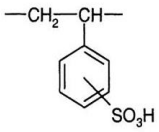
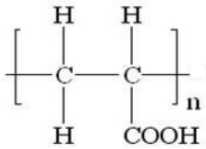
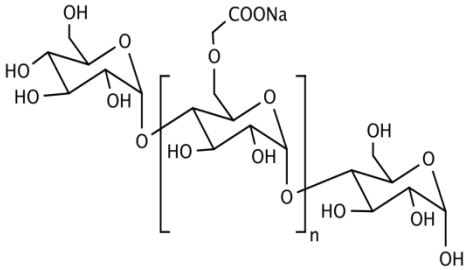
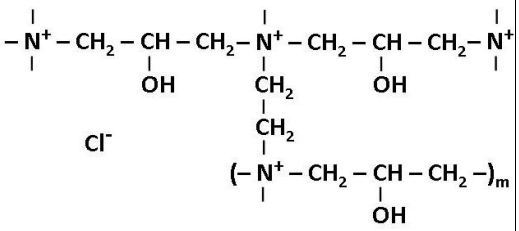
№ образца	Цех	Место отбора	Описание БП
1	Сырьевой	Стык стенки и разделочного стола	Плотная, толстая
2	Сырьевой	Сливной трап	Влажная, толстая
3	Сырьевой	Стык между плиток	Сухая
4	Формовочный	Вакуумный шприц, угол приемного стола	Влажная, тонкая
5	Формовочный	Вакуумный шприц, внутренняя поверхность загрузочной воронки	Кожистая, твёрдая

-при исследовании антимикробной активности поликатионных полимеров - поликатионные полимеры в виде водных 2 % растворов, предоставленные химическим факультетом МГУ им. М.В. Ломоносова (табл. 7).

Таблица 7 – Полимеры и их структурные формулы

Номер	Название полимера	Структурная формула полимера
1	2	3
1	Катионный полимер Разветвленный полиэтиленимин **ПЭИ**	
2	Катионный полимер Линейный сополимер эпихлоргидрина и диметиламина (каустамин) **РК**	$(-\overset{\vert}{\underset{\vert}{N^+}} - CH_2 - \underset{\vert}{CH} - CH_2 -)_n$ Cl^- OH

Окончание таблицы 7.

	1	2
3	Катионный полимер Полидиаллилдиметиламмоний хлорид **ПДАДМАХ**	
4	Анионный полимер Полистиролсульфокислота **ПССК**	
5	Анионный полимер Полиакриловая кислота **ПАК**	
6	Анионный полимер Карбоксиметилцеллюлоза, натриевая соль **КМЦ**	
7	Катионный полимер Разветвленный сополимер эпихлоргидрина и диметиламина **FL 2565**	

- при изучении антимикробной активности НЧ металлов, полученных методом лазерной абляции (золота (Au), серебра (Ag), меди (Cu)): штаммы *Pseudomonas aeruginosa, Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., выделенные с вспомогательного и технологического оборудования птицекомбината и МПЗ;

2.2 Методология и методы исследования

Ниже представлено описание методологии проведения микробиологических исследований и применявшиеся методы исследования на разных этапах выполнения работы:

Апробация молекулярных методов обнаружения патогенов (метод петлевой изотермической амплификации -LAMP)

Campylobacter* spp*:

- инклюзивность и эксклюзивность метода - штаммы *Campylobacter spp*. выращивали на кровяном агаре (BA). (Statens Serum Institute, Копенгаген, Дания) при 41,5 ° С в течение 48 часов в микроаэробных условиях (5% O2, 10% CO2, в 85% N2). Культуры центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 мин, дважды промывали 0,1% пептонной водой (PW, Oxoid) и ресуспендировали в 1 мл 0,1% PW (Oxoid), а затем смешивали (1:1:1) для приготовления суспензии из 3 штаммов (10^1 и 10^2 КОЕ /мл).

Нецелевые микроорганизмы выращивали на бульоне TSB при 37 °С в течение ночи в аэробных условиях.

- чувствительность метода - матрицы (модельные образцы фарша) с двумя уровнями инокуляции: высокий уровень инокуляции, приблизительно 100 КОЕ/25 г, и низкий уровень инокуляции приблизительно 10 КОЕ/25 г, а также неинокулированная матрица в качестве отрицательного контроля. После инокуляции, образцы тестировали двумя методами на наличие *Campylobacter spp*: микробиологическими и ПЦР. Также поступали при апробации тест-системы для объектов окружающей среды.

- ПЦР осуществлялась с помощью коммерческого набора на основе LAMP (3M Molecular Detection Assay 2 - Campylobacter; 3M) 25 г образца смешивали с 225 мл 3M Enrichment бульона (3M, США). Затем 20 мкл 3M бульона для обогащения добавляли в пробирку с лизисным раствором. Смесь нагревали в термоблоке (Германия, IKA) при 100 ° С в течение 15 мин с последующим немедленным охлаждением при комнатной температуре в холодильном блоке (3M, США) в течение 10 мин. После перемешивания путем переворачивания 20 мкл этого лизата смешивали с осадком в пробирке с реагентом из набора для анализа. Пробирку с реагентом помещали в систему молекулярного обнаружения (3M, США) для обнаружения клеток *Campylobacter* с помощью изотермической амплификации и биолюминесценции на 75 мин. Все анализы

включали отрицательные контроли и контроли реагентов для проверки эффективности системы молекулярного обнаружения.

- **микробиологический метод** согласно ГОСТ ISO 10272-1-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы обнаружения и подсчета бактерий *Campylobacter spp*. Часть 1 Метод обнаружения». Первичное обогащение 25 г образца проводили в селективной жидкой среде Bolton broth (CM 0983, OXOID) в две стадии. Первую стадию инкубирования проводили при температуре (37±2)°С в течение 4-6 ч, на второй стадии - при температуре (41,5±2)°С в течение (44±4) ч. После чего производили пересев на плотные селективные питательные среды (Preston agar и mCCD agar) и культивировали при температуре (41,5±2)°С в течение 44±4 ч в условиях МГА. Для создания МГА применяли коммерческие газогенераторы.

В результате культивирования получали изолированные колонии, которые идентифицировали с использованием коммерческих тест-систем Api (Biomeriuex, Франция).

Listeria monocytogenes:

- **инклюзивность и эксклюзивность метода** - серовары *L. monocytogenes* (3 штамма) были активированы в 10 мл триптоносоевого бульона. (TSB, Oxoid) в течение 24 ч при 37 °С. Культуры центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 мин, дважды промывали 0,1% пептонной водой (PW, Oxoid) и ресуспендировали в 1 мл 0,1% PW (Oxoid), а затем смешивали (1:1:1) для приготовления суспензии из 3 штаммов (10^1 и 10^2 КОЕ /мл).

Нецелевые микроорганизмы выращивали на бульоне TSB при 37 °С в течение ночи в аэробных условиях.

- **чувствительность метода** - для определения чувствительности использовали два уровня инокуляции матрицы: высокий уровень инокуляции приблизительно 100 КОЕ / 25 г и низкий уровень инокуляции, приблизительно 10 КОЕ/25 г., а также неинокулированная матрица в качестве отрицательного контроля. После инокуляции, образцы тестировали двумя методами на наличие

Listeria monocytogenes: микробиологическими и ПЦР. Также поступали при апробации тест-системы для объектов окружающей среды.

- **ПЦР** осуществлялась с помощью коммерческого набора на основе LAMP (3M Molecular Detection Assay *Listeria monocytogenes*; 3M) 25 г образца смешивали с 225 мл Fraser бульона (3M, США). Затем 20 мкл обогащенного бульона добавляли в пробирку с лизисным раствором. Смесь нагревали в термоблоке (Германия, IKA) при 100 °С в течение 15 мин с последующим немедленным охлаждением при комнатной температуре в холодильном блоке (3M, США) втечение 10 мин. После перемешивания путем переворачивания 20 мкл этого лизата смешивали с осадком в пробирке с реагентом из набора для анализа. Пробирку с реагентом помещали в систему молекулярного обнаружения (3M, США) для обнаружения клеток *Listeria monocytogenes* с помощью изотермической амплификации и биолюминесценции на 75 мин. Все анализы включали отрицательные контроли и контроли реагентов для проверки эффективности системы молекулярного обнаружения.

- **микробиологический метод** в соответствии с ГОСТ 32031 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*» -. 25 г образца гомогенизировали в 225 см^3 полуконцентрированного бульона Fraser бульона (Merck, Германия) и инкубировали при 30 °С в течение 24 часов. Затем 0,1 см^3 обогащенной культуры добавляли к 10 см^3 бульона Fraser (Merck, Германия) и культивировали при 37 °С в течение 48 часов. Из каждого бульона после окончания инкубации петлей 3 мм обогащенный материал наносили штрихами на хромогенный агар для листерий Агар ALOA (Agar Listeria Ottaviani-Agosti) (Merck, Германия) и селективный питательный агар для листерий PAL (ФБУН ГНЦ ПМБ, Россия). и инкубировали при 37 °С в течение 24–48 часов. Колонии, типичные *L. monocytogenes*, подтверждали с помощью биохимических тестов (Oxoid).

Salmonella* spp*:

- инклюзивность и эксклюзивность метода - серовары *Salmonella enterica subsp. Enterica serovar Enteritidis 11272* были активированы в 10 мл

триптоносоевого бульона. (TSB, Oxoid) в течение 24 ч при 37 °С. Культуры центрифугировали при 3500 об/мин в течение 10 мин, дважды промывали 0,1% пептонной водой (PW, Oxoid) и ресуспендировали в 1 мл 0,1% PW (Oxoid), а затем смешивали (1: 1: 1) для приготовления суспензии из 3 штаммов (10^1 и 10^2 КОЕ /мл).

Нецелевые микроорганизмы выращивали на бульоне TSB при 37 °С в течение ночи в аэробных условиях.

- **чувствительность метода** - для определения чувствительности использовали два уровня инокуляции матрицы: высокий уровень инокуляции приблизительно 100 КОЕ / 25 г и низкий уровень инокуляции, приблизительно 10 КОЕ/25 г., а также неинокулированная матрица в качестве отрицательного контроля. После инокуляции, образцы тестировали двумя методами на наличие *Salmonella*: микробиологическими и ПЦР. Также поступали при апробации тест-системы для объектов окружающей среды.

- **ПЦР** осуществлялась с помощью коммерческого набора на основе LAMP (3M Molecular Detection Assay *Salmonella*; 3M).

- **микробиологический метод** в соответствии с ГОСТ 31659-2012 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*».

Изучение микробного сообщества абиотических и биотических объектов производственной среды

- **для определения планктонных форм микробного сообщества** отбор смывов осуществляли стерильными губками с летиновым бульоном (3M Hydra-Sponge, США), а с труднодоступных мест – свабами (стерильными ватными тампонами) с летиновым бульоном (3M™ Swab-Sampler, США). Площадь смыва составляла около 100 $см^2$ (для ровных поверхностей использовали стерильные рамки-трафареты). После смыва губки или свабы асептически помещали в стерильный пакет. Пакет закрывали, исключая протекание.

- **для определения БП** перед смывами проводили тест на их наличие. Тест основан на реакции индикатора на основе пероксида водорода с

каталазой микроорганизмов, ферментом системы антиоксидантной защиты клетки. О наличии БП судили по реакции барботирования (ферментативном разрушении перекиси водорода до кислорода и воды с образованием микропузырьков) через 5-30 секунд после нанесения индикатора. После визуализации БП микроорганизмов проводили процедуру разрушения ЭПМ биоплёнки при помощи ферментного индикатора (стерильный раствор ферментов из группы карбогидраз), позволяющего растворять ЭПМ перед последующим проведением бактериологических смывов. Для этого ферментный индикатор локально наносили на поверхность путем распыления в количестве около 5 мл на 10 см^2 с расстояния 10-15 см. Процедуру забора образцов (смывов) проводили через 10 минут (время экспозиции) после нанесения ферментного индикатора без его предварительного смывания в местах исследуемого объекта общей площадью примерно 100 см^2.

- отбор БП для микроскопических исследований - образцы БП отбирали с технологического оборудования или поверхностей помещения путем соскабливания металлическим шпателем. Биологический материал сразу помещали в раствор глутарового альдегида (2.5% в какодилатном буфере) (для последующих электронно-микроскопических исследований).

- для определения *L.monocytogenes, Campylobacter spp, Salmonella spp* - свабы после смывов помещали в питательную среду бульона Фрейзера, обогатительного бульон (3М) и в забуференный питательный бульон соответственно. Пробы транспортировали не более 2 ч, в охлаждающем боксе при температуре от 1 °С до 4 °С и исследовали в лаборатории не позднее 24 ч. Для создания модифицированной газовой атмосферы в процессе транспортирования смывов *Campylobacter spp.* использовали газпакеты. Далее образцы исследовали методом LAMP, положительные пробы подтверждали соответствующими референс-методами.

- определение патогенных микроорганизмов в смывах, продукции - методом LAMP с использованием праймеров, позволяющих распознать различные участки гена (мишени) бактерий. Использовали наборы для

обнаружения: *L. monocytogenes*- 3M Molecular Detection Assay Listeria monocytogenes, для обнаружения *Salmonella spp*. - 3M Molecular Detection Assay *Salmonella,* для обнаружения *Campylobacter* - 3M Molecular Detection Assay *Campylobacter spp.* Для предварительного обогащения (накопления) бактерий в образец (пакет с губкой) в асептических условиях добавляли 225 мл среды: для накопления бактерий рода *Salmonella* – забуференной пептонной водой, для накопления *Listeria monocytogenes* – полуконцентрированного бульона Фрейзера, для накопления *Campylobacter spp* - среду обогащения для бактерий рода Campylobacter 3M. Полученную суспензию инкубировали в термостате при температуре 37,0±1,0 °С. Переносили 20 мм^3 обогащенной пробы в лизис-пробирку. В лизис-пробирку для отрицательного контроля вносили 20 мм^3 стерильной среды обогащения (забуференную пептонную воду, полуконцентрированный бульон Фразера и среду обогащения для бактерий рода Campylobacter 3M). Для лизирования клеток микроорганизмов штатив с пробирками помещали в нагревательный блок на 15±1 мин при температуре 100±1 °С. По истечении времени штатив с лизис-пробирками извлекали из нагревательного блока и помещали его на охлаждение в охладительный блок на 10±1 мин. Затем проводили амплификацию нуклеиновых кислот. Для этого на каждую пробу брали 1 пробирку с реагентом для амплификации из соответствующего набора (тест-набор для обнаружения бактерий рода *Salmonella*, тест-набор для обнаружения бактерий *L. monocytogenes*, тест-набор для обнаружения бактерий *Campylobacter spp*) и помещали в штатив для амплификации. Переносили с помощью микропипетки 20 мм^3 содержимого в реагент-пробирки. После растворения лиофилизированной смеси перемешивали лизат в пробирке с помощью пипетки. Полученные образцы помещали в прибор для дальнейшей амплификации. Все пробы, определенные как положительные по результатам молекулярного анализа, подтверждали проведением стандартных лабораторных исследований в соответствии с ГОСТ 31659 (ISO 6579:2002) «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*», ГОСТ

32031 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*» и ГОСТ ISO 10272-1-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы обнаружения и подсчета бактерий *Campylobacter spp*. Часть 1 Метод обнаружения».

-для определения КМАФАнМ в образцах (смывах) использовали плотную питательную неселективную среду PCA (Plate count agar) и после инкубации при (30,0±1,0) °С в течение 72 часов производили подсчёт всех выросших колоний. Результат выражали в КОЕ/см^2. Для определения идентификации состава мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (МАФАнМ) отбирали колонии с различными культурально-морфологическими признаками. Идентификацию выделенных бактериальных культур проводили сначала путём изучения морфологии колоний и бактериальных клеток, а затем культуральных и биохимических признаков, присущих микроорганизмам.

- **видовая идентификация отобранных микроорганизмов** - масс-спектрометрическим методом MALDI-Tof-Ms путем прямого бактериального профилирования с помощью времяпролётного масс-спектрометра «MALDI BiotyperMicroflex», с получением карты белковых масс, которая является специфичной характеристикой для каждого микроорганизма по типу «отпечатков пальцев». Бактериальную массу, полученную из изолированных микроорганизмов, наносили на мишень, после чего в течение 10 мин в каждую ячейку с образцом наносили по 1 мкл масс-спектрометрической матрицы HCCA (а-циано-4-гидроксикоричная кислота, 99%), затем подсушивали образцы с матрицей при комнатной температуре. Далее последовательно выполняли процедуру экстракции муравьиной кислотой и экстракции трифторуксусной кислотой. Исследуемые образцы на MALDI-мишень наносили следующим образом: с первой по третью ячейку каждого ряда вносили образцы, подготовленные методом прямого нанесения; с четвёртой по шестую – методом экстракции муравьиной кислотой; с седьмой по девятую – методом экстракции трифторуксусной кислотой. После помещения MALDI-

мишени, используя программу FlexControl (получение спектров) осуществляли запуск оборудования и проводили идентификацию микроорганизмов. Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения по величине логарифмического роста: в случае, если значение ниже 1.7 – микроорганизм не идентифицирован, от 1.7 до 2.0 – идентификация до рода, больше 2.0 – наиболее достоверные результаты, микроорганизм идентифицирован.

- определение резистентности патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам - диско-диффузионным методом по МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания». Для этого агар Мюллера-Хинтона разливали в стерильные пробирки по 9 мл, остужали до температуры 45-50 °С и вносили по 1 см^3 суспензии исследуемых микроорганизмов, содержащей 1,5*10^8 КОЕ/мл. Затем агар с исследуемыми микроорганизмами заливали в чашки Петри диаметром 90 мм и сверху помещали диски с антибиотиками. Чашки инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов, после этого измеряли зону ингибирования роста с точностью до 1 мм. Устойчивость микроорганизмов классифицировали в соответствии с Performance standards foranti microbial susceptibility testing. CLSI - ClinicalLabStandardsInstitute, 2016.

- определение способности к биопленкообразованию – *in vitro* в микротитровальных планшетах. Для этого ночную бульонную культуру бактерий, разводили 1:100 в свежей питательной среде и вносили по 100-150 мкл в лунки 96-ти луночного плоскодонного полистиролового планшета. После инкубации в термостате при 37° С во влажной камере, интенсивность роста культуры оценивали в фотометре при длине волны 540 нм. Затем удаляли планктонные клетки и в лунки вносили по 100-150 мкл 0,1% раствора кристаллвиолета (или генцианвиолет) с экспозицией 1 час, для окраски сформировавшихся БП. После окраски БП трижды промывали дистиллированной водой с последующим внесением по 100-150 мкл 96%

этанола для экстракции связавшегося с БП красителя. По истечении 1 часа интенсивность, экстрагированного спиртом, красителя измеряли на фотометре при длине волны 540 нм. Полученные результаты обрабатывали в программе Excel. Вычисляли среднее арифметическое значение из 3 лунок и строили гистограммы. Контролем служили лунки, заполненные стерильным бульоном. Превышение оптической плотности кристаллвиолета над контролем свидетельствовало об образовании бактериями биопленок. Для максимально реалистической модели образования БП использованы температурные режимы и временные рамки, характерные для производственных помещений пищевых производств.

- микроскопические исследования БП*:

флюоресцентная и сканирующая электронная микроскопия - использовалась для качественной оценки способности микроорганизмов формировать БП *in vitro*, их визуализации и описании морфологии.

Исследуемые образцы БП выращивали на твердых поверхностях и красили флуоресцентными красителями. Затем изучали с помощью микроскопа с соответствующими фильтрами. Световую микроскопию с флуоресцентным объективом проводили на NikonEclipseNi.

- просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия (ТЭМ) - микроскопические исследования ультраструктурной организации БП, с применением их ультратонких срезов, выделенных на пищевых предприятиях. Образцы БП, отобранные для электронной микроскопии, фиксировали раствором 2.5% глутарового альдегида в какодилатном буфере (0.05 М раствор какодилата натрия, pH 7.0-7.5) и выдерживали в течение суток при 4°С; затем трижды промывали тем же буферным раствором в течение 5 мин и фиксировали в растворе 1% OsSO4 и 0.7% рутениевого красного в какодилатном буфере 1.5 ч при 4°С.

После фиксации образцы заключали в 2% агар-агар и последовательно выдерживали в 3% растворе уранилацетата в 30% этиловом спирте в течение 4 ч, далее в 70% этаноле в течение 12 ч при 4°С. Материал обезвоживали в 96%

этиловом спирте (2 раза по 15 мин), затем в абсолютном ацетоне (3 раза по 10 мин). Образцы пропитывали смолой ЭПОН-812 (Epoxy Embedding Medium Эпон® 812, Sigma-Aldrich, США) выдерживали в смеси смола: ацетон в соотношении 1:1 в течение 1 ч, затем в смеси смола: ацетон в соотношении 2:1 в течение 1 ч. Полученный материал заливали в капсулы со смолой и проводили полимеризацию при температуре 37°С в течение суток, затем при 60°С в течение суток. Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-III (LKB, Швеция) и контрастировали в водном растворе 3% уранилацетата (30 мин), затем в водном растворе 4% цитрата свинца (30 мин).

Для выявления кислых мукополисахаридов в составе БП использовали краситель рутениевый красный (Sigma, США), при его внесении в количестве 0.7% вместе с OsO4, с которым он взаимодействовал.

Полученные препараты анализировали с помощью электронного микроскопа JEM 100CXП (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ и рабочем увеличении 5000 - 50 000. Фотодокументирование материалов проводили с помощью цифровой системы вывода оптических изображений MoradaG2.

-таксономический состав микроорганизмов - с помощью метода высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рРНК, полученных с помощью ПЦР с «универсальными» праймерами из метагеномной ДНК. Для экстракции суммарной ДНК из смывов с производственных поверхностей, содержащих малое количество бактерий, была применена модифицированная методика щелочного выделения ДНК Бирнбойма-Доли и Wizard-технологии фирмы Promega (США).Для проверки пригодности выделенной ДНК для проведения амплификации (целостности ДНК-матрицы) использовали пару универсальных праймеров 11f 5′-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3′ и 519r 5′-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3′ (Lane 1991), нуклеотидная последовательность которых специфична нуклеотидной последовательности фрагмента гена 16S рРНК. Амплификацию ДНК

проводили методом end-point ПЦР (полимеразной цепной реакции) на ДНК-амплификаторе “Tetrad2” (BioRad, США).Объем амплификационной смеси составлял 50 мкл и имел следующий состав: 1х буфер ДНК полимеразы BioTaq (17 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 67 мМTris-HCl, pH 8.8, 2 мММgCl_2); по 12.5 нмоль каждого из dNTP, 50 нг ДНК-матрицы; по 5 пмоль соответствующих праймеров и 3 ед. ДНК полимеразы Taq.Температурно-временной профиль ПЦР был следующим: первый цикл – 94 ^oC х 9 мин, 55 ^oC х 1 мин, 72 ^oC х 2 мин; последующие 30 циклов – 94 ^oC х 1 мин, 55 ^oC х 1 мин, 72 ^oC х 2 мин; завершающий цикл – 72 ^oC х 7 мин. Анализ продуктов ПЦР проводили при помощи электрофореза в 1% геле агарозы при напряженности электрического поля 6 В/см. Фотодокументацию результатов ПЦР осуществляли на трансиллюминаторе BioDocAnalyze (Biometra, Germany). Для обработки оцифрованной информации использовали пакет AdobeFotoshop.

Экстракцию метагеномной ДНК из образцов производственных БП осуществляли с помощью наборов DNeasyPowerSoilKit (Qiagen) согласно протоколам производителя. Измерение содержания суммарной ДНК из БП производили на спектрофотометре SmartSpec 3000 (BioRad, USA). Для определения таксономического состава микроорганизмов в исследуемых образцах на 1-м этапе с помощью вырожденных праймеров для каждого препарата метагеномной ДНК были получены ПЦР-фрагменты вариабельного фрагмента гена 16S рРНК. Использовались следующие праймеры:

341F_IL CCTACGGGNBGCASCAG

806R_IL GGACTACNVGGGTWTCTAATCC.

Реакционную смесь для каждого образца собирали в тонкостенных пробирках объемом 0.5 мл. В пробирку вносили следующие компоненты, перемешивая содержимое после внесения каждого компонента: 19 мклMilli-Q воды, 10 мкл 5X буфера для ПЦР, по 5 мкл раствора пары праймеров с концентрацией каждого 10 пмоль/мкл, 5 мкл 25 мМ раствора MgCl2, 0.5 мкл раствора метагеномной ДНК, 0.5 мклGoTag ДНК полимеразы (Promega). Реакцию ПЦР-амплификации проводили в термоциклере “Tetrad2” (BioRad,

США). Температурно-временной профиль ПЦР: (1) денатурация 94 °C – 2 мин; (2) денатурация 94 °C – 30 сек; (3) отжиг праймеров 65 °C – 30 сек; (4) элонгация цепи 72 ºC – 1 мин; стадии 2-4 повторяли 25 циклов; (5) элонгация цепи 72 °C – 5 мин; (6) последующая инкубация при +10 °C.По окончании ПЦР отбирали 5 мкл реакционной смеси и анализировали образование ПЦР продуктов ожидаемого размера с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. Полученные ПЦР фрагменты очищали от компонентов реакционной смеси с помощью магнитных шариков AmpureXP (BeckmanCoulter) согласно протоколам производителя.

На 2-м этапе к полученным ПЦР-фрагментам довешивали специальные адаптеры, необходимые для дальнейшего бар-кодирования ПЦР-фрагментов. Сначала проводили ПЦР-амплификацию с праймерами:

341F_ILCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCAGCCTACGGGNBGCASCAG

806R_ILGTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACNVGGGTWTCTAATCC

Реакционную смесь для каждого образца собирали в тонкостенных пробирках объемом 0.5 мл. В пробирку вносили следующие компоненты, перемешивая содержимое после внесения каждого компонента: 19 мклMilli-Q воды, 10 мкл 5X буфера для ПЦР, по 5 мкл раствора пары праймеров с концентрацией 10 пмоль/мкл, 5 мкл 25 мМ раствора MgCl2, 5 мкл ранее полученного ПЦР-фрагмента, 0.5 мклGoTag ДНК полимеразу (Promega). Реакцию GWH-амплификации проводили в термоциклере “Tetrad2” (BioRad, США). Температурно-временной профиль ПЦР: (1) денатурация 94 °C – 2 мин; (2) денатурация 94 °C – 30 сек; (3) отжиг праймеров 65 °C – 30 сек; (4) элонгация цепи 72 °C – 1 мин; стадии 2-4 повторяли 10 циклов; (5) элонгация цепи 72 °C – 5 мин; (6) последующая инкубация при +10 °C. Полученные ПЦР-фрагменты очищали с помощью магнитных шариков AmpureXP в соответствие с рекомендациями производителя. Измерение концентрации очищенных ПЦР-фрагментов проводили на флуориметре Qubit

(ThermoFisherScientific). Баркодирования полученных ПЦР фрагментов проводили по стандартной методике с использованием наборов Nextera XT IndexKit (Illumina). Секвенирование осуществляли на приборе MiSeq фирмы Иллюмина (Illumina)с использованием наборов MiseqReagentKit V3 (600-циклов, чтение с двух концов). Используемый набор позволял просеквенировать фрагменты длиной 500 нт в результате прочтения с каждого конца по 300 нт.

На следующем этапе полученные данные обрабатывали с помощью методов биоинформатики. Парные пересекающиеся чтения объединяли с помощью программы Flash. Затем были удалены низкокачественные чтения и была выполнена кластеризация всех полученных последовательностей вместе программой UsearchV11. Для определения размера кластеров (оперативных таксономических единиц, OTE) в каждом образце, все исходные объединенные чтения, включая синглтоны и низкокачественные прочтения, накладывались на репрезентативные последовательности OTE с минимальной 97% идентичностью на всей длине, с помощью Usearch. Индексы биоразнообразия определяли с помощью пакета Usearch v11.

- анализ геномов мультирезистентных штаммов патогенных микроорганизмов - с помощью методов высокопроизводительного секвенирования:

выделение ДНК и её секвенирование- единичной колонией штамма *Salmonella spp.* инокулировали 5 мл среды LB (Лури-Бертрани) и выращивали в шейкере инкубаторе New Brunswick C-24 при 30 ºС в течение 16-20 часов. Осадок клеток отделяли центрифугированием с помощью центрифуги Eppendorf minispin при 10 000 об/мин в течение 5 минут. Общую ДНК выделяли с помощью набора DNeasy PowerSoilKit (Qiagen), в соответствии с рекомендациями производителя. Концентрацию ДНК определяли с помощью набора dsDNA HS AssayKit Q32854 (Invitrogen) на флуориметре Qubit (Invitrogen).

Для секвенирования геномов штаммов *Salmonella spp.* использовали технологии Illumina (Illumina) и мономолекулярного нанопорового секвенирования (Oxford Nanopore).

200 нг геномной ДНК дробили на ультразвуковом гомогенезаторе Bioruptor UCD 200 (Diagenode) при минимальной мощности в течение 10 минут 5 циклов 30 сек (вкл)/90сек (выкл). Парные библиотеки ДНК (300x2) получали с помощью набора NEBNext® Ultra™ II DNA LibraryPrepKit (NEB), согласно условиям производителя. Количество и качество полученных библиотек определяли с помощью системы капиллярного электрофореза Bioanalyzer 2100 (Agilent). Полученные библиотеки ДНК секвенировали на приборе MiSeq (Illumina), используя набор MiSeqReagentKit v3 (600-cycle) (Illumina).

Дополнительно геномную ДНК секвенировали с помощью системы MinION (OxfordNanopore). Библиотеки ДНК получали с помощью набора Ligation Sequencing Kit 1 D (SQK-LSK109) (Oxford Nanopore), пропуская первоначальную стадию дробления геномной ДНК и далее следуя условиям производителя. Концентрацию ДНК библиотек определяли с помощью набора dsDNA HS AssayKitQ32854 (Invitrogen) на флуориметре Qubit (Invitrogen). К полученным библиотекам ДНК (1,5 мкг) добавляли RBF буфер и шарики для нанесения библиотек. Полученную смесь наносили на заранее промытую ячейку MinIon FlowCell (OxfordNanopore), секвенирование проводили в течение 48 часов.

биоинформатические методы

Для сборки контигов из всех чтений Illumina и Nanopore использовали программу Unicycler v. 0.4.8.

На следующем этапе с помощью программы flash (Magocand Salzberg 2011) объединялись полученные на MiSeq (Illumina) парные пересекающиеся чтения и с помощью программы Sickle обрезались некачественные концы чтений. Полная последовательность генома была собрана из полученных на MiSeq и MinION прочтений с помощью программы Flye 2.7 (Kolmogorovetal.,

2019) и откорректирована illumina чтениями 2 раза с помощью pilon 1.22 (Bruceet. al. 2014). Полученные контиги депонировали в GenBank (NCBI).

Идентификацию генов и теоретическое предсказание их функций проводили с использованием сервера RAST [Aziz, R.K., 2008; Overbeek, R., 2014].

Для поиска генов, гомологичных генам антибиотической устойчивости использовали базы данных The Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (McArthurA.G. 2006). Для поиска интегронов (XXXXX). Для определения типа плазмид базу данных PlasmidFinder 2.1 Server (Carattolietal., 2014). Для поиска профагов сервер Phage Search Tool Enhanced Release (PHASTER) (XXXXX) Для определения островков патогенности SPIFinder 2.0 (XXXXX).

- анализ генетического разнообразия *Listeria spp.*, циркулирующих в производственной среде:

мультилокусное секвенирование

Исследование культур с помощью мультилокусного секвенирования, включавшего анализ 7 генов домашнего хозяйства и 4 генов вирулентности (MLST, Multi Locus Sequence Typing, и MvLST, Multi-virulent-locus sequence typing), проводили, как описано ранее [12].

Анализ аллелей MLST и аллельных профилей (ST, Sequence Type) выполняли с помощью ресурсов Bacteria l Isolate Genome Sequence Database for *L. monocytogenes* (BIGSdb-Lm) (https://bigsdb.pasteur.fr/listeria/) [13]. Проанализированные изоляты и новые аллельные профили депонировали в базе данных сайта:ID49188 -49201, 49206.

Полногеномное секвенирование изолятов *L. welshimeri* GIMC2049:LmcC11 иGIMC2051:LmcC15, выполняли на платформе MiSeq Illumina (картриджMiSeqv2ReagentKit 300 cycles, Illumina, San Diego, CA, USA). Для приготовления библиотек фрагментов использовали набор KAPA HyperPlus (Roche, Basel, Switzerland). Качество и размер библиотек оценивали с помощью электрофореза на чипах High Sensitivity DNA Chips на приборе

2100 Bioanalyzer System (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Результаты секвенирования (Sequence Read Archive, SRA) депонировали в GenBank NCBI (BioProject ID:PRJNA658237).

- исследование сезонных изменений микробных сообществ:

отбор БП с объектов производственной среды – путем соскабливания металлическим шпателем образцов с абиотических поверхностей. Материал отбирали, в том числе и в труднодоступных для санитарной обработки местах. Образцы помещали в стерильные одноразовые пробирки (3 пробирки: 1-я - для исследования классическими микробиологическими методами, 2-я - для исследования молекулярно-генетическими методами (16S), 3-я-для исследования электронной микроскопией) закрывали и при температуре +2 °С в течение 2 ч транспортировали в лабораторию для проведения исследования. При отборе образцов для исследования электронной микроскопией образцы сразу помещали в пробирку с 2,5% раствором глутарового альдегида в какодилатном буфере (0,05 М раствор какодилата натрия, pH 7.0-7.5);

- определение микробного сообщества нативных БП - осуществляли после разрушения экзополисахаридного матрикса БП с применением мультиферментного средства (BFR-enzymofilm) для освобождения бактериальных клеток с последующим бактериологическим посевом. Ферментный препарат представлял собой стерильный раствор, содержащий смесь специальных энзимов из группы карбогидраз. В каждую пробирку с отобранным образцом вносили 1 мл BFR-enzymofilm. После внесения препарата время экспозиции составляло 10 мин. Затем пробу тщательно перемешивали и классическими микробиологическими методами производили рассев на дифференциально-диагностические среды с последующей идентификацией выделенных микроорганизмов методом MALDI-Tof-Ms для определения сапротрофных микроорганизмов; определение патогенных микроорганизмов проводили методом ПЦР, описанным выше;

-исследование модельных БП бактерий по показателям устойчивости к дезинфектантам разных групп – по следующей методике. ночные культуры выращенные на богатой среде LB (Miller, Luria-Bertani, USA) (1 петля культуры на 5 мл среды в пробирке типа Фалькон объёмом 50 мл) использовали в качестве инокулята для выращивания клеток стационарной фазы роста на жидкой среде LB (50 мл в колбах объемом 250 мл на роторном шейкере при температуре 28°С). Далее для получения бинарной культуры смешивали культуральные жидкости штаммов в стерильном эппендорфе (2 мл) в соотношении 3:1 и использовали в качестве инокулята для получения бинарной БП. Перед нанесением на стекловолоконный фильтр для выращивания БП все культуральные жидкости доводили до стандартного значения по ОП=0.5-0.7. Далее инокуляты клеток (*E. coli, S.aureus* и бинарной культуры) объемом 20 мкл наносили на стекловолоконные фильтры (WATMAN, USA), размером 1.5см×1.5см, и выращивали в термостатной комнате при 28°С в течении 9-х суток. На 2-е и 9-е сутки фильтры с БП обрабатывали рассчитанными дозами дезинфицирующих средств: Фудлекс OXY – 0,2% (перекись водорода (H_2O_2) не менее 4,0 %, надмолочная кислота не менее 3,0%, другие органические кислоты не менее 20,0 %), ДИМАКС хлор – 0,152% (натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты) , БФР Биоцид Энзим – 0,5%, 0,25%, 0,125% (дидецилдиметламмониум хлорид (6,0%), N,N-бис(3аминопропил)додециламин (3,0%), бензалкониум хлорид (8,0%), смесь ферментов (амилаза, липаза, протеаза 3-5%), полиферментная субстанция «Enzymix», содержащую смесь ферментов группы карбогидраз 3-5%). Наносили в количестве 100 мкл на каждый фильтр до полного промачивания фильтра. Выдерживали время воздействия в течение 10 и 30 мин. Затем фильтры диспергировали в 10 мл физраствора на приборе IKA ULTRA-TURRAX TubeDrive (Германия). После диспергирования полученную суспензию использовали для приготовления серии разведений. Из каждого разведения делали высев в количестве 5-6 повторностей.

Для получения бинарной планктонной культуры суспензии стационарных клеток *S.aureus* и *E.coli* смешивали в соотношения 3:1 и 6:1, соответственно, для получения аликвоты 1% по объёму от жидкой среды LB (50 мл). Далее культивировали полученные бинарные культуры и монокультуры в колбах объемом 250 мл на роторном шейкере при температуре 28 °С до стационарной фазы роста (1 сут). Затем добавляли исследуемые дезинфектанты до конечных концентраций, и выдерживали в течение 10 и 30 мин при температуре 28 °С. Сразу после окончания времени воздействия готовили серию десятичных разведений. Из каждого разведения делали высев в количестве 5-6 повторностей. О количестве жизнеспособных клеток судили по титру колониеобразующих единиц (КОЕ/мл), определяемому с помощью высева на плотную агаризованную среду LB. Подсчет числа КОЕ/мл производили по формуле

$$N = \frac{n_1 + \cdots n_5}{5} \times 200 \times 10^x$$

где n1-n5 – число КОЕ в каждой из повторностей; 10x – соответствующее разведение.

- сравнительные исследования свойств антимикробных материалов на планктонных культурах:

метод серийных разведений. Для исследования штамм *Pseudomonas aeruginosa* оживляли в TSB при температуре 37 °С в течение 18-20 часов. После инкубирования 1 мл бактериальной культуры откручивали на центрифуге, супернатант сливали, а из полученных клеток готовили суспензию в концентрации $1x10^7$ путем сравнения образца со стандартом мутности MacFarland. К бульонной культуре изучаемых штаммов добавили полимеры в соотношении 1:1 и инкубировали в термостате в течение 5,5 и 24 часов при температуре 37 °С. В качестве контроля использовали образцы без добавления полимеров (к ним добавляли физиологический раствор). Для изучения антимикробной активности полимеров на каждой точке исследования проводили десятикратные разведения и делали высев на чашки

Петри по 30 мкл каждого разведения. Чашки Петри делили на сектора в соответствии с десятикратными разведениями исходной суспензии. Посевы инкубировали при температуре 37 °С в течение 24 часов, по истечении времени инкубации подсчитывали количество выросших колоний;

изучение антибактериальных свойств полимеров на формирование БП. На кусочки предметного стекла площадью 1 см^2 наносили полимеры. Сушили в термостате при 37 ºС до образования на поверхности стекла пленки из полимера. Далее стекло погружали в бульонную культуру *L. monocytogenes* инкубировали при 37 ºС в течение 18 часов для формирования БП. После инкубации делали смывы и определяли КОЕ. Контролем служили подложки без полимеров.

- изучение антибактериальных свойств материалов с НЧ на формирование БП - на подложки с НЧ наносили бульонную бактериальную культуру и инкубировали в термостате при температуре и времени, необходимом для того или иного микроорганизма. Далее делали смывы для определения КОЕ. Контролем эксперимента служил смыв с подложки без наноструктур на поверхности.

- изучение антибактериальных свойств материалов с НЧ на сформированные БП. На стерильных стеклах одинакового размера в течение 24 часов выращивали БП патогенных микроорганизмов. Затем образцы стекол с прикрепленными на их поверхности суточными БП переносили на лазерное устройство и напыляли НЧ серебра, меди и золота. Перенос металлических пленок в виде НЧ на бактериальные БП осуществляли с помощью волоконного наносекундного лазера HTF MARK (Булат) на ионах $Yb3^+$ (длина волны: 1064 нм, длительность импульса на полувысоте: 120 нс, максимальная энергия в импульсе: 1мДж, частота повторения импульсов до 80 кГц). Излучение фокусировалось гальвано-сканнером с фокусным расстоянием объектива 160 мм (рис. 10).

Пластик с напыленной на него тонкой (≈120 нм) металлической (Au, Ag, Cu) пленкой подвергали воздействию лазерного излучения с энергией в

импульсе: 0.2 мДж, частотой следования импульса: 20 кГц и скоростью сканирования: 1500 мм/с. Минимальный размер пятна фокусировки при этом составлял ≈80 мкм. Расстояние между мишенью и стеклом с биопленкой: 2 мм.

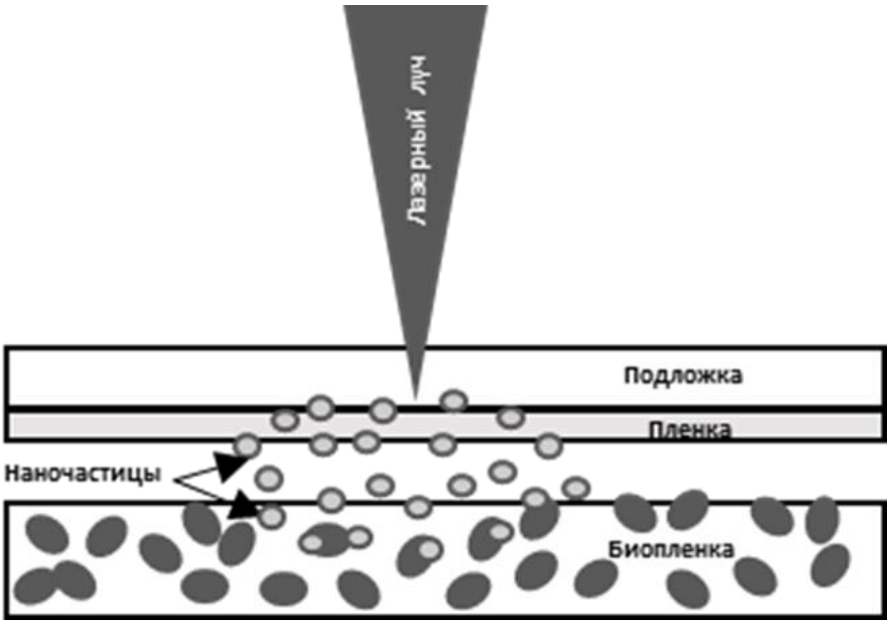


Рисунок 10 – Принципиальная схема аппликационного лазерного переноса НЧ с прозрачной подложки на БП патогенных микроорганизмов

Излучение фокусировалось на пленке. Возникающий в результате абляции расплав из НЧ отлетал от мишени и попадал на стеклянную подложку с БП, где в итоге образовывались скопления НЧ. Прозрачная пластиковая подложка позволяла использовать для переноса НЧ из металлической пленки относительно низкоинтенсивное импульсное лазерное излучение, слабо нагревающее эти НЧ.

После переноса НЧ, стёкла с БП переносили в пробирки с физиологическим раствором ДНК-азы и интенсивно встряхивали на шейкере в течение 1 часа. Под воздействием ДНК-азы матрикс БП разрушали, клетки бактерий оставались невредимыми. Затем полученную суспензию титровали стандартным микробиологическим методом и для определения КОЕ высевали на твердую питательную среду.

- **визуализация воздействия полимеров и материалов с НЧ** – с использованием флуоресцентной микроскопии. Образцы после инкубации красили флуоресцентными красками Live/Dead BiofilmViability Kit (ThermoFisher, USA). Световую микроскопию с флуоресцентным объективом проводили на Nikon*EclipseNi*.

ГЛАВА 3. АПРОБАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПАТОГЕНОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЕ

Традиционные методы выявления патогенных микроорганизмов, основанные на длительном и этапном культивировании, являются надежными, но трудоемкими и длительными. Появление молекулярных методов, таких как ПЦР, позволило преодолеть эти ограничения. Внедрение высокоспецифичных методов анализа и экспрессных тест-систем в официальные схемы санитарно-микробиологического контроля пищевых продуктов становится экономической необходимостью. Методы на основе ПЦР позволяют проводить быструю оценку распространенности пищевых патогенов в различных пищевых матрицах и объектах производственной среды. Кроме того, молекулярные методы выявления и обнаружения патогенов пищевого происхождения более чувствительны [Abdulmawjood, A., 2016].

На данном этапе работы решалась задача по оценке эффективности метода на основе LAMP с биолюминесценцией (3M ™ Molecular Detection System (MDS)) для быстрого обнаружения *Listeria monocytogenes, Campylobacter spp, Salmonella spp.,* в пищевых продуктах в сравнении со стандартными классическими методами на различных пищевых матрицах: мясо (говядина, свинина, мясо кур) и мясная продукция, а также на объектах производственной среды.

3.1 Оценка эффективности метода Lamp для определения *Listeria monocytogenes*

Вспышки листериоза наблюдались во многих странах, включая Японию, США и страны Европы[5] [European Food Safety Authority, 2011].

[5] Материал, изложенный в данном разделе, опубликован в статье :Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of L. monocytogenes in meat / Y. Yushina, A. Makhova, E. Zayko, D. Bataeva // Potravinarstvo. – 2019. – Vol. 13. – No 1. – P. 800-805. – DOI 10.5219/1165. Q3, IF 0.26

.

Инфекции человека, вызываемые *L. monocytogenes,* стали глобальной проблемой для здоровья. Присутствие *L. monocytogenes* на абиотических объектах и в сырье на предприятиях мясной промышленности может быть причиной перекрестного заражения пищевых продуктов, и определяет необходимость в применении методов быстрого обнаружения данного патогена [Warriner, K., 2009].

Оценку эффективности экспресс-метода LAMP для обнаружения *L. monocytogenes* проводили в два этапа. На первом этапе оценивали чувствительность и специфичность наборов на основе LAMP для обнаружения *L. monocytogenes.* Определение специфичности складывалось из изучения инклюзивности и эксклюзивности метода на штаммах микроорганизмов. На искусственно контаминированных и нативных образцах для метода LAMP устанавливали количество истинно положительных (Tpos) и истинно отрицательных (Tneg) образцов, соответственно, в сравнении с методом по ГОСТ 32031. Чувствительность и специфичность рассчитывали по формулам:

Чувствительность = [Tpos / (Tpos + Fpos)] (1)

Специфичность = [Tneg / (Tneg + Fneg)] (2)

где TPos и TNeg - положительные и отрицательные образцы, соответственно, подтвержденные как по ГОСТ 32031, так и коммерческим набором на основе LAMP, а Fpos и Fneg - положительные и отрицательные образцы, соответственно, подтвержденные коммерческим LAMP набором.

На инклюзивность было протестировано 28 бактериальных штаммов. При исследовании методом LAMP положительные результаты были получены только с образцами, содержавшими *L. monocytogenes,* тогда как в экспериментах с 10-ю нецелевыми штаммами микроорганизмов амплификации обнаружено не было (табл. 8).

Таблица 8 - Результаты инклюзивности и эксклюзивности анализа LAMP для *L. monocytogenes*

Образцы	Количество тестов			
	LAMP		ГОСТ 32031	
	положи-тельных	отрица-тельных	положи-тельных	отрица-тельных
Результаты инклюзивности				
L. monocytogenes ATCC 33090	5/5*	0/5	5/5	0/5
L. monocytogenes NCTC 11288	5/5	0/5	5/5	0/5
L. monocytogenes ATCC 13932	5/5	0/5	5/5	0/5
L. monocytogenes	25/25	0/25	25/25	0/25
Результаты эксклюзивности				
Нецелевые штаммы**	0/10	10/10	0/10	10/10
Примечания. * - после слэша указано количество повторностей одного штамма; ** - приведены в главе «Объекты»				

Как следует из табл. 8, анализируемый метод был высокоспецифичным для *L. monocytogenes*. Специфичность метода составила 100 %.

На втором этапе была оценена чувствительность метода LAMP по сравнению с методом по ГОСТ 32031 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*». При уровне инокуляции матрицы 10^1 и 10^2 КОЕ/г оба метода позволили обнаружить *L. monocytogenes* во всех образцах (табл. 9), что свидетельствовало о высокой чувствительности метода.

Соответственно, в не инокулированном образце *L. monocytogenes* обнаружен не был.

Таблица 9 - Результаты определения чувствительности метода LAMP для обнаружения *L. monocytogenes* в искусственно контаминированных образцах

Уровень инокуляции (КОЕ/г)	Образец	ГОСТ 32031/ LAMP				Чувст-витель-ность (%)	Специ-фич-ность (%)
		Tpos	Tneg	Fpos	Fneg		
10^0 (не инокули-рованный)	Говядина	0/5*	5/5	0/5	0/5	100	100
	Свинина	0/5	5/5	0/5	0/5	100	100
10^1	Говядина	5/5	0/5	0/5	0/5	100	100
	Свинина	5/5	0/5	0/5	0/5	100	100
10^2	Говядина	5/5	0/5	0/5	0/5	100	100
	Свинина	5/5	0/5	0/5	0/5	100	100

Примечания:
Tpos, Tneg — истинно положительные и отрицательные образцы, подтвержденные как методом по ГОСТ 32031, так и методом LAMP;
Fpos и Fneg — ложноположительные и отрицательные образцы, подтвержденные только методом LAMP или методом по ГОСТ 32031, соответственно;
* после знака слэш указано количество образцов, испытанных при соответствующем уровне инокуляции.

Для подтверждения работоспособности и чувствительности метода был проведен мониторинг выявляемости бактерий вида *L. monocytogenes* в пищевых продуктах методом LAMP в сравнении с методом по ГОСТ 32031 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*». Результаты представлены в табл. 10.

Таблица 10 - Результаты определения чувствительности метода LAMP в сравнении с ГОСТ 32031 для обнаружения *L. monocytogenes* в образцах нативного загрязнения

Образцы	LAMP / ГОСТ 32031				Чувст-вител-ность (%)	Специ-фич-ность (%)
	Tpos	Tneg	Fpos	Fneg		
Свинина	10	25	1	0	90	100
Говядина	5	18	0	1	100	94
Полуфабрикаты из свинины	3	16	0	0	100	100
Полуфабрикаты из говядины	8	24	1	0	88	100
Готовые к употреблению продукты	1	16	0	0	100	100

Примечание:
Tpos, Tneg — истинно положительные и отрицательные образцы, подтвержденные как методами ГОСТ, так и методами LAMP;
Fpos и Fneg — ложноположительные и отрицательные образцы, подтвержденные только методом LAMP или методом ГОСТ соответственно.

Как видно из табл. 3, при сравнении двух методов в исследовании образцов с нативным загрязнением, *L. monocytogenes* был обнаружен в 11 образцах свинины методом LAMP и в 10 образцах - по ГОСТ 32031 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*». Один образец не был подтвержден эталонным методом и был идентифицирован как ложноположительный (Fpos). Чувствительность метода при исследовании образцов свинины составила 90%, специфичность - 100%.

Такая же картина наблюдалась и при анализе 32 образцов полуфабрикатов из говядины. 9 образцов дали положительный результат при исследовании двумя

методами, при этом был получен 1 ложноположительный результат методом LAMP, не подтвердившийся эталонным методом. Чувствительность и специфичность метода составили 88% и 100%, соответственно.

Ложноположительные результаты могут быть вызваны амплификацией ДНК поврежденных клетках, которые не могут быть обнаружены эталоными классическими методами [Lim, H.S., 2015]. Другим объяснением ложноположительных результатов является использование от 4 до 6 праймеров с гораздо более высокой концентрацией в методе LAMP, чем в классических методах, основанных на ПЦР. Это может привести к увеличению возможности неспецифической амплификации, вызванной образованием димеров праймеров [Wang, Y., 2015].

При анализе 23 образцов говядины было обнаружено 5 положительных и 18 отрицательных результатов, подтвержденных обоими методами (LAMP и ГОСТ 32031). Однако 1 образец дал ложноотрицательный результат методом LAMP по сравнению с ГОСТ 32031 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*». При исследовании говядины чувствительность метода составила 100%, а специфичность - 94%. В других похожих исследованиях также были получены ложноотрицательные результаты [Lim, H.S., 2015]. Авторы показали, что 1 естественно загрязненный образец утиных крыльев был представлен как ложноотрицательный. Валидационное исследование позволило оценить чувствительность метода на уровне 91%, а специфичность – на уровне 95% [Lim, H.S., 2015].

При исследовании 17 готовых к употреблению продуктов не было обнаружено различий в результатах, полученных методами LAMP и по ГОСТ 32031. Чувствительность и специфичность обоих методов составила 100%.

Такое совпадение двух методов может быть связано с достаточным количеством жизнеспособных клеток *L. monocytogenes* в образце для их идентификации.

Сообщалось о нескольких ложноположительных и ложноотрицательных результатах при низком уровне посевного материала (10^1 КОЕ / 10 см^2) для

метода LAMP, а также при уровне микробных клеток 10^2 КОЕ / 100 см^2. Тем не менее, оба метода были признаны подходящими для обнаружения *L. monocytogenes* и обладающими 100% специфичностью и чувствительностью.

Несмотря на наличие ложноотрицательных и ложноположительных результатов, метод на основе LAMP оказался эффективным и более простым для выполнения исследований на наличие *L. monocytogenes*, чем некоторые из стандартизированных методов анализов. Метод LAMP имеет преимущество в сокращении времени анализа (менее 2-х дней по сравнению с 5-дневным методом по ГОСТ 32031), что является крайне важным при организации производственного контроля на предприятии с целью недопущения распространения загрязнения патогеном абиотических и биотических объектов производственной среды. В результате выполненных исследований разработаны МР № -01-00419779-18 Мясо и мясные продукты «Обнаружение патогенных микроорганизмов (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes*) методом молекулярного анализа (Приложение А) и внесены изменения в ГОСТ 32031 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes*» в части использования молекулярных методов исследования (Приложение В).

3.2 Оценка эффективности метода Lamp для определения *Campylobacter* spp

Микроорганизмы рода *Campylobacter* являются причиной примерно 17% случаев диареи человека в мире, что делает их одной из ведущих причин желудочно-кишечных инфекций пищевого происхождения. Правительства и промышленность многих стран разрабатывают стратегии по снижению уровня заражения *Campylobacter* пищевых продуктов [Havelaar, A.H., 2015].

Несмотря на то, что методы выделения *Campylobacter* продолжают совершенствоваться, остаются проблемы, снижающие эффективность этих методологий. При воздействии стрессовых факторов, например, охлаждения и замораживания, *Campylobacter* может оставаться жизнеспособным, но не

культивируемым, что делает невозможным его обнаружение с помощью многих традиционных микробиологических методов [Tholozan, J.L., 1999; Ziprin, R.L., 2003; Castro, A.G., 2018].

Существует острая необходимость в быстрых и простых методах, подходящих для обнаружения *Campylobacter* на протяжении всей цепочки производства пищевых продуктов. На этом этапе исследования эффективность метода LAMP (с использованием коммерческого набора) оценивалась по сравнению с методом по ГОСТ ISO 10272-1-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы обнаружения и подсчета бактерий *Campylobacter spp*. Часть 1 Метод обнаружения».

Специфичность метода оценивали по показателям инклюзивности и эксклюзивности. На инклюзивность было протестировано 20 бактериальных штаммов (*C. jejuni subsp. jejuni* ATCC 8841 и *C. coli* ATCC 33559, 18 изолятов *Campylobacter spp.)*. При исследовании методом LAMP положительные результаты были получены только с образцами, содержащими *Campylobacter spp*., в том числе *C. jejuni и C. coli*, тогда как в экспериментах с десятью нецелевыми штаммами микроорганизмов амплификации обнаружено не было (табл. 11). В параллельном исследовании согласно ГОСТ ISO 10272-1-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Методы обнаружения и подсчета бактерий *Campylobacter spp*. Часть 1 Метод обнаружения». были идентифицированы и подтверждены только целевые штаммы микроорганизмов.

Таблица 11 - Результаты инклюзивности и эксклюзивности анализа LAMP для *Campylobacter spp.*

Штаммы	Количество тестов			
	LAMP		ГОСТ ISO 10272-1-2013.	
	Положит.	Отрицат.	Положит.	Отрицат.
Результаты инклюзивности				
C. jejuni subsp. jejuni ATCC 8841	5/5*	0/5	5/5	0/5
C. coli ATCC 33559	5/5*	0/5	5/5	0/5
Campylobacter spp.	18/18	0/18	18/18	0/18
Результаты эксклюзивности				
Нецелевые штаммы**	0/10	10/10	0/10	10/10
Примечания. * - количество повторностей одного штамма ** - приведены в главе «Объекты».				

Как видно из табл. 11, метод LAMP был высокоспецифичным для *Campylobacter spp*., включая *C. coli* и *C. jejuni subsp. jejuni*. Специфичность метода составила 100 %.

Для определения чувствительности метода LAMP проводили тестирование различных концентраций целевого *C. jejuni* ATCC 8841 в искусственно контаминированных образцах фарша (табл. 12).

Таблица 12 - Результаты определения чувствительности метода LAMP для *Campylobacter spp*. в искусственно контаминированных образцах

Уровень инокуляции (КОЕ/г)	Образцы фарша	ГОСТ ISO 10272-1-2013/ LAMP				Чувст-витель-ность (%)	Специ-фич-ность (%)
		Tpos	Tneg	Fpos	Fneg		
10^0 (не инокулиро-ванный)	Мясо кур	0/5	5/5	0/5	0/5	100	100
	Свинина	0/5	5/5	0/5	0/5	100	100
10^1	Мясо кур	5/5	0/5	0/5	0/5	100	100
	Свинина	5/5	0/5	0/5	0/5	100	100
10^2	Мясо кур	5/5	0/5	0/5	0/5	100	100
	Свинина	5/5	0/5	0/5	0/5	100	100

При уровнях посевного материала 10 КОЕ/25 г и 100 КОЕ/25 г метод позволил выявить кампилобактер во всех образцах (чувствительность составила 100%), при этом все образцы были подтверждены эталонным методом. В аналогичном исследовании предел обнаружения *Campylobacter* методом LAMP составлял 1000 КОЕ/г после инкубации и 1-5 КОЕ/образец до обогащения. При этом чувствительность референс-метода (ISO 10272) была ниже, чем у метода LAMP, что согласовывалось с [Rajagopal, R., 2021].

В значительном количестве исследований сообщалось, что чувствительность методов ПЦР часто выше, чем у классических микробиологических методов [Delpiazzo, R., 2021; Linton, D., 1996]. При исследовании неинокулированного образца (отрицательный контроль) оба метода не обнаружили *Campylobacter*. Ложноотрицательных результатов выявлено не было.

Для подтверждения чувствительности и работоспособности метода LAMP был проведен мониторинг выявляемости бактерий *Campylobacter spp*. с объектов производственной среды (птицекомбинат и МПЗ). В общей сложности было собрано и протестировано 308 образцов (табл. 13).

Таблица 13 - Результаты определения чувствительности метода LAMP в сравнении с ГОСТ ISO 10272-1-2013 для обнаружения *Campylobacter spp.* в образцах нативного загрязнения

Образцы (смывы)	LAMP / ГОСТ ISO 10272-1-2013				Чувст-витель-ность (%)	Специ-фич-ность (%)
	Tpos	Tneg	Fpos	Fneg		
МПЗ	14/152	138/152	14/152	138/152	100	100
Птицекомбинат	60/156	96/156	57/156	99/156	100	94

Примечание:
Tpos, Tneg — истинно положительные и отрицательные образцы, подтвержденные как методом по ГОСТ ISO 10272-1-2013, так и методом LAMP; Fpos и Fneg — ложноположительные и отрицательные образцы, подтвержденные только методом LAMP или методом ГОСТ ISO 10272-1-2013, соответственно;
* - после слэша указано количество образцов, испытанных при соответствующем уровне загрязнения.

При проведении анализа методом LAMP было выделено 14 положительных из 152 образцов производственной среды МПЗ и 60 из 156 образцов производственной среды птицекомбината. Для результатов, полученных методом LAMP все положительные образцы были подтверждены по ГОСТ ISO 10272-1:2017, начиная с пересева с обогатительной среды на плотные питательные среды. 3 образца (смывы), взятые на предприятии по переработке птицы и давшие положительный результат на *Campylobacter* spp. при

использовании метода LAMP, дали отрицательный результат при анализе с помощью традиционных методов. Расхождение в результатах, возможно, было связано с небольшим количеством клеток *Campylobacter* spp. в накопительном бульоне, что было недостаточно для их обнаружения с помощью обычных методов культивирования. Другой причиной могла быть повышенная устойчивость к противомикробным препаратам у представителей *Enterobacteriaceae* в последние годы. Эта проблема для обнаружения *Campylobacter* в образцах мяса птицы подтверждается рядом публикаций [Campos, C.B., 2014; Cantón, R., 2008; Dierikx, C., 2013; Machado, E., 2008**].** Было продемонстрировано, что широко распространенная у домашней птицы *Escherichia coli,* обладающая устойчивостью к бета-лактамазе, значительно опережает рост *Campylobacter* spp., когда оба микроорганизма присутствуют в одном образце [Jasson, V., 2009]. Кроме того, было обнаружено, что не только *E. coli*, но и другие бактерии, такие как *Pseudomonas* spp., присутствуют в большом количестве в мясе птицы и на объектах производственной среды предприятий по переработке птицы и могут влиять на выявление *Campylobacter spp.* [Baylis, C.L., 2000].

В ходе выполнения исследований было отмечено, что метод LAMP показывал высокую специфичность при более коротком времени исследования: 24-27 часов, по сравнению с 5-7 сутками при проведении исследований контрольным методом культивирования.

В результате выполненных исследований разработаны МР № - 781-00419779-20. Мясо и мясные продукты «Обнаружение патогенных микроорганизмов *Campylobacter spp.* методом молекулярного анализа» (Приложение Б).

3.3 Оценка эффективности метода Lamp для определения *Salmonella spp*

В качестве основных критериев оценки эффективности метода использовали специфичность, чувствительность и сходимость результатов с классическим методом по ГОСТ 31659-2012 «Продукты пищевые. Метод выявления бактерий рода *Salmonella*».

В результате исследования трех видов мясной продукции, содержавших 10^1 КОЕ/г и 10^2 КОЕ/г *Salmonella enteritidis* ATCC 11272, искомый микроорганизм был обнаружен двумя методами, что указывало на 100% сходимость результатов, а также на высокую чувствительность методов.

При исследовании образцов, контаминированных нецелевыми микроорганизмами *Esherichia coli* ATCC 25922 и *Citrobacter freundii* ATCC 43864, ложноположительных результатов получено не было, что доказывало 100%-ю специфичность молекулярного метода.

В результате выполненных исследований разработаны МР № -01-00419779-18 Мясо и мясные продукты «Обнаружение патогенных микроорганизмов (*Salmonella* spp., *L. monocytogenes*) методом молекулярного анализа (Приложение А)

3.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 3

Результаты оценки чувствительности и специфичности метода LAMP, высокая сходимость полученных результатов с референс-методами, доказали эффективность этого метода при исследовании мясной продукции и объектов производственной среды предприятий для выявления пищевых патогенов *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.* и *Salmonella spp.*

Главным преимуществом и аргументом для внедрения в лабораторную практику метода LAMP является его экспрессность. Полный цикл исследования составляет 24-28 часов, в то время как классическое исследование требует не менее 5-7 суток

Исследования, проведенные на различных объектах, показали, что метод LAMP обеспечивает быстрые и надежные результаты, применим на предприятиях мясной и птицеперерабатывающий промышленности, в качестве быстрого и точного метода может быть использован для целей производственного контроля. Его широкое внедрение в практику микробиологических исследований в отрасли имеет большое значение для обеспечения безопасности выпускаемой продукции.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА АБИОТИЧЕСКИХ И БИОТИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ

Для изучения микрофлоры абиотических объектов производственной среды был составлен перечень исследуемых объектов, в качестве которых рассматривали поверхности технологического и вспомогательного оборудования, инструмента и конструкций. При составлении данного перечня технологический процесс рассматривали как совокупность отдельных этапов, характеризующихся определенными температурно-влажностными условиями. В пределах этапа выделяли 4 группы абиотических объектов в зависимости от их зоны близости к биотическому объекту:

- 1-я зона – поверхности, контактирующие с пищевыми продуктами (слайсеры, бункеры, конвейерные ленты, ножи, стойки, рабочие столы, поверхности и края инвентаря, разделочные доски, пластиковая и металлическая тара);

- 2-я зона – поверхности, не контактирующие с пищевыми продуктами, но находящиеся в непосредственной близости от пищевых продуктов (корпуса и станины оборудования, холодильные агрегаты, щиты управления оборудованием, выключатели и пр.);

- 3-я зона – удаленные поверхности, не контактирующие с пищевыми продуктами на участках обработки или рядом с ними (погрузчики, тележки, колеса, шланги, стены, полы, водостоки и пр.);

На каждом этапе технологического процесса определяли абиотические объекты разной зональности, с поверхности которых были сделаны смывы для микробного профилирования свободно циркулирующей микрофлоры.

4.1 Исследование микробного сообщества производственной среды на примере предприятий мясной промышленности

В течение двух лет изучалось микробное сообщество предприятий мясной промышленности.

На предприятии III из образцов, отобранных с объектов производственной среды, было изолировано и проанализировано 93 колонии, которые были представлены различными таксономическими группами микроорганизмов. После анализа полученных результатов были отобраны 57 штаммов МАФАнМ для дальнейших исследований. Все патогенные микроорганизмы были проанализированы на способность к биопленкообразованию. Результаты определения микробиома с использованием классических микробиологических, молекулярных методов и метода времяпролётной масс-спектрометрии MALDI-TOF-MS представлены в табл. 14.

Микроорганизмы, выделенные с объектов производственной среды предприятия III и идентифицированные с помощью MALDI-TOF[6] масспекторометрии были представлены 22 видами микроорганизмов. Наиболее часто на всех видах абиотических поверхностей, включая вспомогательное оборудование, конструкции, а также инвентарь встречались микроорганизмы рода *Staphylococcus* (в десяти случаях), *Kocuria rhizophila* был на втором месте, далее следовали *Brochothrix thermosphacta*. Остальные рода были представлены в основном одним видом микроорганизмов.

На оборудовании предприятия были определены бактерии родов *Kocuria* и *Micrococcus*. Эти бактерии являются обычными комменсалами кожи и ротоглотки у млекопитающих. Могут встречаться и в других экологических

[6] Материал, изложенный в данном разделе, частично опубликован в статье: Юшина, Ю.К. Перспективы применения MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа в пищевой микробиологии / Юшина Ю. К., БатаеваД. С., Зайко Е. В. [и др.] // Все о мясе. – 2021. – № 4. – С. 56-58.

нишах (продукты питания, включая куриное мясо, пресная вода, морские отложения и пр.).

Kocuria rhizophila и *Microccocus luteus* могут вызывать заболевания, например, у рыб (радужной форели, кумжи и др.). Был выделен Г(-) фитопатоген *Rhizobium radiobacter*, который может являться также возбудителем инфекционных заболеваний у человека, в т.ч. бактериального кератита. Дополнительные исследования и надзор за этим патогеном растений могут привести к признанию его в качестве новой причины множественных местных и системных инфекций у людей [Lai, C.C., 2014]. *Brochothrix thermosphacta* является доминирующим, но малоизученным микроорганизмом, вызывающим порчу мяса.

Аналогичные исследования были проведены на предприятии I (табл. 15).

На оборудовании предприятия I также были обнаружены широко представленные в окружающей среде представители нормальной микрофлоры человека и животных микроорганизмы рода Staphylococcus. Чаще всего изолировался Staphylococcus equorum, относящийся к коагулазонегативным стафилококкам и как правило, оказывающий положительное влияние на процессы брожения и органолептические характеристики пищевых продуктов. Также был выделен вид Staphylococcus sciuri– микроорганизм, который обычно присутствует на коже и слизистых оболочках домашних, сельскохозяйственных и диких животных [Hauschild, T. 2003, Kloos, W. E., 1980], а также в пищевых продуктах животного происхождения [Garcia, M. C., 2002].

Микроорганизмы порчи были представлены несколькими видами. Среди которых наиболее известными являлись - Pseudomonas gessardii, Brochothrix thermosphacta, Carnobacterium maltaromaticum, Pseudomonas brenneri, Pseudomonas proteolytica, Pseudomonas fluorescens.

Несколько видов Candida (C. zeylanoides, C. famata), выделенные с конструкций и вспомогательного оборудования являлись широко

распространенными дрожжевыми грибками, которые обычно встречаются в пищеварительном тракте животных и на слизистых оболочках человека.

Длительное хранение мяса птицы при температуре минус 18 ^{o}C приводит к порче, вызванной рядом психротрофных микроорганизмов, в том числе и *C. zeylanoides* [Ismail, S.A.S., 2000]

В тоже время, все чаще встречаются сообщения о заболеваниях кандидозным артритом на фоне диссеминированного заболевания, вызываемого *C. zeylanoides* [Levenson, D., 1991]

Патогенные микроорганизмы рода листерия (*L. monocytogenes*) встречались чаще всего на вспомогательном оборудовании, причем дальнейшие исследования показали их способность к биопленкообразованию. Из 24 исследованных объектов производственной среды изучаемый микроорганизм изолирован в 5 случаях, что составляло 21%. Сальмонеллы встречались реже - обнаружены на трех изученных объектах, вне зависимости от их типа.

В тоже время, на одном из объектов вспомогательного оборудования были обнаружены (А26) и сальмонеллы, и патогенные листерии. Одновременно был изолирован *Pseudomonas fluorescens,* обладающий высокой способностью к биопленкообразованию за счет продуцирования экзополисахаридного матрикса, являющегося основой для развития микробного сообщества на поверхности объекта.

Таблица 14 - Микрофлора объектов производственной среды (предприятие III, МПЗ)

Шифр образца	Тип объекта	Патогенные микроорганизмы		Биопленкообразование *in vitro*	Мезофильные аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы	
		рода *Salmonella*	*L. mono-cytogenes*		КОЕ/см^2	Наименование
1	2	3	4	5	6	*7*
III-1	ВО	н/о	н/о	-	8,0x10^5	*Alcaligenes faecalis*
						Brochothrix thermosphacta
						Arthrobacter psychrolactophilus
						Citrobacter spp.
III-2	ВО	н/о	**Обн.**	+*L. monocytogenes* (L 25)	3,9x10^6	*Kocuria rhizophila*
						Staphylococcuss aprophyticus
						Staphylococcus equorum
						Macrococcus caseolyticus
III-5	ВО	**Обн.**	**Обн.**	+*L. monocytogenes* (L29) + *Salmonella spp.*	7,8x10^6	*Staphylococcus equorum*
						Kocuria rhizophila
						Staphylococcus equorum
III-3	ВО	н/о	н/о	-	3,8x10^5	*Staphylococcus equorum*
						Staphylococcus sciuri
						Moraxella osloensis
						Chryseobacterium indologenes
						Kocuria rhizophila
III-6	К	н/о	Обн.	+*L. monocytogenes* (L 30)	2,0x10^2	Нет роста
III-4	ТО	н/о	н/о	-	7,8x10^6	*Microbacterium oxydans*

Окончание таблицы 14

1	2	3	4	5	6	7
III-7	ТО	**Обн.**	**Обн.**	+ *L. monocytogenes* (L 42); + *Salmonella spp.*	$4,7x10^4$	*Carnobacterium maltaromaticum*
						Brochothrix thermosphacta
						Pseudomonas tolaasii
III-13	ТО	н/о	**Обн**.	+*L. monocytogenes* (L 43)	$2.9x10^2$	*Rhodotorula minuta*
III-16	ТО	н/о	н/о	-	$1,0x10^3$	*Micrococcus luteus*
III-17	ТО	н/о	н/о	-	$4,0x10^6$	*Rhizobium radiobacter*
III-19	ТО	н/о	н/о	-	$2,3x10^3$	*Microbacterium oxydans*
						Staphylococcus epidermidis
III-8	ТО	н/о	н/о	-	$2,1x10^3$	*Staphylococcus epidermidis*
III-9	ТО	н/о	н/о	-	$<1,0x10^1$	Нет роста
III-12	ВО	н/о	н/о	-	$5,0x10^4$	*Pseudomonas oryzihabitans*
					$2,1x10^2$	*Microbacterium paraoxydans*
III-14	ВО	н/о	н/о	-	$3,4\ x10^5$	*Staphylococcus equorum*
III-21	ВО	н/о	н/о	-	$2,8x10^4$	*Kocuria rhizophila*
III-15	ВО	н/о	**Обн.**	+*L. monocytogenes* (L 49)	$2,0x10^2$	*Microbacterium maritypicum*
III-11	И	н/о	**Обн.**	-	$2,2x10^3$	*Microbacterium arborescens*
						Staphylococcus equorum
III-10	К	н/о	**Обн.**	+*L. monocytogenes* (L 46)	$2,0x10^2$	*Microbacterium maritypicum*
III-18	К	н/о	н/о	-	$8,0x10^5$	*Staphylococcus equorum*
III-20	ТО	н/о	н/о	-	$<1,0x10^1$	Нет роста

Обозначения:

К –конструкция; И – инвентарь; ВО – вспомогательное оборудование; ТО – технологическое оборудование;

н/о – не обнаружено; Обн. – обнаружено; "+" – положительный тест на биопленкообразование

Таблица 15 - Микрофлора объектов производственной среды (предприятие I, МПЗ)

Шифр образца	Тип объекта	Патогенные микроорганизмы		Биопленкообразование invitro	Мезофильные аэробные и факультативно анаэробныемикроорганизмы	
		рода *Salmonella*	*L. mono-cytogenes*		КОЕ/см^2	Наименование
1	2	3	4	5	6	*7*
А-1	ВО	н/о	н/о	-	6,0x10^4	*Pseudomonas gessardii*
						Brochothrix thermosphacta
						Candida zeylanoides
						Microbacterium liquefaciens
А-2	ВО	н/о	**Обн.**	+ *L. monocytogenes*	2x10^3	*Kocuria rhizophila*
						Escherichia coli
						Staphylococcus equorum
						Aeromonas salmonicida
А-3	ТО	н/о	**Обн.**	+ *L.monocytogenes*;	3,5x10^4	*Pseudomonas koreensis*
						Kocuria rhizophila
						Lactobacillus sakei
А-4	И	н/о	н/о	-	3 x10^5	*Staphylococcus equorum*
						Pseudomonas proteolytica
						Escherichia coli
						Chryseobacterium indologenes
А-5	ВО	н/о	н/о	-	2,0x10^4	*Neisseria meningitidis*
А-6	ВО	**Обн**	**Обн**	+ *Salmonella L.monocytogenes*	7,8x10^4	*Pseudomonas fluorescens*
А-7	И	н/о	н/о	-	4,7x10^6	*Carnobacteriummaltaromaticum*
						Brochothrix thermosphacta
						Pseudomonas proteolitica

Окончание таблицы 15.

1	2	3	4	5	6	7
А-8	И	н/о	н/о	-	$6x10^5$	*Microbacteriumphyllosphaerae*
А-9	И	н/о	**Обн**	+*L. monocytogenes*	$1,0x10^5$	*Micrococcus lentus*
А-10	ВО	н/о	н/о	-	$4,0x10^4$	*Rhizobium radiobacter*
А-11	ВО	н/о	н/о	-	$3x10^3$	*Aeromonas salmonicida* *Staphylococcus sciuri*
А-12	И	н/о	н/о	-	$2,1x10^6$	*Lactobacillus amylovorus*
А-13	ТО	н/о	н/о	-	$1,4x10^2$	*Staphylococcus vitulinus*
А-16	И	н/о	н/о	-	$3x10^5$	*Kocuria rhizophila*
А-17	И	н/о	н/о		$2,0x10^4$	*Candida famata*
А-18	И	н/о	Обн	+*L. monocytogenes*	$4x10^5$	*Microbacterium arborescens* *Staphylococcus equorum*
А-19	ТО	**Обн**	н/о	+*Salmonella*	$2,0x10^2$	*Staphylococcus vitulinus*
А-20	ВО	н/о	н/о	-	$6x10^4$	*Staphylococcus equorum*
А-21	ВО	н/о	н/о	-	$1,4x10^1$	*Pseudomonas fluorescens*
А-22	К	н/о	н/о		$2x10^3$	*Lactobacillus salivarius*
А-23	ВО	н/о	**Обн**	+*L. monocytogenes*	$4x10^2$	*Corynebacterium xerosis*
А-24	К	**Обн**	н/о	+*Salmonella*	$2x10^2$	*Pseudomonas brenneri*

Обозначения:
К – конструкция; И – инвентарь; ВО – вспомогательное оборудование; ТО – технологическое оборудование;
н/о – не обнаружено; Обн. – обнаружено

На рис. 11 показаны суммарные результаты исследования микробиома объектов производственной среды предприятий мясной промышленности с использованием масс-спектрометрии MALDI-TOF-MS.

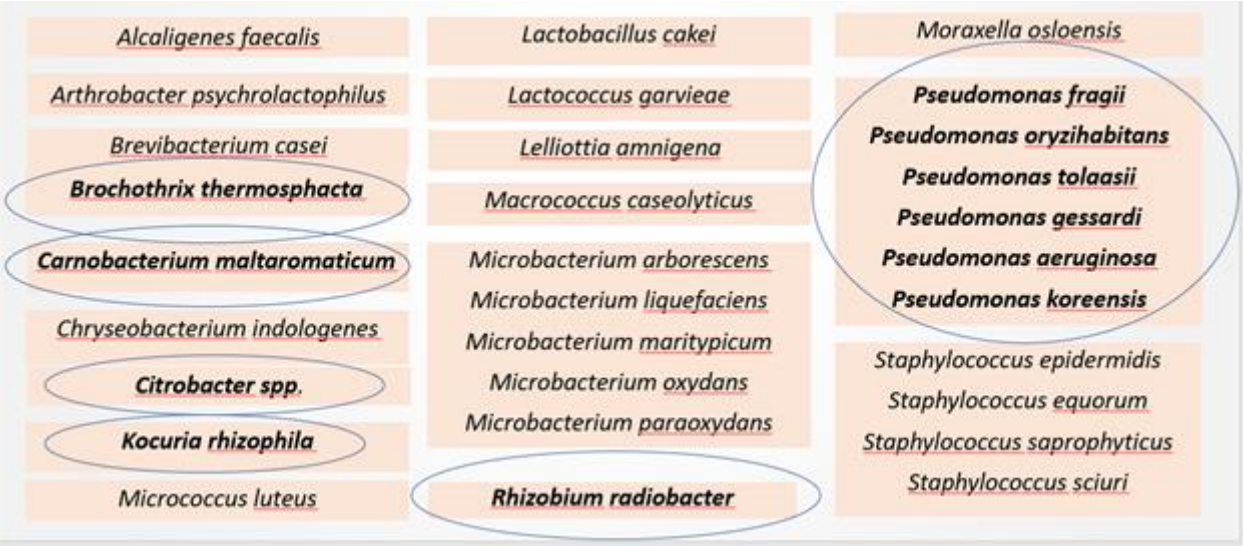


Рисунок 11 - Наиболее типичные представители микробиоты абиотических объектов производственной среды предприятий мясной промышленности. (Выделены микроорганизмы порчи и потенциально опасные виды)

Как видно из рис.11, микрофлора абиотических поверхностей предприятий мясной промышленности представлена различными таксономическими группами микроорганизмов. Выделяемые на предприятиях сапротрофные микроорганизмы, как правило, были схожи и относились к следующим родам - *Staphylococcus, Micrococcus, Propionibacterium,* являющимися представителями микрофлоры кожи, желудочно-кишечного тракта и слизистых оболочек животных и человека.

Большая часть изолированных и изученных сапротрофов относилась к микроорганизмам порчи, таким как *Brochothrix thermosphacta, Carnobacterium maltaromaticum*, микроорганизмы рода *Pseudomonas*, в том числе обладающих способностью к биопленкообразованию. Было отмечено, что предприятия различались по количеству случаев обнаружений данных микроорганизмов, однако имели и сходные особенности. Например, среди микрооорганизмов

рода *Pseudomonas* чаще всего встречались виды, обладающие высокими протеолитическими способностями.

Также были выделены малоизученные, редкие, неконтролируемые и трудно культивируемые патогены, в том числе *Rhizobium radiobacter, Moraxella osloensis, Acinetobacter spp.*, которые могут являться возбудителями инфекционных заболеваний у человека. Дополнительные исследования этих патогенов могут привести к признанию их в качестве причины множественных местных и системных инфекций у людей, передающихся через пищевые продукты. На предприятиях мясной промышленности прослеживались одинаковые тенденции по выявлению патогенных микроорганизмов. Так, количество обнаружений *Listeria monocytogenes* было выше, чем выявлений *Salmonella,* что свидетельствовало о постоянной циркуляции психротрофных микроорганизмов на абиотических поверхностях производственной среды.

В табл.16 приведены результаты выявления патогенной и сапротрофоной микрофлоры на абиотических объектах разной зональности.

Результаты исследования КМАФАнМ абиотических объектов производственной среды мясоперерабатывающих предприятий показали обоснованность принципа зональности, поскольку значительные разбросы по степени контаминации наблюдались как для технологического, так вспомогательного оборудования и конструкций. Причем вне зависимости от начала, середины или окончания технологического процесса. Для вспомогательного оборудования установлен уровень от $2{,}0 \times 10^2$ до $7{,}8 \times 10^6$, технологического оборудования и инструмента – от $<1{,}0 \times 10^1$ до $7{,}8 \times 10^6$ КОЕ/см^2.

Высокие значения КМАФАнМ на уровне 4-6-й степени на вспомогательном оборудовании наблюдались как в грязной (участок подготовки мясного сырья), так и в чистой зонах (сосичный цех).

Таблица 16 – Результаты выявления патогенных и сапротрофных микроорганизмов на абиотических объектах разной зональности МПЗ

	Тип объекта	Патогенные микроорганизмы		Биопленко-образование in vitro	МАФАнМ		Микроаэрофильные микроорганизмы
		рода *Salmonella*	*L. monocytogenes*		КОЕ/см^2	Наименование	
Участок подготовки мясного сырья	ВО (вспомогательное оборудование)	н/о	н/о	-	$8{,}0 \times 10^5$	*Alcaligenes faecalis*	*Lactobacillus cakei*
						Brochothrix thermosphacta	-
						Arthrobacter psychrolactophilus	-
						Citrobacter spp.	-
	ВО. Стеллаж из нержавеющей стали для размещения и размораживания мясного сырья	н/о	Обн.	+ *L. monocytogenes* (L 25)	$3{,}9 \times 10^6$	*Kocuria rhizophila*	*Kocuria rhizophila*
						Staphylococcuss aprophyticus	*Staphylococcuss aprophyticus*
						Staphylococcus equorum	*Kocuria rhizophila*
						Macrococcus caseolyticus	-
	ВО. Гидравлическая тележка для транспортирования упакованных мясных блоков и поддонов	Обн.	Обн.	+ *L. monocytogenes* (L 29); + *Salmonella spp.*	$7{,}8 \times 10^6$	*Staphylococcuseguorum*	*Kocuria rhizophila*
						Kocuria rhizophila	*Staphylococcus equorum*
						Staphylococcus equorum	-
	ВО	н/о	н/о	-	$3{,}8 \times 10^5$	*Staphylococcus equorum*	*Macrococcus caseolyticus*
						Staphylococcus sciuri	*Lelliottia amnigena*
						Moraxella osloensis	*Lactococcus garvieae*
						Chryseobacter iumindologenes	-
						Kocuriarhizophila	-
	Конструкция. *Стена, окрашенная масляной краской. Расстояние от пола 1,55-1,60 м*	н/о	Обн.	+ *L. monocytogenes* (L 30)	$2{,}0 \times 10^2$	*Kocuria rhizophila*	Нет роста
Сосисочный цех. Машинное отделение	ТО (Технологическое оборудование)	н/о	н/о	-	$7{,}8 \times 10^6$	*Microbacteriumoxydans*	*Microbacterium liquefaciens*
	ТО. Машина для измельчения замороженных блоков. Приемный стол	Обн.	Обн.	+*L. monocytogenes*(L 42); + *Salmonella spp.*	$4{,}7 \times 10^4$	*Carnobacterium maltaromaticum*	*Carnobacterium maltaromaticum*
						Brochothrix thermosphacta	-
						Pseudomonas tolaasii	-
	ТО. *Фаршемешалка. Станина из нержавеющей стали*	н/о	Обн.	+*L. monocytogenes* (L 43)	2.9×10^2	*Rhodotorula minuta*	*Brevibacterium casei*
	ТО	н/о	н/о	-	$1{,}0 \times 10^3$	*Micrococcus luteus*	*Pseudomonas fragii*
	ТО	н/о	н/о	-	$4{,}0 \times 10^6$	*Rhizobiumr adiobacter*	*Macrococcus caseolyticus*
	ТО	н/о	н/о	-	$2{,}3 \times 10^3$	*Microbacterium oxydans*	*Carnobacterium maltaromaticum*
						Staphylococcus epidermidis	
	ТО	н/о	н/о	-	$2{,}1 \times 10^3$	*Staphylococcus epidermidis*	Нет роста
	ТО. *Льдогенератор. Корпус из нержавеющей стали*	н/о	н/о	-	$<1{,}0 \times 10^1$	Нет роста	Нет роста
	ВО	н/о	н/о	-	$5{,}0 \times 10^4$	*Pseudomonas oryzihabitans*	*Macrococcus caseolyticus*
					$2{,}1 \times 10^2$	*Microbacterium paraoxydans*	

н/о – не обнаружено;
обн. – обнаружено

- зона 1 - зона 2 - зона 3

Результаты исследования показали, что в перемещении патогенных микроорганизмов в пределах предприятия большую роль играет вспомогательное и технологическое оборудование, используемое на всех этапах процесса производства. В настоящее время большое внимание при проведении мойки и дезинфекции на предприятих уделяют абиотическим поверхностям, контактирующим с пищевыми продуктами (слайсеры, бункеры, конвейерные ленты, ножи, рабочие столы) - зона 1. Однако поверхности, не контактирующие с пищевыми продуктами, но находящиеся в непосредственной близости от пищевых продуктов (корпуса оборудования, холодильные агрегаты, щиты управления оборудованием, тележки, тара) и относящиеся к зоне 2, содержат наибольшее разнообразие микроорганизмов. На вспомогательном оборудовании зоны 2 было обнаружено наибольшее количество патогенных микроорганизмов, в особенности *L. monocytogenes*, которые встречались значительно чаще, чем *Salmonella spp.* На гидравлической тележке, перемещающейся по всей технологической цепочке предприятия, были обнаружены оба вида патогенных микроорганизмов, при этом значение КМАФАнМ было одно из самых высоких из изученных абиотических объектов ($7{,}8 \times 10^6$ КОЕ/см^2).

Обнаружение патогенных микроорганизмов практически всегда сопровождалось присутствием микроорганизмов, обладающих активной способностью к биопленкообразованию. Например, *Kocuria rhizophila*, которая считается активным образователем экзополисахаридного матрикса - основного компонента структуры биопленок. Также были обнаружены микроорганизмы порчи, способные к биопленкообразованию, такие как *Pseudomonas*. Полученные результаты свидетельствовали о постоянно присутсвующих микробных сообществах патогенных и сопротрофных микроорганизмов на абиотических поверхностях вспомогательного и технологического оборудования в непосредственной близости от пищевых продуктов, что может играть определенную роль в циркуляции патогенных микроорганизмов на предприятии и дальнейшей контаминации пищевой продукции.

Далее оценка разнообразия микроорганизмов абиотических

поверхностей производственной среды на предприятиях мясной промышленности проводилась путем определения последовательностей вариабельного фрагмента гена 16S рРНК (рис. 12).

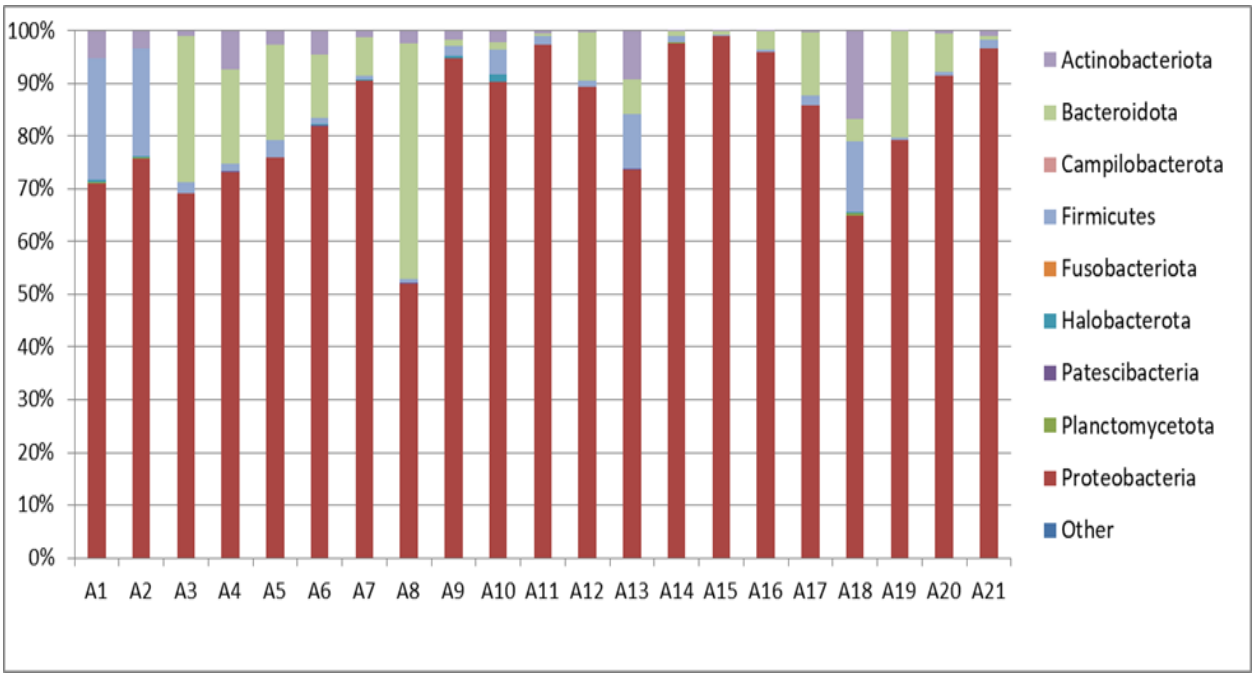


Рисунок 12 - Таксономический состав микробных сообществ образцов, отобранных на предприятиях.

Микробные сообщества содержат тысячи видов микроорганизмов, а культивировать в стандартных лабораторных условиях удается менее 1% из них. Сравнительное исследование таксономического состава микробных сообществ предприятий метагеномным методом, основанным на анализе разнообразия молекулярных маркеров (наиболее распространенным является последовательность гена 16 S) подтвердило это утверждение.

Проведенный таксономический анализ показал, что можно выделить четыре ключевых группы бактерий, принадлежащих филумам *Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteriota и Bacteroidota*. Также метагеномный анализ показал высокую таксономическую сходность микроорганизмов, доминирующих в разных образцах. Наибольшим таксономическим разнообразием обладали образцы А8, А4, А13, А18, отобранные с вспомогательного оборудования, что также подтверждало сделанные выше

выводы о роли вспомогательного оборудования в распространении микроорганизмов в производственной среде.

4.2 Исследование микробного сообщества производственной среды на примере предприятия птицеперерабатывающей промышленности

Перечень исследуемых абиотических объектов формировали аналогичным образом (см. п.4.1).

Как и на предприятиях мясной промышленности, все образы (смывы), отобранные с объектов производственной среды, характеризовались КМАФАнМ не более 10^6 КОЕ/см^2, причем наиболее высокие степени (10^5-10^6 КОЕ/см^2) наблюдались как для технологического, так и для вспомогательного оборудования (табл. 17). Наибольшая загрязненность наблюдалась в производственных помещениях, где осуществляли убой и переработку птицы, особенно на участке удаления пера (А37, стена, выложенная кафелем, расстояние от пола 1,55-1,60 м) – 7,0х10^6 КОЕ/см^2, при этом сообщество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (МАФАнМ) здесь было представлено наиболее разнообразно - 15 видами микроорганизмов. Высокими значениями КМАФАнМ (свыше 10^3 КОЕ/см^2) характеризовались и участки в конечных точках технологического процесса, что свидетельствовало о риске перекрестного заражения продукции, подготовленной к выпуску. Из образцов, отобранных с предприятия II (птицекомбинат), было выделено и отобрано 98 колоний микроорганизмов с различными фенотипическими признаками. Методом времяпролётной масс-спектрометрии MALDI-Tof-MS они были идентифицированы и установлено более 58 различных видов микроорганизмов (табл 17).

Таблица 17 - Микрофлора объектов производственной среды (предприятие II, птицекомбинат)

Шифр образца	Тип объекта	Патогенные микроорганизмы		Мезофильные аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы	
		L.monocytogenes	*Salmonella*	КМАФАнМ, КОЕ/см^2	Наименование
1	2	3	4	5	6
А37	К	н/о	н/о	7,0x10^6	*Acinetobacter johnsonii*
					Comamona stestosterom
					Empedobacter brevis
					Enterococcus faecalis
					Enterococcus faecium
					Erysipelothrix inopinata
					Escherichia coli
					Klebsiella pneumoniae
					Myroides odoratimimus
					Pseudomonas aeruginosa
					Pseudomonas mendocina
					Pseudomonas mosselii
					Stenotrophomonas maltophilia
					Vagococcus fluvialis
					Vagococcus lutrae
А35	ТО	**Обн.**	н/о	4,0x10^4	*Chryseobacterium oncorhynchi*
					Citrobacter gillenii
					Pseudomonas marginalis
А26	ТО	**Обн.**	н/о	<1,0x10^1	*Staphylococcus hominis*
А39	ТО	н/о	н/о	<1,0x10^1	Нет роста
А29	ВО	н/о	н/о	3,0x10^4	*Acinetobacter guillouiae*
					Proteus mirabilis
					Pseudomonas azotoformans
					Pseudomonas brenneri
					Pseudomonas gessardii
					Pseudomonas grimontii
					Pseudomonas koreensis
					Pseudomonas proteolytica

Продолжение таблицы 17.

1	2	3	4	5	6
А30	ВО	н/о	н/о	$7,0x10^5$	*Enterobacter cloacae*
					Pseudomonas fluorescens
					Pseudomonas gessardii
А27	И	н/о	н/о	$7,0x10^3$	*Aeromonass almonicida*
					Pseudomonas azotoformans
					Pseudomonas fluorescens
					Pseudomonas fragi
					Pseudomonas essardii
					Pseudomonas orientalis
					Stenotrophomonas rhizophia
А28	К	н/о	н/о	$9,0x10^3$	*Aeromonas media*
					Aeromonas bestiarum
					Aeromonas popoffii
					Lelliottia amnigena
					Micrococcus luteus
					Pseudomonas brenneri
					Pseudomonas fuscovaginae
С1	С	**Обн.**	н/о	$2,8x10^3$	*Pseudomonas fluorescens, Pseudomonas orientalis* *Pseudomonas tolaasii*
С2	С	н/о	н/о	$9,0x10^2$	*Pseudomonas brenneri, Pseudomonas orientalis и* *Pseudomonas tolaasii*
А36	ТО	**Обн.**	**Обн.**	$5,0x10^6$	*Empedobacter brevis*
					Enterococcus faecium
					Escherichia coli
					Hafnia alvei
					Lactococcusgorvieae
					Proteusvulgaris
					Pseudomonas putida

Окончание таблицы 17.

1	2	3	4	5	6
А33	ТО	**Обн.**	**Обн.**	$9,0x10^3$	*Aeromonas bestiarum*
					Pseudomonas azotoformans
					Pseudomonasfragi
					Pseudomonas gessardii
					Pseudomonas putida
А34	ТО	**Обн.**	н/о	$3,0x10^3$	*Macrococcuscaseolyticus*
					Proteus vulgaris
					Pseudomonas koreensis
					Pseudomonas libanensis
					Pseudomonas putida
					Pseudomonas synxantha
А 31	ТО	н/о	н/о	$3,0x10^4$	*Klebsiellaoxytoca*
					Proteushauseri
					Pseudomonas gessardii
					Pseudomonas mandelii
					Pseudomonas savastanoi sspsavastanoi
А32	ВО	н/о	н/о	$5,0x10^4$	*Acinetobacter berezinae*
					Chryseobacteriumgleum
					Citrobacterfreundii
					Empedobacter brevis
					Exiquobacterium spp
					Proteus hauseri
А40	ВО	н/о	н/о	н/о	н/о
А38	ВС	н/о	н/о	н/о	н/о

Обозначения:
К –конструкция; И – инвентарь; ВО – вспомогательное оборудование;
ТО – технологическое оборудование; С- сырье; ВС – воздушная среда;
н/о – не обнаружено; Обн. – обнаружено

Выделенные 58 видов микроорганизмов были представлены 26 родами (рис. 13), из которых 7 родов относились к Г(+) (*Enterococcus, Exiquobacterium, Lactococcus, Macrococcus, Micrococcus, Staphylococcus, Vagococcus*), 1 род - к Грамвариабельным (*Erysipelothrix*), а остальные 18 родов- к Г(-) микроорганизмам.

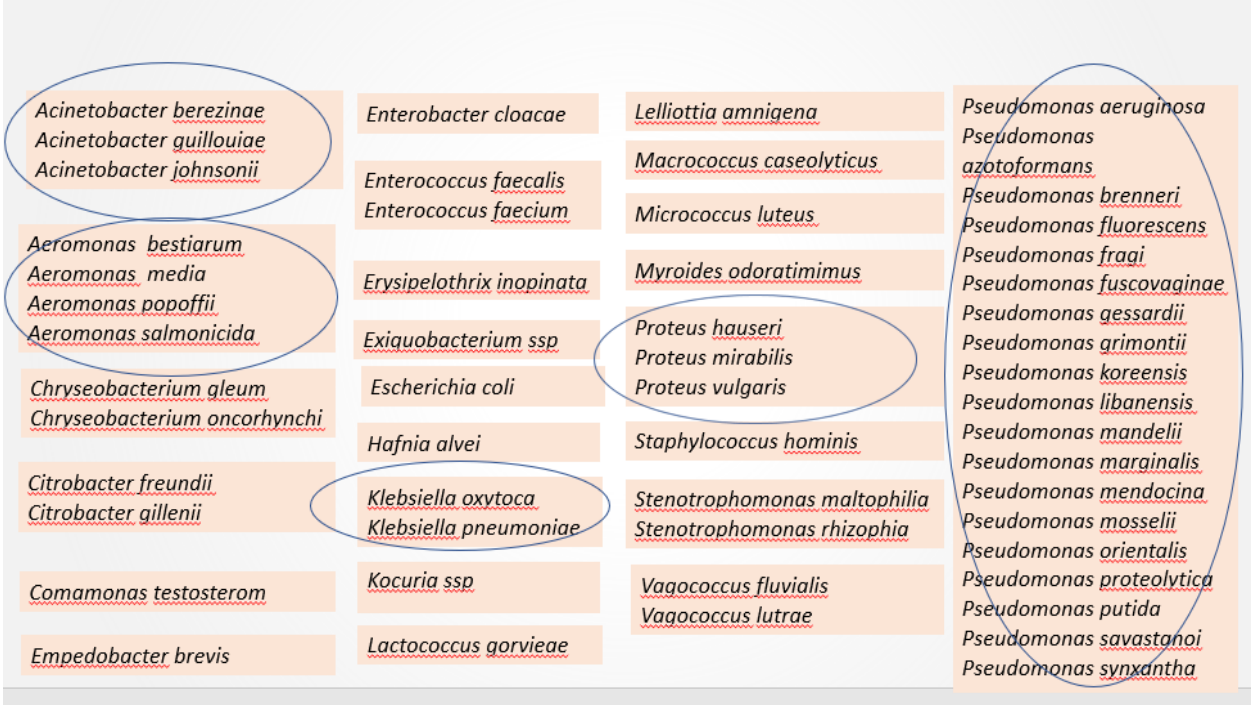


Рисунок 13 - Наиболее типичные представители микробиоты абиотических объектов производственной среды предприятий птицеперерабатывающей промышленности

Среди Г(-) бактерий род *Pseudomonas* был представлен наибольшим количеством видов (20 видов). В смывах с тушек птицы, отобранных с предприятия II, также были идентифицированы *Pseudomonas brenneri*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas orientalis* и *Pseudomonas tolaasii*. Род *Pseudomonas* известен своей метаболической универсальностью и генетической пластичностью, включает психротрофные виды, способные расти при низких положительных температурах, присущих пищевым производствам, и продуцировать термостабильные протеолитические и

липолитические ферменты, которые вызывают порчу пищевой продукции в процессе хранения. Кроме того, *Pseudomonas spp.* активно образуют монобиопленки и биопленки в симбиозе с патогенными микроорганизмами. Некоторые из псевдомонад являются условно-патогенными и вызывают тяжелые формы внутрибольничных инфекций (например, *P.aeruginosa*) [Rocha, A.J., 2019].

В смывах были также обнаружены микроорганизмы рода *Acinetobacter* (тип *Proteobacteria*), которые занимают первое место среди возбудителей раневой инфекции (36%) и обладают выраженной способностью к образованию биопленок (*Acinetobacter baumannii*). Представители этого рода обладают повышенной резистентностью к антибиотикам [Howard, A., 2012].

Были обнаружены Г(-) подвижные бактерии рода *Proteus*, такие как, *Proteus mirabilis*, *Proteus shauseri* и *Proteus vulgaris*. Они повсеместно встречается в почве и воде. Этот род микроорганимов включает условно-патогенные виды *Proteus penneri*, а также виды, известные множественной лекарственной устойчивостью (*P. mirabilis)* [Zafar, U.,2019; Canton, R., 2006].

Результаты выявления патогенных и сапротрофных микроорганизмов на абиотических объектах разной зональности предприятия (табл.18) показали аналогичную картину в сравнении с предприятиями мясной промышленности. Технологическое оборудование 2 зоны (поверхности, не контактирующие с продукцией пищевого назначения) являлось источником распространения патогенов. Практически всегда микрофлора его поверхностей характеризовалась присутствием микроорганизмов-биопленкообразователей – в основном представителей рода *Pseudomonas*. *L.monocytogenes*, как правило, вывлялись на поверхностях технологического оборудования в труднодоступных местах (стыки, швы и т.д.), в том числе на металлических цепях конвейерных систем, осуществляющих перемещение продукции по производству. Микроорганизмы рода *Salmonella* встречались на объектах значительно реже, что может быть связано с традиционно более

Таблица 18 – Результаты выявления патогенных и сапротрофных микроорганизмов на абиотических объектах разной зональности на предприятии птицеперерабатывающей промышленности

Цех	Тип объекта	Патогенные микроорганизмы		Мезофильные аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы	
		L. monocytogenes	*Salmonella*	КМАФАнМ, КОЕ/см^2	Наименование
1	2	3	4	5	6
Цех убоя, участок потрошения	ТО Машина для удаления внутренностей (металлическая цепь)	Обн.	н/о	$4,0x10^4$	*Chryseobacterium oncorhynchi* *Citrobacter gillenii* ***Pseudomonas marginalis***
Участок охлаждения парных тушек	ТО Ванна из нержавеющей стали	Обн.	н/о	$<1,0x10^1$	*Staphylococcus hominis*
Участок охлаждения парных тушек	ВО Конвейер в туннеле охлаждения тушек (цепь металлическая)	н/о	н/о	$3,0x10^4$	*Acinetobacter guillouiae* *Proteus mirabilis* ***Pseudomonas azotoformans*** ***Pseudomonas brenneri*** ***Pseudomonas gessardii*** ***Pseudomonas grimontii*** ***Pseudomonas koreensis*** ***Pseudomonas proteolytica*** ***Pseudomonas fluorescens*** ***Pseudomonas gessardii***
Участок охлаждения парных тушек	Инвентарь Пластиковый контейнер для сбора тушек	н/о	н/о	$7,0x10^3$	*Aeromonas salmonicida* ***Pseudomonas azotoformans*** ***Pseudomonas fluorescens*** ***Pseudomonas fragi*** ***Pseudomonas gessardii*** ***Pseudomonas orientalis*** *Stenotrophomonas rhizophila* ***Pseudomonas fuscovaginae***
Цех разделки и упаковки мяса птицы	ТО Машина для взвешивания и перенавески тушек (станина из нержавеющей стали)	Обн.	Обн.	$5,0x10^6$	*Empedobacter brevis* *Enterococcus faecium* *Escherichia coli* *Hafnia alvei* *Lactococcus gorvieae* *Proteus vulgaris* ***Pseudomonas putida***
Участок охлаждения парных тушек	ТО Машина для обвалки бедра (неподвижные металлические поверхности)	Обн.	н/о	$9,0x10^3$	*Aeromonas bestiarum* ***Pseudomonas azotoformans*** ***Pseudomonas fragi*** ***Pseudomonas gessardii*** ***Pseudomonas putida***
Участок охлаждения парных тушек	ТО Машина для обвалки бедра (станина из нержавеющей стали)	Обн.	н/о	$3,0x10^3$	*Macrococcus caseolyticus* ***Proteus vulgaris*** ***Pseudomonas koreensis*** ***Pseudomonas libanensis*** ***Pseudomonas putida*** ***Pseudomonas synxantha***

К–конструкция; И – инвентарь; ВО – вспомогательное оборудование; ТО – технологическое оборудование; н/о – не обнаружено; Обн. – обнаружено

- зона 1 зона 2 зона 3

пристальным и детальным контролем за данным патогеном на предпритятиях птицеперерабатывающей промышленности.

Было показано, что инвентарь и вспомагательное оборудование играют одну из ведущих ролей в распространении микроорганизмов на предприятии. Так, на внешней поверхности пластиковых контейнеров для сбора продукции и на цепи конвейера в камере охлаждения было выявлено самое большое количество видов микроорганизмов рода *Pseudomonas*, многие из которых отвечают за порчу продукции.

Оценку разнообразия микроорганизмов производственной среды птицекомбината также проводили путем определения последовательностей вариабельного фрагмента гена 16S рРНК. В результате были определены характеристики таксономического состава микробных сообществ абиотических объектов.

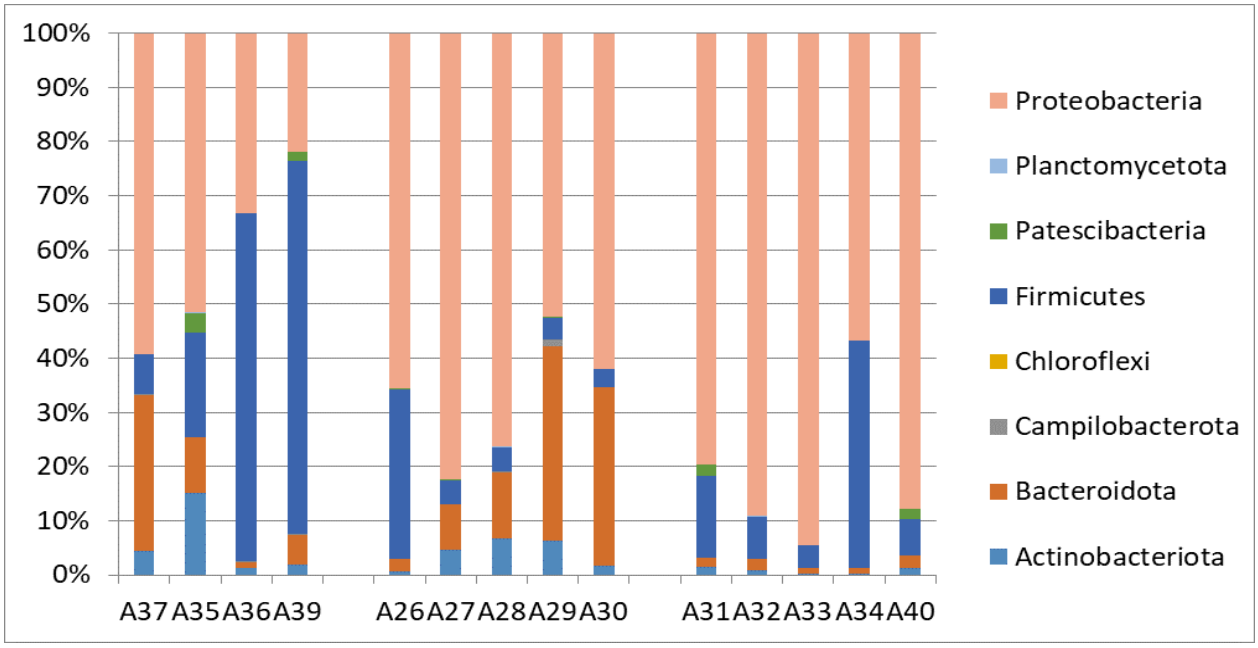


Рисунок 14 - Таксономический состав микробных сообществ образцов, отобранных на предприятии (птицекомбинат)

Для каждого образца было определено несколько тысяч фрагментов генов 16S рРНК. Проведенный таксономический анализ показал, что во всех рассмотренных образцов выделялись четыре ключевых группы бактерий,

принадлежащих филумам *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteriota* и *Bacteroidota*. Среди них были обнаружены бактерии, вызывающие порчу продуктов питания, в том числе и мясных, а также способных к биопленкообразованию. Это бактерии родов *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Arcobacter*, *Vagococcus*, *Chryseobacterium*, *Carnobacterium* и др. Также были обнаружены патогены человека и животных, это бактерии родов *Arcobacter*, *Corinobacteria*, *Listeria*.

На основании анализа полученных данных о таксономическом биоразнообразии микроорганизмов было показано, что под влиянием производственных условий на абиотических поверхностях производственной среды сформировались устойчивые консорциумы, в состав которых входят патогены и микроорганизмы, вызывающие порчу. Последнее ставит вопрос о поиске принципиально новых подходов к дезинфекции производственных поверхностей.

4.3 Исследование сезонных изменений микробных сообществ

Изучение сезонных закономерностей проводили: в конце сентября 2020 года; в феврале 2021 года и в конце августа 2021 года. Для характеристики сезонных изменений погоды в Москве в эти периоды использовали данные сайта http://weatherarchive.ru/Pogoda/ (табл. 19).

Таблица 19 – Среднемесячные значения температуры и влажности воздуха в Москве на периоды проведения сезонных исследований

Период	Среднемесячная температура воздуха, °С	Диапазон среднесуточной температуры, °С	Среднемесячная влажность воздуха, %
Сентябрь 2020 года	+11,9	+9….+14	80
Февраль 2021 года	−6,2	−8….−1	81
Август 2021 года	+17,8	+15….+21	75

Как видно из табл. 19, на момент первого отбора образцов микрофлора предприятий сформировалась под влиянием достаточно теплого сентября 2020 года, в зимний период – умеренно низких отрицательных температур февраля, которые продержались до середины марта 2021 года, а в летний период нежаркого и достаточно комфортного по температуре августа 2021 года. Разница в среднемесячной влажности воздуха в 6% между зимним и летним периодом была незначительной с точки зрения возможного влияния на формирование микрофлоры на предприятиях.

Ниже представлены результаты по изучению сезонных изменений планктонной и биопленочной микрофлоры производственной среды.

4.3.1 Закономерности сезонных изменений планктонных форм

Были изучены закономерности сезонных изменений планктонных форм микроорганизмов, населяющих объекты производственной среды на предприятии по убою и переработке птицы. Результаты выполненных исследований представлены в табл. 20, 21 и 22, соответственно, для межсезонья, зимнего и летнего периода.

Таблица 20 - Микрофлора объектов производственной среды в межсезонный период

Шифр образца	Объект	Тип объекта	Патогенные микроорганизмы			Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы	
			рода *Salmonella*	*L. mono-cytogenes*	*Campylobacter*	КМАФАнМ, КОЕ/см^2	Наименование микроорганизма
1	2	3	4	5	6	7	8
А26	Ванна охлаждения 1	ТО	н/о	**Обн. L 52**	н/о	<1,0x10^1	*Staphylococcus hominis*
А27	Тара/чистая зона	И	н/о	н/о	н/о	7,0x10^3	*Aeromonassalmonicida*
							Pseudomonas azotoformans
							Pseudomonas fluorescens
							Pseudomonas fragi
							Pseudomonas gessardii
							Pseudomonas orientalis
							Stenotrophomonas rhizophia
А28	Стена 2/чистая зона	К	н/о	н/о	н/о	9,0x10^3	*Aeromonas media*
							Aeromonas bestiarum
							Aeromonas popoffii
							Lelliottia amnigena
							Micrococcus luteus
							Pseudomonas brenneri
							Pseudomonas fuscovaginae
А29	Цепь/тоннель охлаждения	ВО	н/о	н/о	н/о	3,0x10^4	*Acinetobacter guillouiae*
							Proteus mirabilis
							Pseudomonasazotoformans
							Pseudomonas brenneri
							Pseudomonas gessardii
							Pseudomonas grimontii
							Pseudomonas koreensis
							Pseudomonas proteolytica
А30	Колесо тележки	ВО	н/о	н/о	н/о	7,0x10^5	*Enterobacter cloacae*
							Pseudomonas fluorescens
							Pseudomonas gessardii

Продолжение таблицы 20

1	2	3	4	5	6	7	8
А31	Лента/упаковка	ВО	н/о	н/о	н/о	$3,0x10^4$	*Klebsiellaoxytoca*
							Proteushauseri
							Pseudomonas gessardii
							Pseudomonas mandelii
							Pseudomonas savastanoisspsavastanoi
А32	Стол	ВО	н/о	н/о	н/о	$5,0x10^4$	*Acinetobacter berezinae*
							Chryseobacteriumgleum
							Citrobacterfreundii
							Empedobacter brevis
							Exiquobacteriumspp
							Proteus hauseri
А33	Машина б/к бедра 1	ТО	н/о	**Обн. L 50**	н/о	$9,0x10^3$	*Aeromonasbestiarum*
							Pseudomonas azotoformans
							Pseudomonasfragi
							Pseudomonas gessardii
							Pseudomonas putida
А34	Машина б/к бедра 2ж	ТО	н/о	**Обн. L 84**	н/о	$3,0x10^3$	*Macrococcuscaseolyticus*
							Proteusvulgaris
							Pseudomonas koreensis
							Pseudomonas libanensis
							Pseudomonas putida
							Pseudomonas synxantha
А35	Цепь/субпродукты	ВО	н/о	**Обн. L 48**	н/о	$4,0x10^4$	*Chryseobacteriumoncorhynchi*
							Citrobactergillenii
							Pseudomonasmarginalis

Окончание таблицы 20

1	2	3	4	5	6	7	8
А36	Машина перенавески/стойка	ТО	н/о	**Обн. L 69**	н/о	$5,0x10^6$	*Empedobacter brevis*
							Enterococcus faecium
							Escherichia coli
							Hafnia alvei
							Lactococcusgorvieae
							Proteusvulgaris
							Pseudomonas putida
А37	Стена 1/грязная зона	К	н/о	н/о	н/о	$7,0x10^6$	*Acinetobacter johnsonii*
							Comamonastestosterom
							Empedobacter brevis
							Enterococcus faecalis
							Enterococcus faecium
							Erysipelothrixinopinata
							Escherichia coli
							Klebsiella pneumoniae
							Myroidesodoratimimus
							Pseudomonas aeruginosa
							Pseudomonas mendocina
							Pseudomonas mosselii
							Stenotrophomonasmaltophilia
							Vagococcusfluvialis
							Vagococcuslutrae

Таблица 21 -Микрофлора объектов производственной среды в зимний период

Шифр образца	Объект	Тип объекта	Патогенные микроорганизмы			Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы	
			рода *Salmonella*	*L. mono-cytogenes*	*Campylobacter*	КМАФАнМ, КОЕ/см^2	Наименование микроорганизма
1	2	3	4	5	6	7	8
А 83	Ванна охлаждения 1	ТО	н/о	н/о	н/о	3,2*10^2	*Arthrobacter stackebrandtii*
							Brevundimonas vesicularis
							Candida zeylanoides
							Lactobacillus equi
							Pseudoclavibacterhelvolus
							Pseudomonas brenneri
							Pseudomonas gessardii
А 84	Тара/чистая зона	И	н/о	н/о	н/о	2*10^7	*Candida dubliniensis*
							Lactobacillus sakei
							Pseudomonas brenneri
							Pseudomonas synxantha
А 85	Стена 2/чистая зона	К	н/о	н/о	н/о	5*10^4	*Acinetobacter johnsonii*
							Citrobacter gillenii
							Pseudomonas proteolytica
А 86	Цепь/тоннель охлаждения	ВО	н/о	н/о	н/о	1*10^7	*Acinetobacterpittii*
							Candidalambica
							Lactobacillusmalefermentans
							Pseudomonas …
							Pseudomonas gessardii
							Pseudomonas marginalis

Продолжение таблицы 21

1	2	3	4	5	6	7	8
А 87	Колесо тележки	ВО	н/о	н/о	н/о	$3*10^7$	*Arthrobacter stackebrandtii*
							Candida krusei
							Cryptococcus curvatus
							Neisseria meningitidis
							Pseudomonas brenneri
							Pseudomonas chlororaphissspaurantiaca
							Pseudomonas fluorescens
							Pseudomonas koreensis
							Staphylococcus cohnii
А88	Лента/упаковка	ВО	н/о	н/о	н/о	5	*Aerococcusviridans*
							Pseudomonas coreensis
							Pseudomonas spp
							Staphylococcus capitis
							Staphylococcus hominis
А 89	Стол	ВО	н/о	н/о	н/о	$4*10^5$	*Escherichia coli*
							Hafnia alvei
							Moraxella sg Branhamella
							Pseudomonas brenneri
							Pseudomonas gessardii
							Pseudomonas putida
А90	Машина б/к бедра 1	ТО	н/о	н/о	н/о	$2,2*10^2$	*Arthrobacter sulfureus*
							Lactobacillus brevis
							Lactobacillus delbrueckii
							Pseudomonas extremorientalis
							Pseudomonas frederiksbergensis
							Pseudomonas rhodesiae
							Staphylococcus aureus
							Trichosporon gracile
							Trichosporonmucoides

Продолжение таблицы 21

1	2	3	4	5	6	7	8
А91	Машина б/к бедра 2ж	ТО	н/о	н/о	н/о	$1,8*10^3$	*Achromobacterxylosoxidansspxylosoxidans*
							Acinetobacter johnsonii
							Aeromonas veronii
							Arthrobacter ardleyensis
							Candida zeylanoides
							Chryseobacterium piscium
							Escherichia coli
							Pantoeaagglomerans
							Phomaexigua
							Pseudomonas brenneri
							Rhodotorulaminuta
							Serratia proteamaculans
							Staphylococcus epidermidis
А92	Цепь/субпродукты	ВО	н/о	н/о	н/о	$6*10^5$	*Acinetobacter johnsonii*
							Lelliottiaamnigena
							Microbacterium liquefaciens
							Pseudomonas corrugata
							Pseudomonas extremorientalis
							Pseudomonas spp
							Rhodococcuserythropolis
А93	Машина перенавески/стойка	ТО	н/о	н/о	н/о	$9*10^4$	*Acinetobacter johnsonii*
							Aeromonas salmonicida
							Aeromonas veronii
							Citrobacter braakii
							Enterococcus faecalis
							Escherichia coli
							Escherichia coli
							Hafnia alvei
							Pseudomonas corrugata
							Shewanella profunda
							Stenotrophomonas acidaminiphila

Окончание таблицы 21

1	2	3	4	5	6	7	8
А94	Стена 1/грязная зона	К	н/о	н/о	н/о	$6,6*10^2$	*Brevundimonas vesicularis*
							Candida famata
							Paenibacillus anaericanus
							Pseudomonas koreensis
							Staphylococcus chromogenes
							Staphylococcus cohnii
							Staphylococcus schleiferi
							Streptococcus suis
Обозначения: К – конструкция; И – инвентарь; ВО – вспомогательное оборудование; ТО – технологическое оборудование; н/о – не обнаружено; Обн. – обнаружено.							

Таблица 22 -Микрофлора объектов производственной среды в летний период

Шифр образца	Объект	Тип объекта	Патогенные микроорганизмы			Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы	
			рода *Salmonella*	*L. mono-cytogenes*	*Campylobacter*	КМАФАнМ, КОЕ/см^2	Наименование микроорганизма
1	2	3	4	5	6	7	8
А133	Ванна охлаждения 1	ТО	н/о	н/о	н/о	3,6*10^2	*Arthrobacter ssp*
							Brevundimonas vesicularis
							Lactobacillus plantarum
							Microbacteriumfoliorum
							Pseudomonas fiuorescens
							Pseudomonas graminis
							Rhizobium rubi
							Rhodotorulaminuta
							Shewanella profunda
А134	Тара/чистая зоны	И	**Обн**.	н/о	н/о	2,4*10^2	*Brevundimonas diminuta*
							Brevundimonas intermedia
							Candida tropicalis
							Lactobacillus salivarius
							Microbacterium phyllosphaerae
							Pseudomonas graminis
							Pseudomonas synxantha
							Pseudomonas tolaasii
							Staphylococcus lutrae
А135	Стена 2/чистая зона	К	**Обн.**	н/о	н/о	1,6*10^1	*Brevundimonas intermedia*
							Microbacterium liquefaciens
							Micrococcus luteus
							Pseudomonas brenneri

Продолжение таблицы 22

1	2	3	4	5	6	7	*8*
А136	Цепь/тоннель охлаждения	ВО	н/о	н/о	н/о	$3,3*10^3$	*Aeromonas eucrenophila*
							Aeromonas media
							Arthrobacterssp
							Brevundimonas intermedia
							Chryseobacteriumgleum
							Pseudomonas brenneri
							Pseudomonas chlororaphis
							Pseudomonas tolaasii
А137	Колесо тележки	ВО	н/о	н/о	**Обн.**	$2,1*10^4$	*Acinetobacter johnsonii*
							Aeromonas media
							Candida utilis
							Citrobacter gillenii
							Escherichia coli
							Microbacterium liquefaciens
							Pseudomonas brenneri
							Pseudomonas stutzeri
							Pseudomonas tolaasii
							Staphylococcus vitulinus
							Trichospor onmontevideense
							Vagococcusfluvialis
А138	Лента/упаковка	ТО	н/о	н/о	н/о	$2,3*10^3$	*Brevundimonas intermedia*
							Candida zeylanoides
							Corynebacterium striatum
							Cryzeobacterium piscium
							Lactobacillus delbrueckii
							Lactobacillus salivarius
							Pseudomonas brenneri
							Pseudomonas libanensis
							Pseudomonas tolaasii
							Staphylococcus vitulinus

Продолжение таблицы 22

1	2	3	4	5	6	7	*8*
А139	Стол	ВО	**Обн.**	**Обн.**	н/о	$1,1*10^3$	*Arthrobacter parietis*
							Brevundimonas intermedia
							Burkholderiaanthina
							Citrobacter gillenii
							Enterococcus faecalis
							Hafnia alvei
							Microbacterium liquefaciens
							Micrococcus luteus
							Pantoea agglomerans
							Pseudomonas arotoformans
							Pseudomonas brenneri
							Pseudomonas gessardii
							Pseudomonas mucidolens
							Serratia liquefaciens
							Shewanella profunda
А140	Машина б/к бедра 1	ТО	н/о	**Обн.**	н/о	$6,5*10^2$	*Cryzeobacterium intologenes*
							Escherichia coli
							Hafnia alvei
							Lactobacillus kefiri
							Lactobacillus malefermentans
							Pseudomonas brenneri
							Pseudomonas extremorientalis
							Pseudomonas flavescens
							Pseudomonas lundensis
							Pseudomonas putida
							Staphylococcus vitulinus
							Streptococcus parauberis

Продолжение таблицы 22

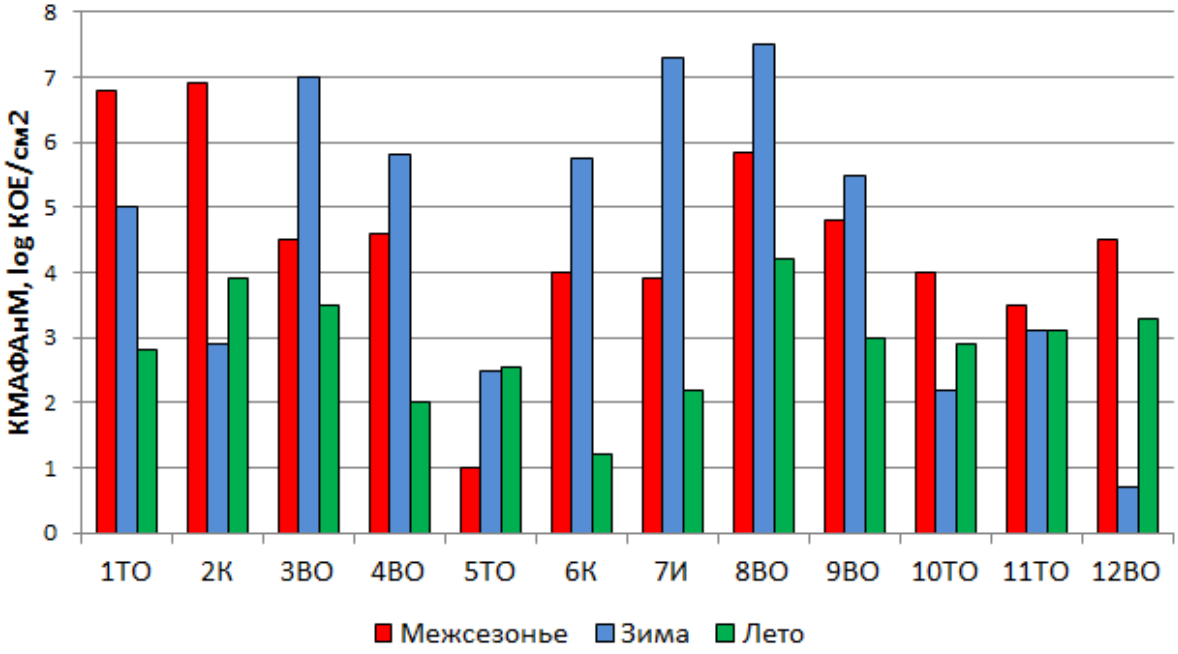
1	2	3	4	5	6	7	*8*
А141	Машина б/к бедра 2ж	ТО	н/о	**Обн.**	н/о	$1,7*10^3$	*Candida zeylanoides*
							Escherichia coli
							Microbacterium liquefaciens
							Pseudomonas brenneri
							Pseudomonas chlororaphis
							Pseudomonas gessardii
							Pseudomonas syringae
							Rhizobium radiobacter
А142	Цепь/ субпродукты	ТО	н/о	н/о	н/о	$1,1*10^2$	*Acinetobacter johnsonii*
							Escherichia coli
							Lactobacillus delbrueckii
							Microbacteriummaritypicum
							Pseudomonas chlororaphis
							Pseudomonas spp
А143	Машина перенавески/ стойка	ТО	н/о	н/о	**Обн.**	$5,4*10^2$	*Acinetobacter johnsonii*
							Aeromonas hydrophila
							Chryseobacterium indologenes
							Citrobacter freundii
							Escherichia coli
							Micrococcus luteus
							Pseudomonas mendocina
							Pseudomonas putida
							Pseudomonas sp

Окончание таблицы 22

1	2	3	4	5	6	7	*8*
А144	Стена1/ грязнаязона	К	н/о	н/о	**Обн.**	$5,5*10^3$	*Citrobacteramalonaticus*
							Lactobacillus coryniformis
							Lactobacillus plantarum
							Microbacterium liquefaciens
							Pseudomonas putida
							Pseudomonas spp
							Pseudomonas tolaasii
							Rhizobium radiobacter
							Staphylococcus cohnii
							Staphylococcus saprophyticus
							Staphylococcus succinus

Обозначения:
К – конструкция; И – инвентарь; ВО – вспомогательное оборудование; ТО – технологическое оборудование;
н/о – не обнаружено; Обн. – обнаружено.

Наглядно изменение общего количества микроорганизмов (КМАФАнМ) по сезонам и по технологической цепи производства представлено на рис. 15.



Обозначения:			
1ТО	Машина перенавески/стойка	**7И**	Тара/чистая зона
2К	Стена 1/грязная зона	**8ВО**	Колесо тележки
3ВО	Цепь/тоннель охлаждения	**9ВО**	Стол
4ВО	Цепь/субпродукты	**10ТО**	Машина б/к бедра 1
5ТО	Ванна охлаждения 1	**11ТО**	Машина б/к бедра 2ж
6К	Стена 2/чистая зона	**12ВО**	Лента/упаковка

Рисунок 15- Динамика сезонного изменения КМАФАнМ.

Результаты исследования абиотических объектов производственной среды показали, что значительные разбросы по степени контаминации наблюдались для технологического, вспомогательного оборудования, инвентаря и конструкций как в зависимости от сезона, так и в зависимости от функции и места в производственной цепи. Ожидаемая тенденция снижения КМАФАНМ от грязной зоны (начало технологического процесса) к чистой зоне (окончание технологического процесса) наблюдалась, но не была выраженной. В целом технологическое оборудование характеризовалось различным уровнем микробной контаминации от менее 10^1 КОЕ/см^2 до свыше 10^7 КОЕ/см^2.

В грязной зоне (1ТО, 2К) наблюдались в межсезонье наиболее высокие уровни микробного загрязнения (свыше 10^6 КОЕ/см^2) как на технологическом оборудовании, так и на поверхности стены. В зимнее и летнее время на этом участке наблюдалось снижение КМАФАнМ на 2 и 4 степени, соответственно, для технологического оборудования (машина для перенавеки) и для стены.

Цепи двух конвейеров, осуществляющих транспортирование тушек и субпродуктов на охлаждение (3ВО, 4ВО), продемонстрировали наиболее высокие значения микробного загрязнения в зимний период (10^5 -10^7 КОЕ/см^2), при этом в межсезонный период степень контаминации снижалась на 1-3 порядка, а в летний период – на 2-4 порядка.

Наиболее стабильные значения КМАФАнМ были отмечены для поверхности ванны охлаждения тушек (5ТО) (от 3,6х10^2КОЕ/см^2 в летний период и несколько ниже в зимний и межсезонный периоды). Стена рядом с ванной охлаждения (6К) характеризовалась уровнем контаминации от 1,6х101 до 9х103 КОЕ/см2, причем наибольшее микробное загрязнение наблюдалось зимой.

Тара и колеса тележек (7И, 8ВО) продемонстрировали зимой максимально высокий уровень контаминации - 2*10^7и 3*10^7КОЕ/см^2, соответственно. В остальные периоды у тары сохранялся приемлемый уровень – 10^2-10^3 КОЕ/см2 (с тенденцией снижения летом). У колес тележки наблюдалась аналогичная тенденция, однако уровень контаминации был выше 10^4-10^5 КОЕ/см^2.

Ожидался высокий уровень загрязнения на участке доработки кожи шеи (стол, 9ВО). Кожа шеи, как правило, имеет высокие риски, связанные с микробной контаминацией микрофлорой желудочно-кишечного тракта птицы при убое. Эта точка отбора образцов (смывов) показала уровень загрязнения 10^3-10^5 КОЕ/см^2 с тенденцией повышения в зимнее время.

Технологическая операция по удалению кости из бедренной части тушки приводит к нарушению целостности тканей тушки, вытеканию мясного сока и созданию условий для быстрого роста количества микроорганизмов. В

связи с этим, этот участок исследовался с отбором смывов в 2х местах (10ТО, 11ТО). Тем не менее, исследования показали, что уровень микробной загрязненности на этом участке не высок и составляет 10^2-10^3 КОЕ/см^2. Несколько лучшие результаты были получены в летнее и зимнее время.

Последняя точка исследований была на участке упаковке выпускаемой продукции (12ВО). Максимальное загрязнение здесь было обнаружено в межсезонный период 3,0х10^4КОЕ/см^2, минимальное – в зимний период (менее 10 КОЕ/см^2), а в летний период уровень микробного загрязнения снова возрастал до 2,3*10^3КОЕ/см^2.

В целом, в зимний период контаминация объектов производственной среды была выше (максимальное значение 3,0*10^7 КОЕ/см^2), чем в другие сезоны и представлена в основном бактериями рода Pseudomonas, а также представителями протеабактерий, которые способны расти при низких положительных температурах. В межсезонье уровень контаминации объектов производственной среды был ниже (максимальное значение 7,0*10^6КОЕ/см^2), чем зимой, но выше, чем в летний период. При более высоких температурах окружающей среды, КМАФАнМ в исследованных смывах с объектов было ниже, чем в остальные сезоны и не превышало 2,1*10^4 КОЕ/см^2, что может быть объяснено повышенным уровнем санитарной гигиены на предприятии в летний период.

Анализ санитарного состояния производственной среды по типам изучаемых объектов показал, что на технологическом оборудовании, столе и таре, имеющих непосредственный контакт с продукцией, диапазон микробной контаминации составил 5,0*10^0 – 2,0*10^7 КОЕ/см^2. Вспомогательное оборудование, неконтактирующее непосредственно с продукцией, содержало на своей поверхности 1,1*10^3–3,0*10^7 КОЕ/см^2. Стены (конструкции) - 1,6*10^1–7,0*10^6 КОЕ/см^2.Согласно нормативу, допустимое значение КМАФАнМ для объектов производственной среды составляет не более 1,0*10^3КОЕ/см^2. Однако уровень загрязнения наблюдался выше нормируемого значения, что делало объекты производственной среды

источниками загрязнения для производимой продукции. Таким образом, результаты исследования продемонстрировал зависимость общего количества микроорганизмов от типа объекта и сезона.

Параллельно количественной оценке микробного сообщества были оценены объекты на присутствие патогенов (табл. 23).

Таблица 23 – Анализ результатов исследования на наличие патогенных микроорганизмов на объектах производственной среды в различные сезоны

Патогенные микроорганизмы	Абиотические объекты производственной среды	Сезон	Зона производства
Listeria monocytogenes	Машина перенавески/стойка	Межсезонье	Грязная
	Цепь/субпродукты Ванна охлаждения 1 Машина б/к бедра 1 Машина б/к бедра 2ж		Чистая
	Стол Машина б/к бедра 1 Машина б/к бедра 2ж	Лето	Чистая
Salmonella	Стена 2/чистая зона Тара/чистая зона Стол	Лето	Чистая
Campylobacter	Стена 1/грязная зона	Лето	Грязная
	Машина перенавески/стойка Колесо тележки		Чистая

Как видно из табл. 23, абиотические объекты производственной среды могли быть источником контаминации мяса птицы патогенными бактериями родов *Salmonella, Campylobacter* и вида *Listeria monocytogenes* в межсезонье и летний период. Наличие патогенов в чистой зоне увеличивает этот риск и свидетельствует о недостаточной эффективности гигиенических мероприятий на предприятии. В холодный период (зима) патогенные микроорганизмы обнаружены не были. Полученные данные позволят изменить подходы к дезинфекции объектов производственной среды, а именно усилить санитарные мероприятия в теплое время года. Выявление патогенов в межсезонье и летом могло быть связано с повышенной активностью и более широким распространением грызунов и диких птиц в теплый период года.

Для получения более полной информации о разнообразии микроорганизмов изучаемых объектов были проведены молекулярно-генетические исследования. В результате секвенирования ампликонов 16S rRNA гена (рис. 16) во всех образцах, отобранных из объектов производственной среды, было обнаружено 25 филумов. Во всех отобранных образцах, доминировали представители филумов Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidota и Actinobacteriota. Во всех отобранных образцах, кроме A36, A94, A39 и A95, доминировали представители филума Proteobacteria, количество чтений для этого филума составляло от 46,9% до 96,5%. Вобразцах A36, A94, A39 и A95 доминировали представители филума Firmicutes - количество чтений составляло от 53,8% до 67,5%. Количество чтений представители филумов Bacteroidota и Actinobacteriota во всех образцах составляло от 0,31% до 34,7% и от 0,08% до 24,3%, соответственно.

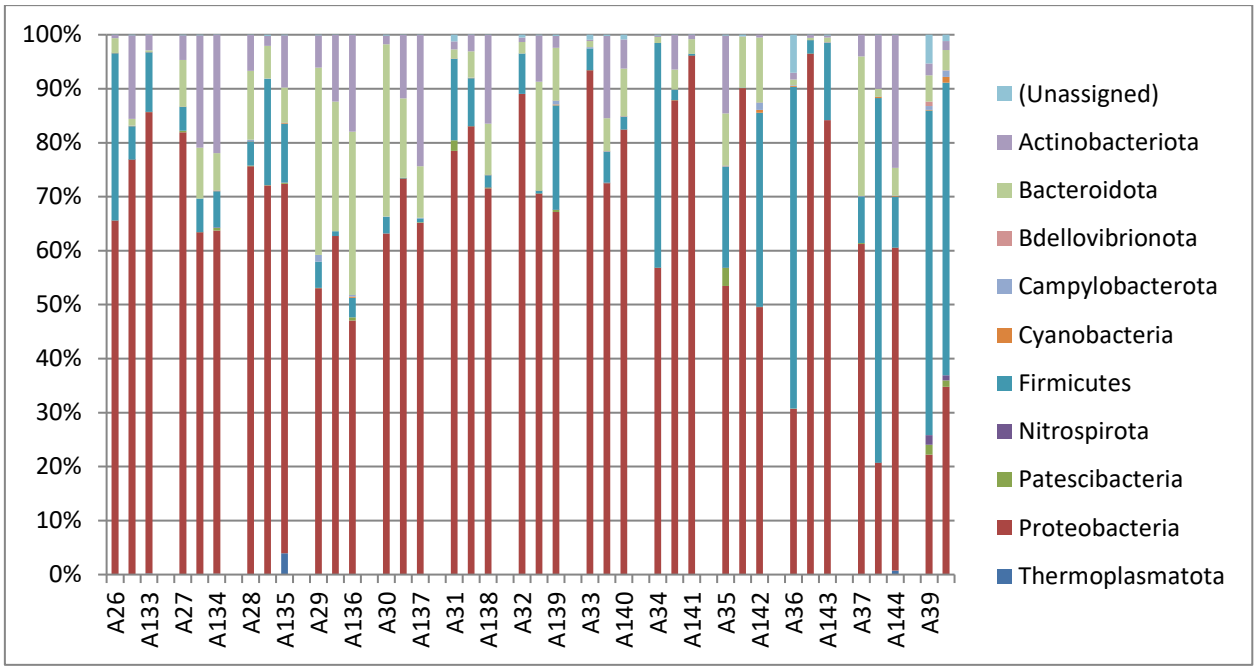


Рисунок 16 - Таксономический состав микробных сообществ образцов отобранных с предприятия птицеперерабатывающей промышленности: межсезонье - A26-A39; зима - A83-A95, лето - A133-A144. На рисунке представлены филумы, количество чтений, которых более или равно 0,5% от общего количества чтений

Наблюдение сезонной динамика количества копии генов 16S рРНК филума протеобактерий показало, что количество протеобактерий в межсезонье составило 66.81% от общих микробных сообществ. Следующие два наблюдения зимой и летом выявили не существенное увеличение количество протеобактерий в анализированных образцах (73 и 72 %, соответственно). Изменение динамики численности филума Firmicutes отличалось от изменения численности протеобактерий. Если в межсезонье численность филума Firmicutes была около 17%, то зимойона выросла в 4,3 раза, составив 72.4%. Однако летом численность филума *Firmicutes* резко упала и составила 12% от общей численности микробных сообществ. Падение численности наблюдалось у представителей филум Bacteroidota: 10.64% (межсезонье), 9.97% (зима) и 6.97% (лето). В объектах производственной среды также были обнаружены представители филума Actinobacteriota. Их численность была минимальной в межсезонье (3.65%) и увеличилась до 9.55 и 7.18% зимой и летом, соответственно.

Анализ сходства по методу Jaccard показал, что изменение состава микробных сообществ образцов зависело от сезона. Микробные сообщества, отобранные в одно время, кластеризуются вместе (рис.17).

В результате секвенирования ампликонов 16S rRNA гена в большинстве отобранных образцов были обнаружены опасные патогенных бактерии Staphylococcus aureus. При этом, в пробах А36, А94 и А144 суммарное количество чтений 16S рРНК *Staphylococcus aureus* составляло более 0,75% от общего количества чтений. В ряде образцов обнаружены потенциально патогенные бактерии вида *Campylobacter jejuni*. Однако количество чтений 16S рРНК *Campylobacter jejuni* в пробах не превышало 0,2% от общего количества чтений (табл. 24).

Таблица 24 - Патогенные бактерии, обнаруженные в результате секвенирования.

Патоген	Номер образца – относительное содержание	Номер OTE/ идентичность
Campylo-bacter jejuni	A31 - 0,03%, A35 - 0,02%, A35 - 0,13%, A134 - 0,01%, A135 - 0,01%, A139 - 0,07%, A142 - 0,19%, A143 - 0,01%, A145 - 0,01%.	Otu1164/ 99,1%
Staphylo-coccus aureus	A26 - 0,11%, A27 - 0,04%, A28 - 0,01%, A31 - 0,05%, A32 - 0,02%, A34 - 0,02%, A35 - 0,06%, A36 - 0,6%, A37 - 0,03%, A83 - 0,12%, A88 - 0,02%, A90 - 0,01%, A91 - 0,01%, A93 - 0,01%, A94 – 2,32%, A95 – 0,12%, A133 – 0,03%, A134 – 0,23%, A135 – 0,29%, A136 – 0,25%, A138 – 0,39%, A139 – 0,26%, A140 – 0,15%, A140 – 0,01%, A142 – 0,04%, A144 – 0,76%.	Otu227/ 98.9%
	A26 - 0,03%, A27 - 0,04%, A28 - 0,01%, A29 - 0,01%, A31 - 0,04%, A34 - 0,02%, A35 - 0,09%, A36 - 0,25%, A83 - 0,11%, A88 - 0,04%, A89 - 0,01%, A90 - 0,01%, A94 – 3,15%, A134 – 0,01%, A135 – 0,01%, A138 – 0,07%, A140 – 0,02%, A142 – 0,02%, A144 – 0,17%.	Otu64/ 98,7%

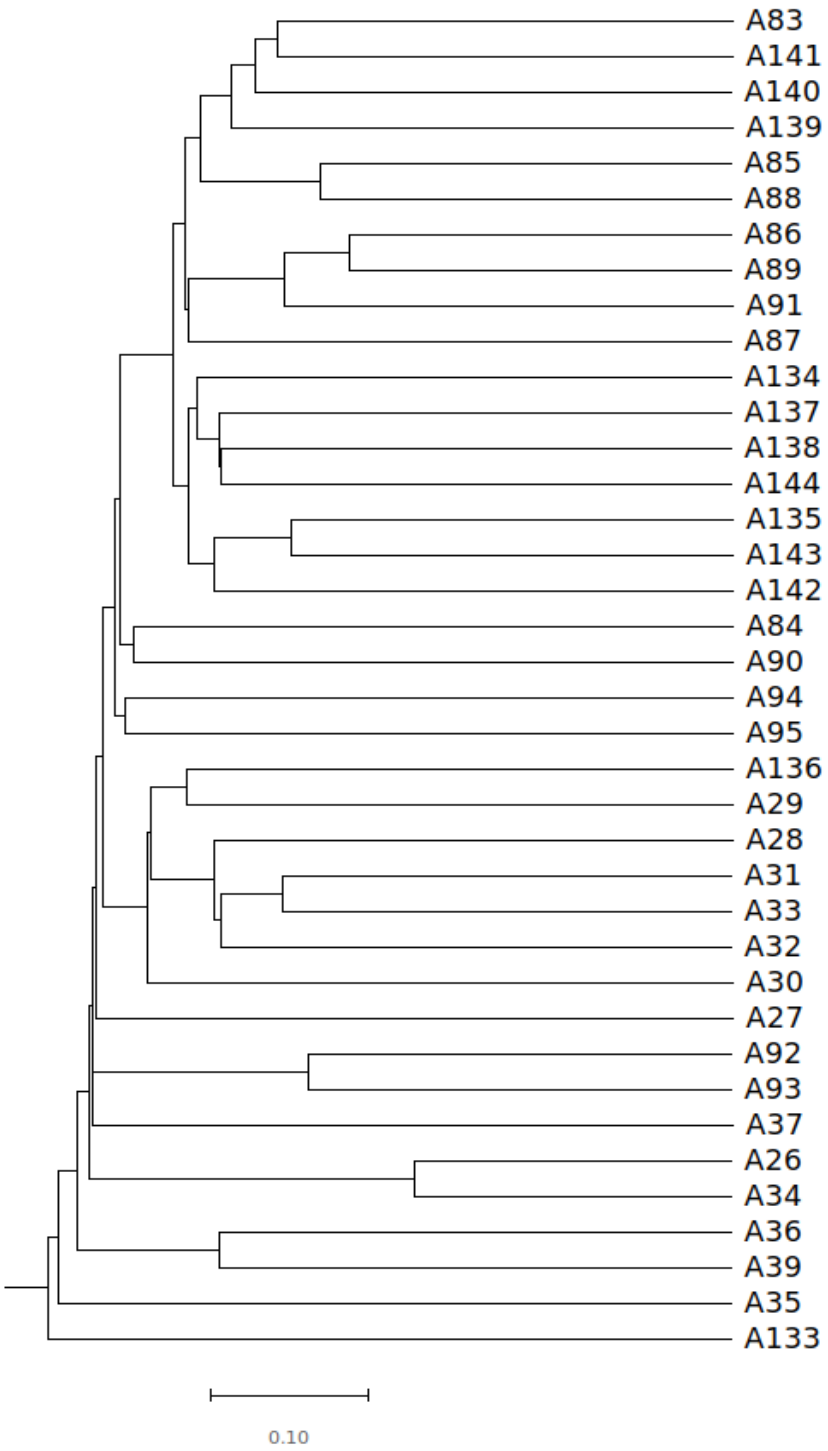


Рисунок 17 – Филогенетическое дерево на основании анализа по Jaccard, иллюстрирующее сходство микробных сообществ одновременно отобранных образцов: межсезонье - A26-A39; зима - A83-A95, лето - A133-A144.

Помимо патогенных бактерий, в образцах были детектированы бактерии родов *Brochothrix* и *Pseudomonas*, вызывающие порчу мяса и мясной продукции. Бактерии рода *Brochothrix* были обнаружены в составе образцов А26, А28, А30-А33, А85, А87-А91, А94, А134, А135, А137-А141 и А144. Число чтений данных бактерий составляло от 0,01% до 1,35%, от общего количества чтений. Бактерии рода Pseudomonas были обнаружены в составе всех образцов, количество чтений этих бактерий составляло от 0,1% до 43,6%, от общего количества чтений. Наибольшая доля бактерий рода Pseudomonas наблюдалась в образцах А27 (40,2%), А28 (38,0%), А31 (30,1%), А32 (27,9%), А33 (43, 6%) и А90 (29,9%).

Полученные с использованием комбинации классических микробиологических методов и современных – MALDI-TOF и метода секвенирования 16S рРНК были всесторонне проанализированы для каждого объекта. Подробное описание и сравнительный анализ каждого исследованного объекта в течение всех сезонов по КМАФАнМ и составу выявленной микробиоты (классическими методами и методом секвенирования) приведены в табл. 25 и 26.

Таблица 25 - Сравнительный анализ состава сапротрофной микрофлоры объектов производственной среды по сезонам

№пп	Объекты	Результаты	
		КМАФАнМ	Микробиота
1	2	3	4
1	Ванна охлаждения 1 (А26, А83, А133)	В течение года не превышал 2,56 log КОЕ/см^2, что соответствует нормативным значениям	Межсезонье: был выделен только один вид микроорганизма *Staphylococcus hominis* филума *Firmicutes*.Методом секвенирования ампликонов 16SrRNA гена в том же смыве было установлено наличие микроорганизмов, принадлежащих к филумам *Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes* и *Proteobacteria*. Зима и лето: обнаружены 7 видов микроорганизмов из 6 родов и 9 видов микроорганизмов из 8 родов, в т.ч. грибы рода *Candida zeylanoides и Rhodotorula minuta*.
2	Тара/чистая зона (А27, А84, А134)	Зима: наиболее высокие значения (низкий уровень санитарного состояния) - 2*10^{7}КОЕ/см^2 Лето: снижение на 5 log КОЕ/см$^{2.}$ Межсезонье: 9*10^3 КОЕ/см^2.	Микрофлора зимой представлена 4 видами микроорганизмов (*Candida dubliniensis, Lactobacillu ssakei, Pseudomonas brenneri, Pseudomonas synxantha*) из 3 родов и филумов. Методом секвенирования установлено наличие бактерий 4 филумов. В летний период количество выделенных видов микроорганизмов увеличивалось до 9 видов из 6 родов, представляющие 3 филума, хотя методом секвенирования было установлено наличие бактерий 6 филумов. В межсезонье было выделено из смывов 7 видов микроорганизмов из 3 родов, которые все были представителями одного филума *Proteobacteria*, что не было подтверждено методом секвенирования, а установлено наличие бактерий 5 филумов.
3	Стена 2/чистая зона (А28, А85, А135)	Зима и межсезонье: наиболее высокие значения - 5*10^4 и 9,0х10^3 КОЕ/см^2, соответственно. Лето: не выше 1,6х10^1 КОЕ/см^2.	Летом установили 4 вида микроорганизма из 4 родов из 2-х филумов, как и в межсезонье. В зимний период было выделено 3 вида микроорганизмов 3 родов, которые относились только к филуму *Proteobacteria*.
4	Цепь/тоннель охлаждения (А29, А86, А136)	Зима и межсезонье: наиболее высокие значения - 1,0х10^7 КОЕ/см^2. В остальные сезоны - ниже, но и превышала нормативное значение.	Зима: обнаружено 5 видов из 4 родов, относящихся к 3 филумам микроорганизмов. Методом секвенирования установлено наличие бактерий 4 филумов. Межсезонье и лето: разнообразная сезонная микрофлора, состояла из 8 видов (каждая), которые представляли 3 и 5 родов микроорганизмов, соответственно, при этом соотношение филумов составляло 1 и 3 соответственно.

Продолжение таблицы 25

1	2	3	4
5	Колесо тележки (А30, А87, А137)	Зима: наиболее высокие значения - $3*10^7$КОЕ/см^2. Лето: контаминация снизилась 3 log, а в межсезонье на 2 log.	В структуре микробного сообщества в течение трех сезонов были отмечены изменения. Лето: более разнообразная микрофлора - 10 родов, представленных 12 видами микроорганизмов, среди которых преоблади грамотрицательные микроорганизмы: *Pseudomonas*(вызывают порчу пищевых продуктов), *Aeromonas*, представили семейства *Enterobacteriaceae*, такие как *Citrobactergillenii* и *Escherichiacoli*. Зима: микрофлора была представлена 9 родами, которые включали 9 видов различных микроорганизмов. Также как и в летний период, преобладающей микрофлорой были 4 вида бактерий рода *Pseudomonas*. Отмечено, что в микробиоме присутствовали патогенные для человека микроорганизмы*Neisseriameningitides* (вызывают менингококковую инфекцию, которая может протекать с поражением слизистой оболочки носоглотки (назофарингит), оболочек головного мозга (менингит), септицемией). Межсезонье: наименьшее разнообразие микрофлоры - 3 вида микроорганизмов из двух родов. На протяжении всех 3х сезонов микрофлора имела в составе микрофлоры бактерии рода *Pseudomonas* оставались преобладающими.
6	Лента/ упаковка (А31, А88, А138)	Межсезонье и лето: большого разброса не было - $3{,}0x10^4$ и $2{,}3*10^3$КОЕ/см^2.	Видовой состав микрофлоры претерпевал изменения в зависимости от сезона. Лето: наибольшее разнообразие микроорганизмов - было представлено 7 родами, состоящими из 10 видов. Наиболее часто встречались представители родов как *Pseudomonas, Staphylococcus* и *Lactobacillus*. Зима и межсезонье: по количеству представленных родов в микрофлоре отличий не было. Микрофлору составляли 5 различных родов. Однако видовой состав был различен: зима - помимо *Pseudomonas*, встречались *Staphylococcus* и *Aerococcus*; межсезонье - микрофлора была представлена родами *Pseudomonas, Klebsiella* и *Proteus*.Патогенных микроорганизмов родов *Salmonella, Campylobacter* и вида *Listeriamonocytogenes* ни в одних их трех периодов не выявлено.
7	Стол (А32, А89, А139)	Лето: минимальное значение - $2{,}3*10^3$КОЕ/см^{2}Зима: максимальное - $4*10^5$КОЕ/см^2. Летом и в межсезонье существенных различий не наблюдалось	Зима: разнообразие микрофлоры не велико - представлено 6 видами из 4 родовграмотрицательных бактерий.3 из 6 видов бактерий - рода *Pseudomonas,* 1 вид *Escherichiacoli (*условно-патогенный микроорганизм). Лето: Микрофлора была более разнообразной по сравнению с межсезоньем. Выделены 15 видов микроорганизмов, принадлежащие к 12 родам. Преобладающими были грамотрицательные бактерии, в т.ч. рода *Pseudomonas, Enterobacteriaceae*.

Продолжение таблицы 25

1	2	3	4
8	Машина б/к бедра 1 (А33, А90, А140)	Межсезонье: максимальное значение - $9*10^3$КОЕ/см^2. В остальные сезоны - не выше $6,5*10^2$ КОЕ/см^2(летний период).	Лето: максимальное разнообразие микроорганизмов, было установлено 12 видов из 9 родов. Зима: микрофлора представлена 5 родами, из которых наиболее часто встречались виды из рода *Pseudomonas, Lactobacillus и Trichosporon*. Межсезонье: наименьшее разнообразие микроорганизмов, выделены микроорганизмы 2х родов*Aeromonas* (продуцент экзоферментов протеолитического действия, способен расти при низких положительных температурах) и *Pseudomonas*. Род *Pseudomonas* был представлен 4 видами. Бактерии рода *Pseudomonas* встречались во всех трех сезонах и были представлены различными видами.
9	Машина б/к бедра 2ж (А34, А91, А141)	В пределах 10^3КОЕ/см^{2}вне зависимости от сезона.	В течение 3х сезонов отмечены существенные изменения в структуре микробного сообщества. Зима: выявлены 3 рода микроорганизмов, представленные 6 видами, большинство из которых относились к роду *Pseudomonas*. Отмечено максимальное разнообразное микрофлоры, представленное 13 родами микроорганизмов, в т.ч. мезофильныеи психрофильные бактерии. Среди них, н-р, род *Serratia* (условно-патогенный, возбудитель у животных и человека гнойно-восполительных заболеваний) семейства *Enterobacteriaceae, Aeromonas veronii* (патоген для человека, возбудитель различных заболеваний от раневых инфекций и диареи до сепсиса у пациентов с ослабленным иммунитетом). Из многообразия микрофлоры был выделен лишь 1 вид, относящийся к роду *Pseudomonas* (*Ps. brenneri*). Лето: микрофлора была представлена 5 родами (8 видов) микроорганизмов, где половина видов - представители рода *Pseudomonas*. Межсезонье: микрофлора, как и летом была представлена большим количеством бактерий рода *Pseudomonas*.
10	Цепь/ субпродукты (А35, А92, А142)	Межсезонье: $4*10^4$ КОЕ/см^2. Зима: наблюдалась наибольшая контаминация - $6*10^5$ КОЕ/см^2 Лето: $1*10^2$ КОЕ/см^2.	В течение 3х сезонов отмечены изменения в структуре микробного сообщества. Межсезонье: установлены 3 рода микроорганизмов, представленные 3 видами: *Chryseobacterium oncorhynchi, Citrobacter gillenii* (частая причина внутрибольничных ангиогенных инфекций и инфекций мочевыводящих путей), *Pseudomona smarginalis*. Межсезонье и летний период: микрофлора состояла из 5 родов микроорганизмов. Рода *Acinetobacter, Microbacterium* и*Pseudomona s*были общими для обоих периодов. (Такое разнообразие требует необходимости неординарного гигиенического подхода, т.к. смазка на цепи не позволяет провести эффективную санитарную обработку)

Окончание таблицы 25

1	2	3	4
11	Машина перенавески/ стойка (А36, А93, А143)	Межсезонье: $5*10^6$КОЕ/см^2. Зима: $9*10^4$КОЕ/см^2 Лето: $5,4x10^2$КОЕ/см^2.	Грязная зона, участок потрошения – наиболее контаминированная зона. Большое видовое разнообразие мезофильных и психрофильных микроорганизмов во все периоды исследования. Межсезонье: 7 видов. Зима: 10 видов. Лето: 9 видов микроорганизмов. Два рода бактерий встречались в образцах каждого периода – *Escherichia* и*Pseudomonas*.
12	Стена 1/ грязная зона (А37, А94, А144)	Межсезонье: $7*10^6$КОЕ/см^2. Зима: $6,6*10^2$КОЕ/см^2. Лето: $5,5x10^3$КОЕ/см^2.	Разнообразие мезофильных и психрофильных микроорганизмов во все периоды исследования: в межсезонье – 14 видов, в зимний – 8 видов, в летний период – 11 видов микроорганизмов. Состав микрофлоры было различным в каждом из сезонов. В межсезонье и летом обнаружен *Staphylococcus cohnii* (эпидермальный стафилококк, живущий на коже человека; обладает высоким уровнем устойчивости к антибиотикам). В межсезонье были обнаружены условно-патогенные микроорганизмы (*Klebsiella pneumonia, Pseudomonas aeruginosa, Myroides odoratimimus*).

Таблица 26 - Филумы микроорганизмов, выявленные разными методами в разные сезоны

№ пп	Объект исследования	Филумы микроорганизмов, выявленные разными методами в разные сезоны года					
		Межсезонье		Зима		Лето	
		Классика	16 S	Классика	16 S	Классика	16 S
1	2	3	4	5	6	7	8
1.	Ванна охлаждения 1	*Firmicutes*	*Actinobacteriota Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteria, Ascomycota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteriota Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteria, Ascomycota, Firmicutes, Fungi, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Firmicutes, Proteobacteria*
2.	Тара/чистая зона	*Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Patescibacteria Proteobacteria*	*Ascomycota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Ascomycota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Cyano bacteria, Firmicutes, Patescibacteria. Proteobacteria*
3.	Стена 2/чистая зона	*Actinobacteria, Proteobacteria*	*Bacteroidota, Campylobacteria, Cyanobacteria, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*	*Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteria, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacteria, Thermoplasmatota, Cyanobacteria, Firmicutes, Nitrospirota, Proteobacteria*
4.	Цепь/тоннель охлаждения	*Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacteria, Firmicutes, Proteobacteria*	*Ascomycota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteria, Bacteroidetes, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacteria, Cyanobacteria, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*

Продолжение таблица 26

1	2	3	4	5	6	7	8
5	Колесо тележки	*Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Ascomycota, Proteobacteriaβ, Proteobacteriaγ, Firmicutes, Fungi*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Ascomycota, Firmicutes, Proteobacteriaγ, Fungi*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*
6	Лента/упаковка	*Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*	*Firmicutes, Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Ascomycota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria α*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*
7	Стол	*Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Proteobacteria α, Proteobacteriaβ, Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota, Cyanobacteria, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*
8	Машина б/к бедра 1	*Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Firmicutes, Proteobacteria γ, Fungi*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*
9	Машина б/к бедра 2ж	*Firmicutes, Proteobacteria γ,*	*Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Ascomycota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteriaβ, Proteobacteria γ, Fungi*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Ascomycota, Proteobacteria α, Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*

Окончание таблицы 26

1	2	3	4	5	6	7	8
10	Цепь/субпродукты	*Bacteroidota, Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Proteobacteria γ,*	*Bacteroidota, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Firmicutes, Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria*
11	Машина перенавески /стойка	*Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria*	*Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Proteobacteria γ,*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*
12	Стена 1/грязная зона	*Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteriaβ, Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Ascomycota, Firmicutes, Proteobacteria α, Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Firmicutes, Proteobacteria α, Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria Thermoplasmatota*

4.4 Исследование контаминации абиотических и биотических объектов производственной среды отдельными патогенными микроорганизмами

Для анализа целесообразности проведения реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности, на следующем этапе работы исследовали контаминацию мясной продукции импортного и отечественного производства различными микроорганизмами, в том числе патогенными бактериями *Campylobacter* spp. и *Listeria monocytogenes*

4.4.1 *Campylobacter spp.*

Были проведены исследования распространенности микроорганизмов рода *Campylobacter* на объектах производственной среды и продукции. Из 233 образцов производственной среды и продукции был изолирован в общей сложности 61 штамм микроорганизмов этого рода[7]. Предприятия мясной и птицеперерабатывающей промышленности различались по выявляемости *Campylobacter* spp. (рис.18).

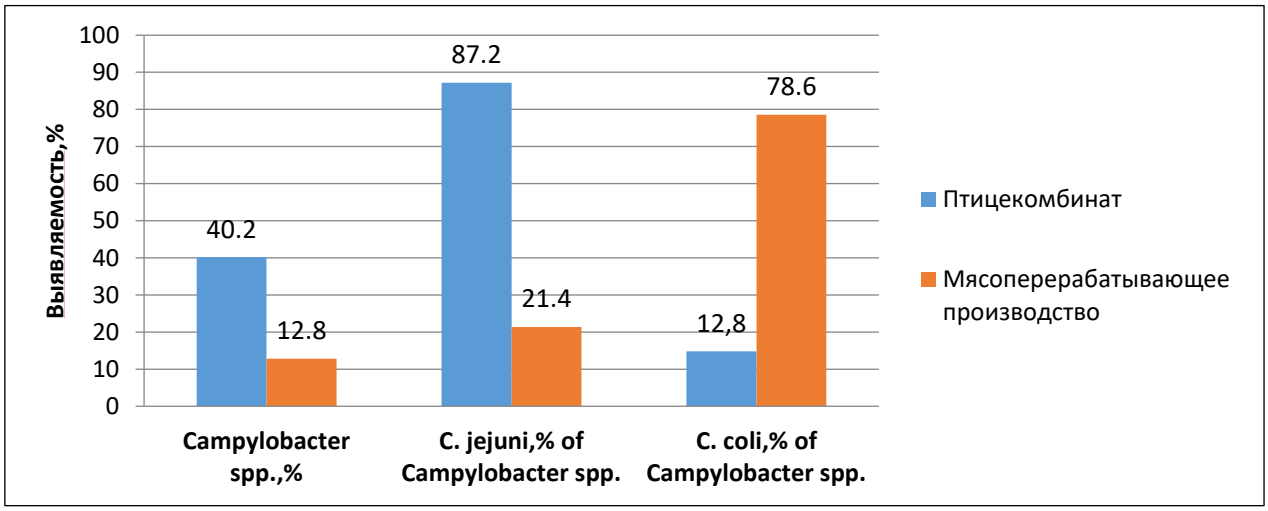


Рисунок 18 – Выявляемость микроорганизмов *Campylobacter spp.* на предприятиях.

[7] Материал, изложенный в данном разделе, опубликован в статье :Prevalence of Campylobacter spp. in a poultry and pork processing plants./ Yushina, Y., Bataeva, D., Makhova, A., &Zayko, E. (2020).// Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences, 14, 815–820. https://doi.org/10.5219/1422Q3, IF 0.26

.

Наибольшая контаминация *Campylobacter* spp. наблюдалась на птицекомбинатах. Были идентифицированы два основных представителя рода *Campylobacter* и показана высокая распространенность вида *Campylobacter jejuni*, наиболее часто вызывающего кампилобактериоз человека. Напротив, на мясоперерабатывающих предприятиях данный вид встречался редко. Однако присутствовал другой вид *Campylobacter coli* (в 95 %), который в настоящее время также рассматривается как возможный источник заболеваний.

При мониторинге объектов производственной среды птицекомбинатов (табл. 27), включая продукцию (тушки цыплят-бройлеров), в общей сложности, на разных стадия технологического процесса, 47 изолятов *Campylobacter* были выделены из 117 образцов (40,2%), из них 87,2% были идентифицированы как *C. jejuni*, а 12,8% - как *C. coli* (рис. 18).

Таблица 27 - *Campylobacter spp.* в объектах производственной среды птицекомбината

Место отбора / Образец	*Campylobacter* / всего полож. (%)	*C.jejuni* / всего полож. (%)	*C.coli* / всего полож. (%)
Участок убоя и снятия пера	32/51 (62.7)	27/32 (84.3)	5/32 (15.7)
Участок потрошения	0/9 (0)	0/0 (0)	0/0 (0)
Упаковочное отделение	1/9 (11)	1/1 (100)	0/1 (0)
Тушки птицы, в т.ч.:	14/48 (29.1)	13/14 (93)	1/14 (7)
- гузка	6/12 (50)	6/6 (100)	0/6 (0)
- бедро	3/12 (25)	2/3 (67)	1/3 (33)
- кожа	4/12 (33)	4/4 (100)	0/4 (0)
- шея	1/12 (8.3)	1/1 (100)	0/1 (0)
Всего	47/117 (40.2)	41/47 (87.2)	7/47 (14.8)

После потрошения *Campylobacter spp*. были обнаружены в 62,7% проб с объектов производственной среды. Из образцов, положительных *Campylobacter spp.,* 84,3% содержали *C. jejuni* и 15,7% - *C. coli*. Преобладание *C. jejuni* над *C.*

coli было показано другими авторами [Sánchez, L., 2017]. В этом исследовании численность *C. jejuni* и *C. coli* составляли 94,5% и 5,5%? соответственно [Sánchez, L., 2017]. Эти результаты подтвердили сообщения о том, что самые высокие показатели заражения были после потрошения [Lee, 2017]. Согласно [Facciolà, A., 2017)], во время убоя основными критическими точками контаминации тушек птицы были выявлены удаление пера и потрошение [Facciolà, A., 2017)], Другие авторы описывали убой и потрошение как критические точки контаминации микроорганизмами рода *Campylobacter* spp. [Gruntar, I., 2015; Sasaki, Y., 2013].

В настоящем исследовании *Campylobacter* spp. после потрошения обнаружено не было, однако на этапе упаковывания был выявлен *C. jejuni,* что свидетельствовало о перекрестном загрязнении в процессе производства и высоком риске приобретения такой продукции для потребителя.

Кроме того, 33% исследованных тушек цыплят-бройлеров были положительными на *Campylobacter* spp. Все положительные на *Campylobacter spp.* образцы различных частей тушек птиц были идентифицированы как *C. jejuni*.

C. coli была обнаружена лишь в пяти образцах производственной среды и лишь в одном случае в продукте.

Эти результаты подтверждали гипотезу о перекрестном заражении от контаминированных тушек абиотических поверхностей производственной среды. Исследования, проведенные ранее, показали генетическую идентичность штаммов, загрязняющих оборудование и продукцию [Elvers, K., 2011; Prachantasena, S., 2016].

Аналогичные результаты были получены и для предприятий мясной промышленности. Для оценки распростаненности *Campylobacter* spp. анализировали абиотические и биотические объекты линии по производству полуфабрикатов из свинины (табл.28).

На объектах производственной среды изучаемый патоген встречался значительно реже в сравнении с объектами птицекомбината и был прдеставлен

видом *C. jejuni*. Тем не менее, на свиных полтушах был обнаружен другой вид - *C. coli*. Данный факт объяснялся тем, что на предприятии одновременно со свининой происходила переработка и мяса птицы, которое могло являться источником распространения *C. jejuni*.

Таблица 28 - *Campylobacter spp.* в объектах производственной среды МПЗ

Место отбора / Образец	*Campylobacter* / всего полож. (%)	*C.jejuni* / всего полож. (%)	*C.coli* / всего полож. (%)
Участок подготовки сырья	2/27 (7.4)	2/2 (100)	0/2 (0)
Распиловка полутуш	1/32 (3.1)	1/1 (100)	0/1 (100)
Обвалка	1/21 (4.8)	0/1 (0)	1/1 (100)
Полутуши свиные, в т.ч.: - шейная часть - тазобедренная часть - пашина - шкура	5/36 (13.9) 2/9 (22.2) 0/9 (0) 2/9 (22.2) 1/9 (11.1)	0/5 (0) 0/2 (0) 0/0 (0) 0/2 (0) 0/1 (0)	5/5 (100) 2/2 (100) 0/0 (0) 2/2 (100) 1/1 (100)
Всего	12/116 (12.0)	3/14 (21.4)	11/14 (78.6)

Из 116 исследованных образцов в общей сложности 14 изолятов *Campylobacter* были идентифицированы: 21,4% - как *C. jejuni*, 78,6% - *C. coli*.

4.4.2 *Listeria monocytogenes*

Было проанализировано 2777 образцов продукции, в 8,8% (244 положительные пробы) из которой было обнаружено наличие данного патогена (табл.29).

Анализ полученных данных позволял отметить, что частота обнаружения *L. monocytogenes* с 2017 по 2019 гг. неуклонно росла.

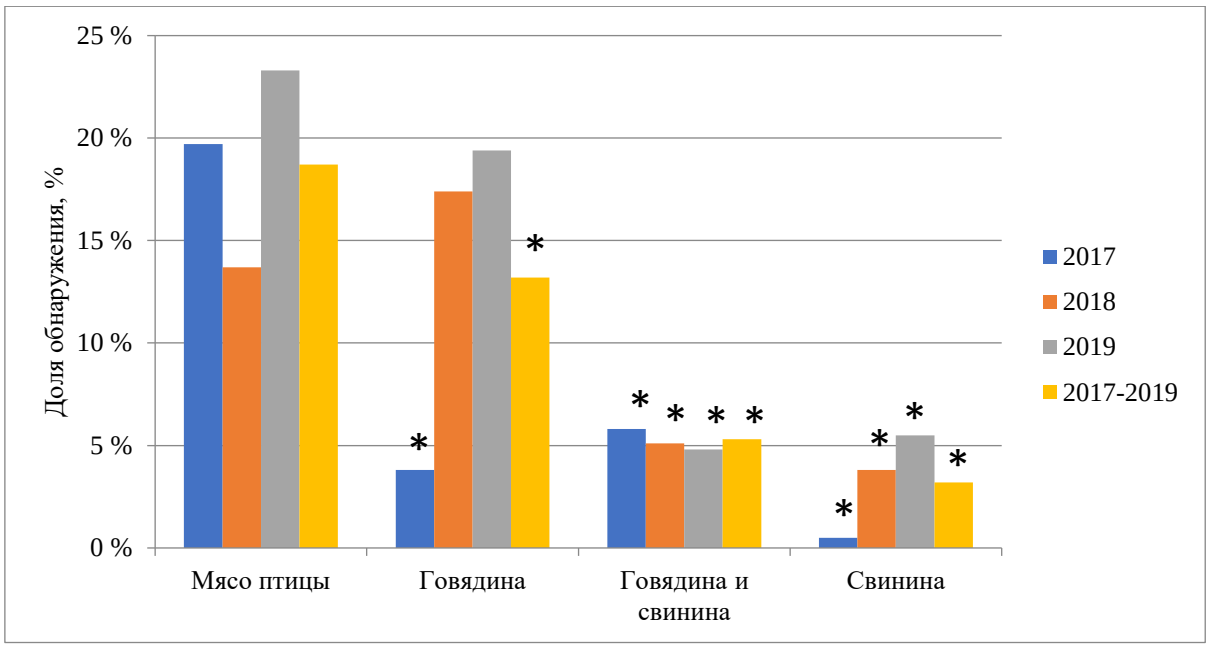
Таблица 29 - Результаты исследований разных видов мяса и количество выявлений бактерий *L. monocytogenes* в период 2017-2019 гг.

Вид мяса	2017 г. (исследовано/ выявлено)	2018 г. (исследовано/ выявлено)	2019 г. (исследовано/ выявлено)
Мясо птицы	122/24 (19,7%)	226/31 (13,7%)	223/52 (23,3%) #
Говядина	156/6 (3,8%) #	132/23 (17,4%) *	144/28 (19,4%) *
Говядина и свинина	411/24 (5,8%)	394/20 (5,1%)	336/16 (4,8%)
Свинина	213/1 (0,5%) #	239/9 (3,8%) *	181/10 (5,5) *
Всего	902/55 (6,1%)	991/83 (8,4%)	884/106 (12%) #
* – p <0,05 при сравнении с 2017 годом, # – p <0,05 при сравнении с 2018 годом			

Представляло интерес оценить влияние различных условий и факторов на выявление бактерий *L. monocytogenes* в период 2017-2019 гг. Ранжирование результатов исследований было проведено по видам мяса, технологии, а также годам и сезонам.

Анализ сырьевой состав изученной мясной продукции (рис. 19) показал, что наиболее уязвимыми с точки зрения контаминации бактериями *L. monocytogenes* являлось мясо птицы и говядина.

В 2017 г. доля обнаружений бактерий *L. monocytogenes* в мясе птицы достоверно отличалось от других видов мяса и составляла 19,7%, демонстрируя максимальное количество положительных проб среди выявлений по всем видам мяса. Доли положительных проб для продукции из смешанного сырья (говядина и свинина) и говядины были на уровне 5,8 и 3,8%, соответственно. Наименее контаминированной была продукция из свинины – всего 0,5 %.



* – p < 0,05 при сравнении с мясом птицы в тот же период

Рисунок 19 - Доли обнаружения контаминированных образцов продукции по видам мяса в период 2017-2019 гг.

В 2018 г. максимальная доля положительных проб пришлась на продукцию из говядины, составив – 17,4%, количество обнаружений листерий в мясе птицы составило13,7%, далее следовала продукция, выработанная из смешанного сырья (говядина и свинина) и свинины, занимая 5,1 и 3,8% соответственно.

В 2019 г. достоверно установлено, что большая доля всех обнаружений за изученный период прослеживалась в продукции из мяса птицы (23,3%). Второе место по степени контаминации занимала продукция из говядины – 19,4%, показав значительное количество выявлений за 2017-2019 гг. Доля мясной продукции из смешанного сырья (говядина и свинина) сократилась до 4,8% от общего количества исследованной продукции, показывая несущественную тенденцию к уменьшению выявлений за изученный период. В то же время количество обнаружений *L. monocytogenes* в свинине увеличилось до 5,5%.

Полученные данные достоверно свидетельствовали о том, что бактерии *L. monocytogenes* чаще всего присутствуют в мясе птицы и говядине, и полностью согласовывались с результатами исследований других учёных [Синельникова М.А., 2017]. Прослеживалось незначительное уменьшение доли выявлений в мясной продукции из смешанного вида сырья (говядина и свинина) с 5,8 до 4,8% и чёткое увеличение обнаружений в свинине – с 0,5до 5,5%.

Представляло интерес проанализировать выявление патогена в продукции в зависимости от способов пробоподготовки при проведении микробиологических исследований и от технологических процессов, которым подвергается мясное сырьё в процессе производства, а также в различные сезоны исследований.

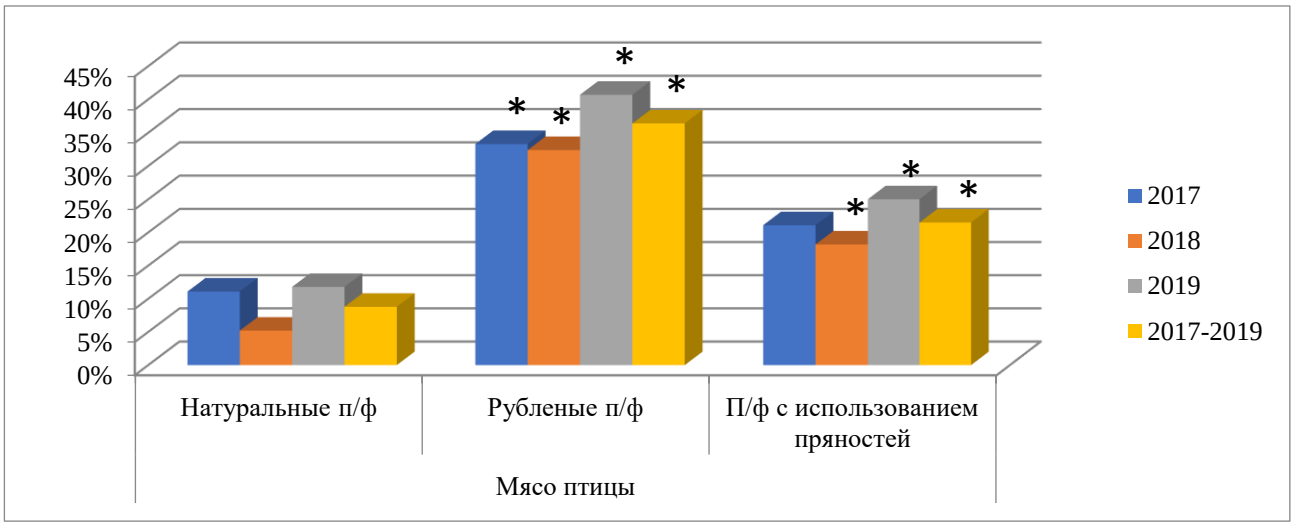
В зависимости от технологии изготовления полуфабрикатов из мяса птицы, и согласно ГОСТ 31936-2012 «Полуфабрикаты из мяса и пищевых субпродуктов птицы. Общие технические условия», полуфабрикаты из мяса птицы исследовали по видам: а) натуральные, б) рубленые, в) полуфабрикаты с использованием пряностей.

На рис. 20 результаты исследований представлены в виде диаграммы, на которой наглядно показано, что среди образцов полуфабрикатов из мяса птицы наименее контаминированными изучаемым патогеном оказались натуральные полуфабрикаты. Путём статистической обработки данных было установлено достоверное отличие натуральных полуфабрикатов от других видов во всех случаях (всего было обнаружено 23 положительных образца из 262 изученных), кроме полуфабрикатов с пряностями в 2017 г.

Максимально контаминированными оказались рубленые полуфабрикаты (43 положительных образца из 118), что, возможно, было связано с технологией их производства (в ходе измельчения площадь контакта продукта с объектами производственной среды увеличивается). Полуфабрикаты с использованием пряностей за исследованный период времени заняли промежуточное место (41 из 191), что, вероятно, может быть

связано с инактивирующим действием консервантов, входящих в конечный состав данной продукции.

За изученный период времени было исследовано также 52 тушки птицы (цыплят-бройлеров), при этом ни одной контаминированной пробы не обнаружено.



* – p <0,05 при сравнении с натуральными полуфабрикатами мяса птицы

Рисунок 20 - Доли обнаружения бактерий *L. monocytogenes* в различных видах полуфабрикатов из мяса птицы в период 2017 – 2019 гг.

В значительной степени результаты исследования зависят от методов отбора проб, выбор этих методов напрямую связан с целью исследования. В соответствии с документами по отбору проб (ГОСТ 7702.2.0-2016 «Продукты убоя птицы, полуфабрикаты из мяса птицы и объекты окружающей производственной среды. Методы отбора проб и подготовка к микробиологическим исследованиям» и ГОСТ Р ИСО 6887-2-2013) для целей оценки микробиологической безопасности применяют два способа отбора образцов для продукции из мяса птицы: деструктивный способ (иссечение ткани) с обработкой поверхности, который используется для отбора проб из глубоких слоев грудной мышцы тушек птицы и деструктивный способ без обработки поверхности продукции, который используется при исследовании всех остальных полуфабрикатов из мяса птицы. Одновременным

исследованием поверхностных и глубоких слоев полуфабрикатов оценивается микробный статус продукта в целом, с учетом его контаминации в процессе производства [Батаева Д.С., 2017]. В то же время, исследование тушки птицы, которая в дальнейшем является сырьем для производства полуфабрикатов, при использовании первого способа пробоподготовки позволяет судить о наличии бактерий *L. monocytogenes* лишь в глубоких слоях, не отражая возможной контаминации поверхностных слоёв в процессе первичной переработки. Это утверждение подтвердилось полученными в работе данными в период с 2017 по 2019 гг. по исследованиям тушек птицы, при которых использовался деструктивный способ отбора проб из глубоких слоёв с обработкой поверхности.

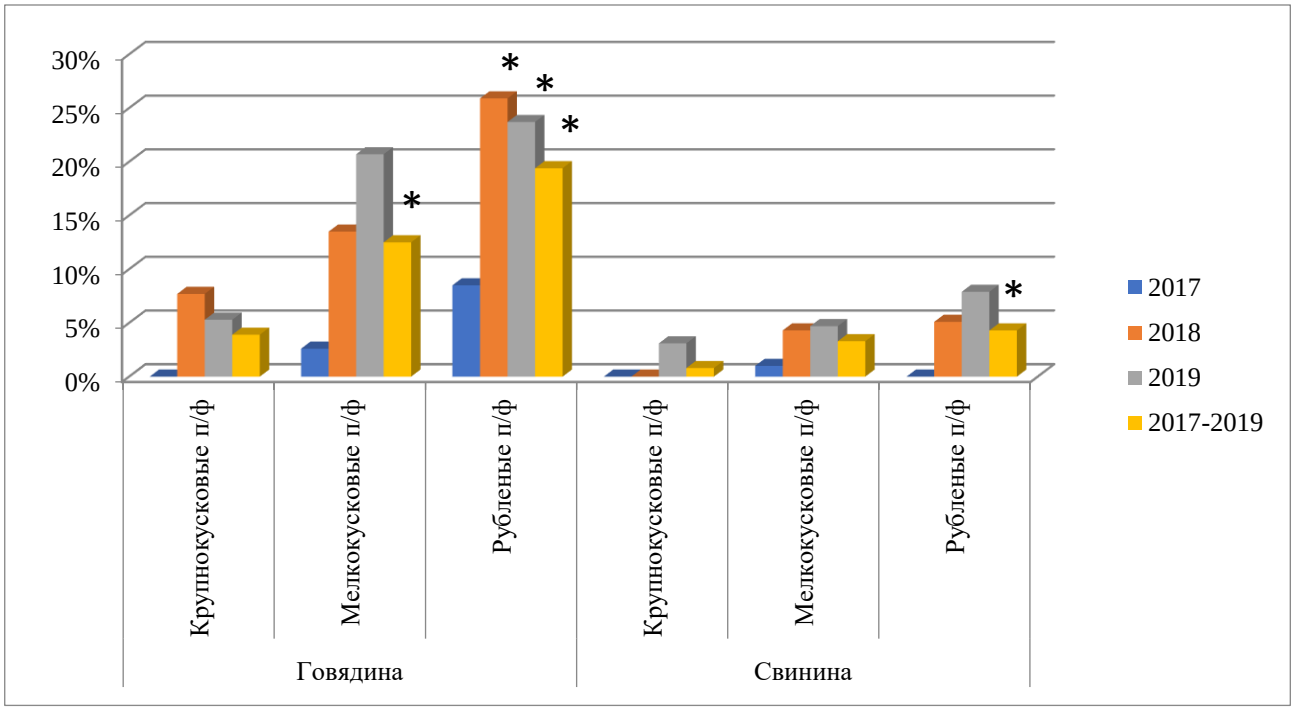
Важную роль в контаминации мясной продукции играет тот факт, что в процессе производства применяются различные технологические манипуляции (например, при измельчении полуфабриката), увеличивающие риск заражения микроорганизмом конечного продукта.

Имеет значение и контаминация тушек при убое, особенно, фекальная. Распространенность *Listeria* spp. в образцах фекалий птицы составляла 33%, из них 33% приходилось на *L. monocytogenes*) [Skovgaard N., 1998]. Листерии присутствуют в кишечнике и при ненадлежащей практике первичной переработки птицы могут контаминировать внешние кожные покровы, а также объекты производственной среды, в том числе трапы, которые считаются основным местом локализации листерий на птицефабриках. Это в свою очередь ведёт к чрезвычайно высокой степени контаминации продукции данным патогеном именно на трапах в ходе производственного процесса. Процент обнаружения листерий в трапах птицефабрик почти в 3 раза выше, чем на мясоперерабатывающих предприятиях [Логанин, П., 2017].

В соответствии с ГОСТ 32951-2014 «Полуфабрикаты мясные и мясосодержащие. Общие технические условия» и ГОСТ 33102-2014 «Продукция мясной промышленности. Классификация» все исследованные

мясные полуфабрикаты были распределены в зависимости от технологии изготовления и изучены на наличие *L. monocytogenes*.

Было установлено (рис. 21), что наименьшая контаминация бактериями *L. monocytogenes* выявлена в крупнокусковых полуфабрикатах из говядины и из свинины.



* – p <0,05 при сравнении с крупнокусковыми полуфабрикатами из говядины и свинины

Рисунок 21 - Доли обнаружения бактерий *L. monocytogenes* в различных видах полуфабрикатов из говядины и свинины в период 2017-2019 гг.

Полученные результаты объясняются тем, что в настоящее время используются разные подходы к пробоподготовке для микробиологических исследований.

Кроме того, играет роль технология рубленых полуфабрикатов, в процессе которой возрастает риск дополнительной контаминации сырья в волчках, фаршемешалках, котлетоформовочных машинах и т.д., а также с других объектов производственной среды.

Очевидно, что наблюдалось чёткое доминирование обнаружений данного патогена в полуфабрикатах из говядины по отношению к количеству

его выявлений в полуфабрикатах из свинины. Полученные данные свидетельствовали о том, что свинина в меньшей степени подвержена контаминации бактериями *L. monocytogenes*, что согласуется с результатами других исследований [Синельникова, М.А., 2017].

Исследования, проведенные ранее [Батаева, Д.С., 2017], позволяют утверждать, что поверхность 20% туш КРС после съемки шкур контаминирована *L. monocytogenes*. Другими видами рода *Listeria* контаминированы от 20 до 80% туши КРС. В тоже время глубокие слои говяжьих и свиных отрубов, как правило, свободны от *L. monocytogenes* [Батаева Д.С., 2019].

Согласно действующей нормативной документации, отбор проб от мяса в тушах, полутушах, четвертинах, в отрубах, а также от крупнокусковых полуфабрикатов, проводится из глубоких слоев, т.е. после стерилизации поверхности путем её обжига и удаления соответствующего участка. Нормативы на микробиологические показатели, указанные в ТР ТС 021/2011, приведены для оценки глубоких слоев.

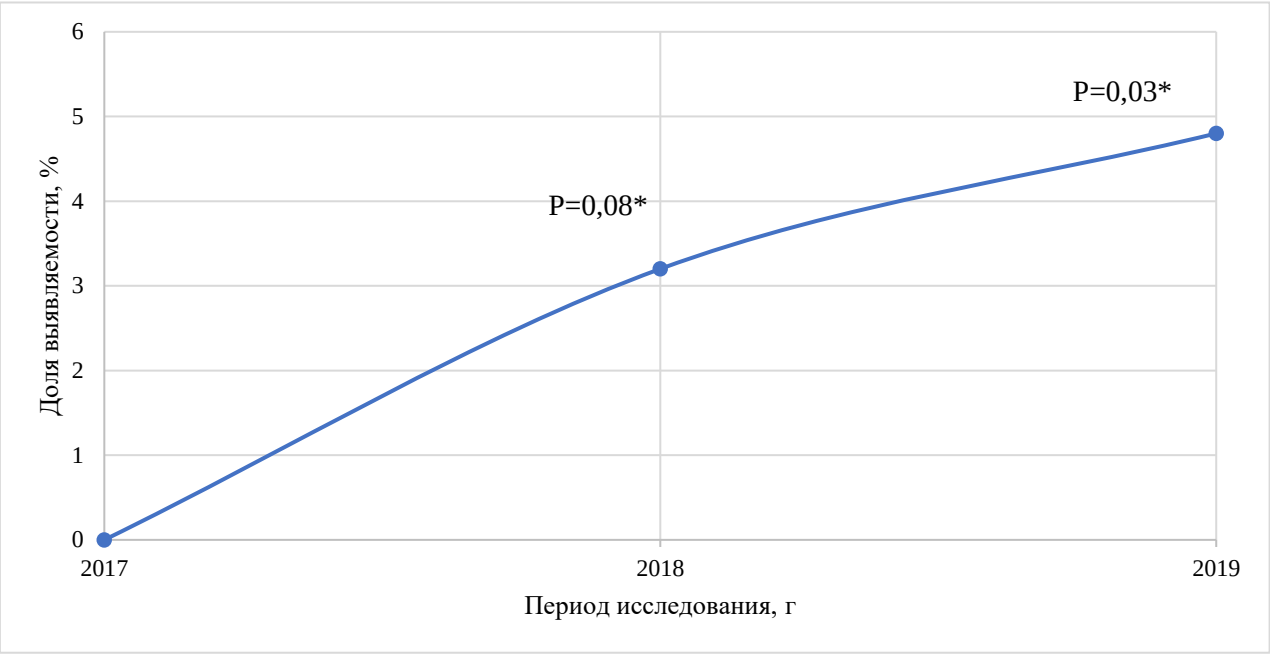
Таким образом, при исследовании мяса и крупнокусковых полуфабрикатов производится оценка только глубоких слоев, а контаминация поверхности патогенными микроорганизмами не учитывается.

В тоже время при исследовании мелкокусковых и рубленых полуфабрикатов определен другой способ пробоподготовки – без обжига поверхности, соответственно, оценивают поверхностные и глубокие слои суммарно. Такое несоответствие в оценке искажает анализ результатов микробиологических исследований. Не зная настоящего уровня контаминации поверхности туш, полутуш, отрубов крупнокусковых полуфабрикатов бактериями вида *L. monocytogenes*, производители используют такое сырье в дальнейшем для производства других видов продукции, увеличивая риск выпуска опасной продукции, а также контаминации поверхности оборудования, инструмента и других объектов производственной среды. В тоже время использование ГОСТ Р ИСО 17604-2011 «Микробиология

пищевых продуктов и кормов для животных. Отбор проб с туши для микробиологического анализа» для выявления и подсчета микроорганизмов на поверхности туши в процессе переработки убойных животных и птицы позволяет определить степень безопасности и установить риск-ориентированный подход за распространением патогенных микроорганизмов, включая *L. monocytogenes.*

Также представляло интерес оценить количество положительных проб мясной продукции, готовой к употреблению. Во всем мире уделяется огромное внимание исследованиям именно этой группы продукции и в настоящее время мониторинг на наличие бактерий *L. monocytogenes* смещен с сырья именно в сторону продуктов, готовых к употреблению, с проведением количественного определения содержания данного микроорганизма (не более 100 КОЕ/г) [U.S. Food and Drug administration, 2017].

Из рис. 22 видно, что в 2017 г. из всей изученной мясной продукции, готовой к употреблению, положительных образцов выявлено не было (всего было изучено 95 образцов). В 2018 г. доля обнаружений бактерий *L. monocytogenes* в готовой мясной продукции составила 3,2% (4 положительные пробы из 125 образцов), а в 2019 г. уже 4,8% (7 обнаружений из 146 анализируемых проб) с учётом того, что за этот год было проанализировано максимальное количество образцов.

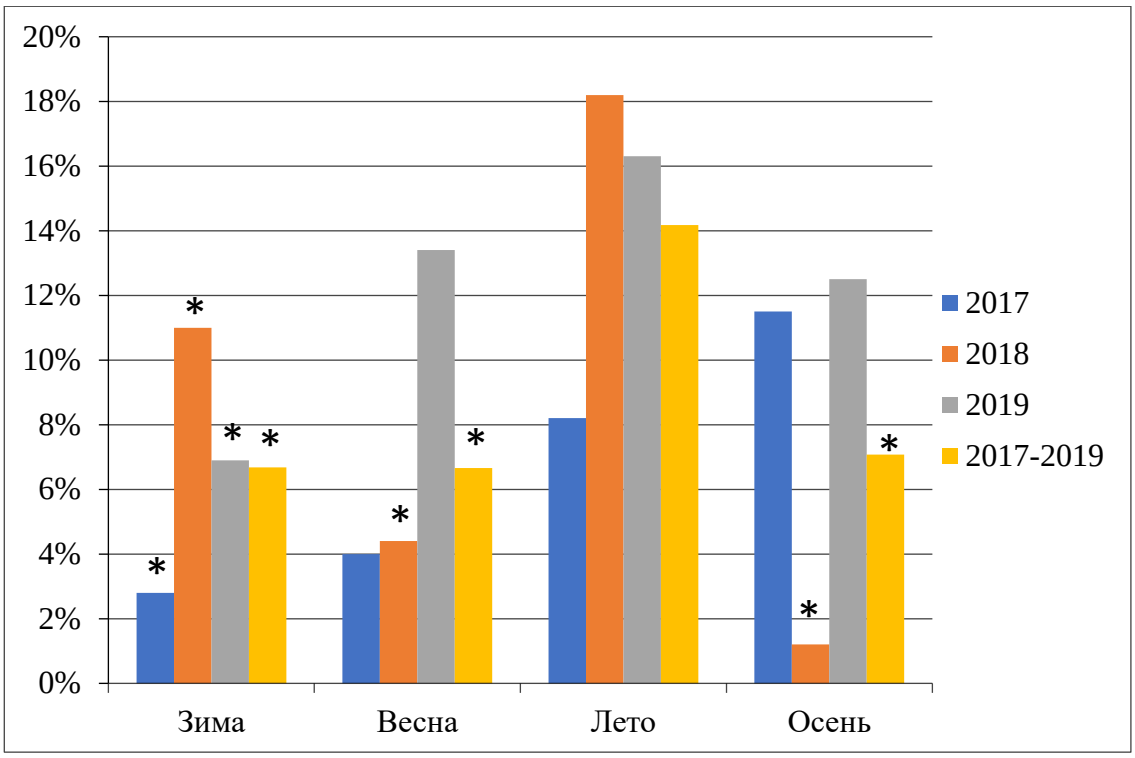


* – приведены уровни достоверности в сравнении с 2017 годом.

Рисунок 22 - Доли обнаружения контаминированных образцов мясной продукции, готовой к употреблению, в период 2017-2019 гг.

Анализ полученной динамики (рис.23) позволил выдвинуть предположение о том, что количество продуктов, готовых к употреблению, контаминированных *L. monocytogenes*, увеличивается с каждым годом.

Прогнозирование и предупреждение эпидемиологически неблагоприятных ситуаций должно быть основано, в том числе и с учетом сезонных особенностей циркуляции бактериальных патогенов. В ходе выполнения работы была изучена частота выявления *L. monocytogenes* в мясной продукции в зависимости от времени года.



* – p < 0,05 при сравнении с летним периодом времени

Рисунок 23 - Доли обнаружения контаминированных образцов мясной продукции в зависимости от сезона в период 2017-2019 гг.

Максимальное количество выявлений бактерий *L. monocytogenes* на протяжении трех лет выпадала на летний период времени, составляя в среднем 14,2%. Ряд эпидемиологов также отмечают возрастание заболеваемости ОКИ, связанной с бактериальными патогенами именно в теплое время года [Подколзин А.Т., 2015]. Вероятно, данная особенность связана с более благоприятными условиями для развития микроорганизмов и обусловлена повышением температуры окружающей среды, возможно, с нарушениями холодовой цепи при логистике пищевой продукции.

В период с 2017 по 2019 гг. доли обнаружений бактерий *L. monocytogenes* в зимний, весенний и осенний периоды находились в пределах от 6,7 до 7,1%, не имея четкого превалирования в зависимости от сезона в отличие от летнего периода времени.

Таким образом, по результатам исследований установлено, что доля обнаружений бактерий *L. monocytogenes* в мясной продукции в период с

2017 по 2019 гг. динамично расла год от года, составляя 6,1, 8,4 и 12 %, соответственно.

Полученные в ходе исследования данные позволили сделать вывод о том, что наибольшей контаминации бактериями *L. monocytogenes* подвержено мясо птицы, в среднем его доля составляет 18,7 % от всей контаминированной продукции в период с 2017 по 2019 гг., а также говядина, на которую приходится 13,2 % обнаружений патогена.

Установлено, что среди образцов полуфабрикатов из мяса птицы, пробы от которых отбирались без обжига поверхности, наименее контаминированными патогеном оказались натуральные полуфабрикаты в то время, как при исследовании тушек птицы с обжигом, в глубоких слоях бактерии *L. monocytogenes* обнаружены не были.

Также была установлена наименьшая контаминация патогеном крупнокусковых полуфабрикатов из различных видов мяса по сравнению с мелкокусковыми и рублеными полуфабрикатами. Возможной интерпретацией полученных данных, как было отмечено выше, является тот факт, что в настоящее время используются разные подходы к пробоподготовке образцов полуфабрикатов.

Анализ полученных данных показал, что выявляемость *L. monocytogenes* зависит и от состава продукта (вида мясного сырья), и от технологии изготовления, а также от способа пробоподготовки образцов для микробиологического анализа.

Определено превалирование обнаружений бактерии *L. monocytogenes* в полуфабрикатах из говядины по отношению к полуфабрикатам из свинины, свинина в меньшей степени подвержена контаминации бактериями *L. monocytogenes*.

Показано, что количество продуктов, готовых к употреблению, контаминированных бактериями *L. monocytogenes*, увеличивается с каждым годом.

Самый высокий уровень обнаружений *L. monocytogenes* в мясных продуктах был отмечен в летний период времени и составил при этом 14,2 %, что вероятно обусловлено стойкими повышениями температуры окружающей среды, возможно, с нарушениями холодовой цепи при логистике продукции и т.д.

Полученные результаты, свидетельствующие о достаточно высоком уровне контаминации листериями на различных этапах и при различных условиях производства мясной продукции, могут быть использованы для подготовки современного руководства по контролю за листериями на пищевом предприятии, а также методических рекомендаций по исследованию данных патогенов в сырье, ингредиентах и объектах производственной среды.

4.5 Изучение молекулярно-генетической взаимосвязи патогенных микроорганизмов, циркулирующих в производственной среде

При изучении разнообразия генотипов изолятов *Listeria*, выделенных на предприятиях мясной промышленности установлено, что листерии преимущественно были представлены видом *L. monocytogenes*.

19% составили изоляты *L. welshimeri*. Генетическое разнообразие *L. monocytogenes* было характерно для производства I (цех обвалки): 4 генотипа филогенетической линии II определили у исследованных изолятов (рис. 24). Преобладали изоляты ST8, выявленные на поверхностях и колесах тележек, стыке стола обвалки, клипсаторной машине. Следующие по частоте встречаемости изоляты ST321 отмечены на конвейерах. С вспомогательного оборудования (колеса тележки) и конструкции (косяка двери) получены изоляты ST121 и ST2330 (CC9 – Clonal Complex 9) (рис.24). производствах.

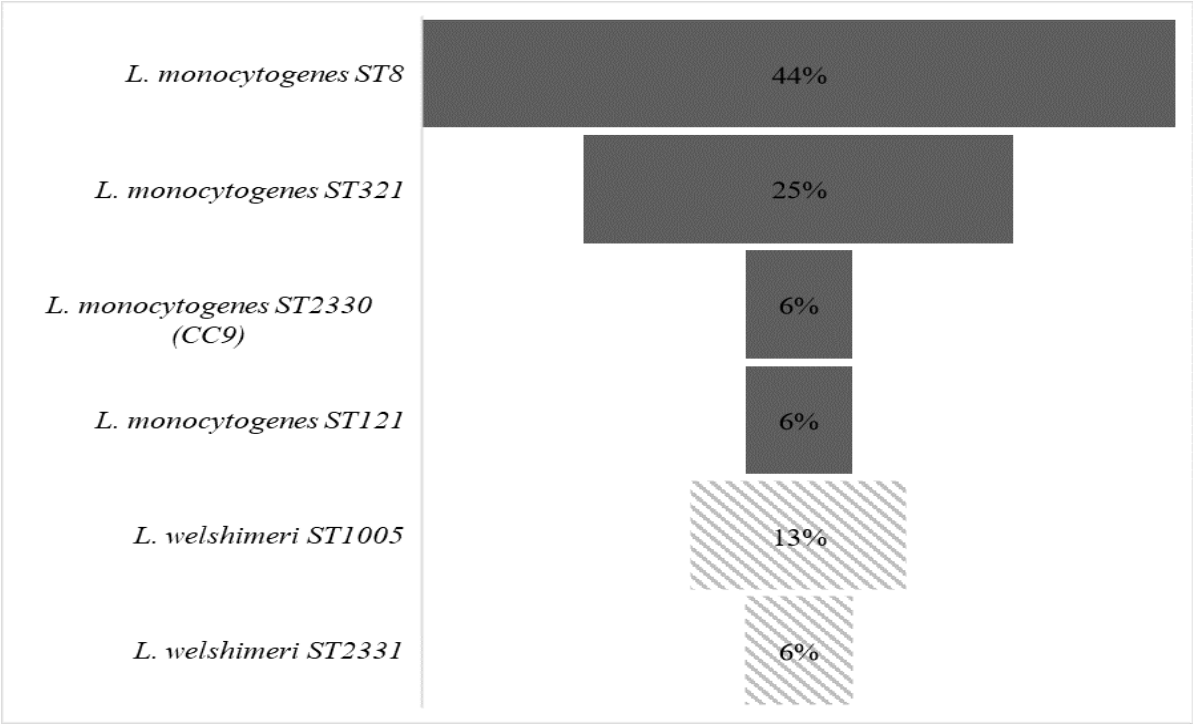


Рисунок 24 - Разнообразие генотипов листерий в выборке производственных изолятов

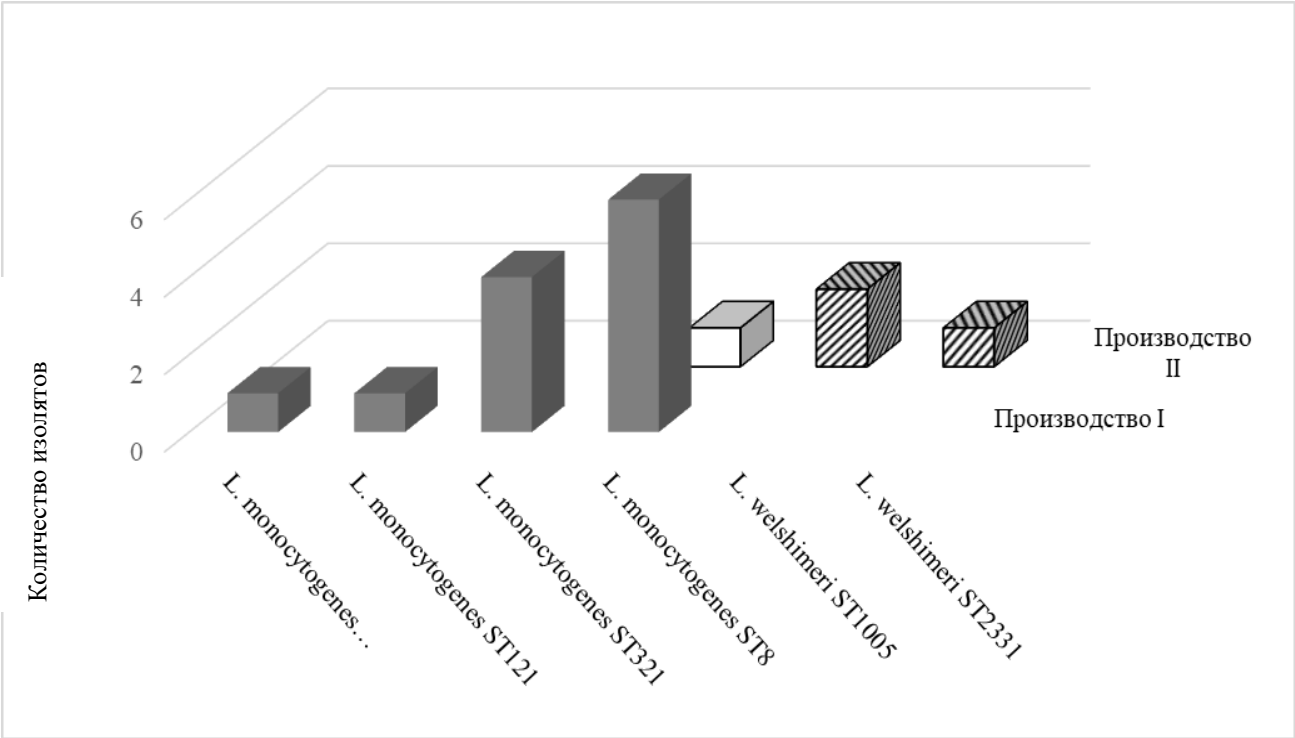


Рисунок 25 - Сопоставления перечня изолятов листерий, выделенных на двух МПЗ. Штриховкой обозначены изоляты *L. welshimeri*.

На производстве II (линия по производству вареных колбас) преобладали *L. welshimeri*, представленные генотипами 1050 и 2331 (рис. 25) и обнаруженные на оборудовании (корпус мешалки) и вспомогательном оборудовании (поверхности тележек и пластмассового контейнера). Изолят *L. moncytogenes* ST8 выделен из смыва с внешней поверхности тележки.

Представляло интерес сравнить выделенные изоляты с российскими изолятами из других источников.

В настоящее время *Listeria* Pasteur MLST database (https://bigsdb.pasteur.fr/, 13.07.2021) содержит информацию о 221 изоляте из России. Анализ этих данных и публикаций показал, что преобладавший в производственной среде ST8 во всех рассмотренных источниках (клинические изоляты от человека, изоляты из пищевых продуктов и окружающей среды) не встречается. Однако представители клонального комплекса 8 (CC8), отличающиеся от ST8 по 1 (SLV–single locus variant) или 2 (DLV–double locus variant) локусам, отмечены в единичных случаях во всех источниках (рис. 3): ST758 – в окружающей среде [Воронина, О.Л., 2015], ST2096 – в клиническом изоляте при менингите [Воронина, О.Л., 2020], ST16 –в пищевых продуктах (BIGSdb-LmID 42262, ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора).

Следующий по численности на производстве изолят ST321 был обнаружен в России впервые. Изоляты ST121 являются наиболее представленными в продуктах питания по данным ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора 2017 г. (BIG Sdb-Lm ID 37677, 37678, 37690, 37692, 37694). В других источниках ST121 не обнаружен.

ST2330 относится к CC9 и является SLVST9 по локусу dat. Изоляты ST9 выделены в России из разнообразных пищевых продуктов [Воронина, О.Л., 2020; Воронина, О.Л.,2019], (BIG Sdb-LmID37691, 37697, 37698, ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора), а также из клинического материала при менингите в 2015 и 2016 гг. (BIGSdb-LmID 37687, 42264, ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора), однако изоляты CC9 не обнаружены в выборке клинических изолятов 2018-2019 гг.[**Error! Reference source not found.**2020].

L. welshimeri среди российских изолятов отмечена впервые.

L. welshimeri, выявленные на производстве II, представляли 2 генотипа в контексте генов MLST: 1005 и 2331 (табл.30). Анализ изолятов BIGSdb-L.m показал, что база данных вместе с введенными 3 новыми изолятами содержит 19 изолятов *L. welshimeri* 7 разных генотипов, 42% из которых относятся к ST1005. Изоляты были выделены преимущественно (84%) из среды пищевых производств. ST2331 был новым в этом списке.

Сравнение геномов секвенированных изолятов GIMC2049:LmcC11 иGIMC2051:LmcC15 с геномом референсного штамма *L. welshimeri* NCTC11857 (GenBankAccessionNumberLT906444), выделенного из гниющих растительных остатков, показало, что геномы очень близки по размеру хромосомы и меньше хромосомы *L. monocytogenes* EGD-e на 110706-145573 п.н, что связано с утратой генов основного острова патогенности листерий LIPI-1 [Hain, T., 2006]. Однако изолят генотипа 2331 отличался наличием плазмиды (табл. 30).

Таблица 30 - Характеристика изолятов *L. welshimeri*

Название штамма	NCTC11857 (типовой штамм)	GIMC2049:LmcC11	GIMC2051:LmcC15
Источник выделения	гниющие растительные остатки (типовой штамм *L. welshimeri*)	среда пищевого производства	среда пищевого производства
ST	129	2331	1005
Размер генома, п.н.	2814137	2798955	2833822
Плазмида, п.н.	-	57530	-
Профаги, п.н.	59300 (интактный)	в хромосоме: 8100, 7400, 9800, 37200, 9100, 7900; в плазмиде: 6500 (все неполные)	48400 (сомнительный)

Плазмида 57530 п.н. по результатам BLAST была гомологична 8 плазмидам, депонированным в GenBankNCBI (табл. 31).

Таблица 31- Плазмиды листерий, подобные обнаруженной в геноме *L. welshimeri ST2331*

Название плазмиды	Размер плазмиды, п.н.	GenBank Accession Number	Вид листерии	Источник выделения культуры	Страна	ST	CC	Филогенетическая линия
pR2-502	57557	CP006595.1	Listeria monocytogenes	Продукты питания	США	3	3	I
pN1-011A	148959	CP006611.1	Listeria monocytogenes	Продукты питания	США	3	3	I
pL2015TE 24968	57530	CP015985.1	Listeria monocytogenes	Кровь больного листериозом	Италия	7	7	II
pAUSMDU 00000224_01	57553	CP045973.1	Listeria monocytogenes	Homo sapiens	Австрия	122	9	II
pLM1-2bUG1	57780	FR667692.1	Listeria monocytogenes	Homo sapiens	Германия	66	3	I
pCFSAN 044836	57553	CP045744.1	Listeria innocua	окружающая среда	США	448	448	Listeria innocua
pCFSAN 074382	57553	CP041214.1	Listeria monocytogenes	окружающая среда	США	3	3	I
pPIR00545	57553	CP025561.1	Listeria monocytogenes	окружающая среда	Швейцария	199	199	II

Как видно из табл. 31, большинство плазмид было выделено из изолятов *L. moncytogenes* двух филогенетических линий как от пациентов с листериозом, так и из продуктов, и из окружающей среды. Одна плазмида была обнаружена в изоляте *L. innocua*. Следует отметить, что 4 изолята представляли CC3 первой филогенетической линии, а из 3-х изолятов филогенетической линии II два изолята относились к клиническим. Большинство плазмид имело размер 57,6 -57,8 тыс. п.н. за исключением pN1-011A, существенно превышавшей по размеру другие плазмиды группы (табл. 3). Сходство плазмид с плазмидой *L. welshimeri* ST2331 составило 99,88-99,94%. В плазмиде *L. welshimeri* ST2331 были обнаружены остатки листерийного фага A006, гены белка Cas5, ассоциированного с GRISPR, Clp протеазы, NADH пероксидазы, токсина и антитоксина PemI/PemK (MazE/MazF), ABC-транспортера бетаина, АТФ-азы и регулятора транскрипции систем эффлюкса ионов тяжелых металлов (кадмия, цинка, свинца, ртути). Все эти белки необходимы для противостояния стрессам окружающей среды [Kuenne, C., 2010].

Кроме того, в геномах *L. welshimeri* ST2331 и ST1005 обнаружен оперон agr ABCD, кодирующий систему белков (accessory generegulatorprotein A, B, C, D), участвующих в непосредственной и опосредованной регуляции более 650 генов, ассоциированных с выживанием и конкурентным преимуществом в разных экологических нишах, адгезией к поверхностям, образованием биопленок, инвазией клеток, вирулентностью и глобальными изменениями в экспрессии генов [Riedel, C.U., 2009; Pinheiro, J., 2018]. Таким образом, геномные характеристики выделенных изолятов *L. welshimeri* подтверждают широкие адаптивные возможности этого вида листерий.

4.6 Изучение антибиотикорезистентности выделенной патогенной и сапротрофной микрофлоры

На следующем этапе работы было проведено полногеномное секвенирование полирезистентных штаммов сальмонелл S30, S31 и S38 (в англ. варианте - SZL30, SZL 31 и SZL 38)[8]. У данных штаммов была подтверждена множественная лекарственная устойчивость (устойчивы к 6 или более антибиотикам). Два из них (SZL 30 и SZL 31) принадлежали к *S. infantis*, а один штамм - к *S. typhimurium* (SZL 38).

Секвенирование проводили с использованием технологии Illumina (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США) и одномолекулярное секвенирование с использованием нанопор (OxfordNanopore, Оксфорд, Великобритания).

Сборка контигов для каждого штамма привела к полной кольцевой хромосомной последовательности и набору кольцевых контигов, представляющих плазмиды. Таким образом, размер хромосом секвенированных штаммов составлял от 4,68 до 5,05 × 106n.t., а количество плазмид варьировало от одной до двух в зависимости от штамма (табл. 32).

Таблица 32 - Геномы штаммов сальмонелл

Штамм	Размер хромосом (bp)	Плазмиды	
		название	размер (bp)
SZL 30	4689375	pSZL30.1	276251
		pSZL30.2	53986
SZL 31	4689704	pSZL31.1	280239
		pSZL31.2	53147
SZL 38	5052615	pSZL38.1	79333

[8] Материал, изложенный в данном разделе, опубликован в статье: Rakitin, A.L.; Yushina, Y.K.; Zaiko, E.V.; Bataeva, D.S.; Kuznetsova, O.A.; Semenova, A.A.; Ermolaeva, S.A.; Beletskiy, A.V.; Kolganova, T.V.; Mardanov, A.V.; Shapovalov, S.O.; Tkachik, T.E. Evaluation of Antibiotic Resistance of Salmonella Serotypes and Whole-Genome Sequencing of Multiresistant Strains Isolated from Food Products in Russia. //Antibiotics 2022, 11, 1.DOI:10.3390/antibiotics11010001

Анализ геномов штаммов сальмонелл SZL 30, SZL 31 и SZL 38 показал, что они содержали от 5078 до 5209 генов, кодирующих белок, причем 73% из них являлись генами с предсказанной функцией. Все секвенированные геномы содержали восемь копий 5S рРНК, по семь копий 16S рРНК и 23S рРНК и от 84 до 89 тРНК (табл. 33)

Таблица 33 - Общая характеристика геномов сальмонелл.

Тип генов	Штамм (размер хромосом (bp))		
	S30	S31	S38
Прогнозированные гены	5184	5191	5320
Кодирующие белок гены	5078	5085	5209
Кодирующие белок гены	3845	3785	3851
С прогнозированной функцией	(75,7%)	(74,4%)	(73,9%)
Гены тРНК	84	84	89

Из анализа геномов с использованием Salmonella In SilicoTypingResource (SISTR) и SeqSero2 было установлено, что штаммы S30 и SL 31 относятся к серовару *Infantis*, а штамм S38 - к серовару *Typhimurium*.

Анализ генома штаммов с использованием баз данных CARD и ResFinder 4.1 показал, что эти штаммы обладают генами устойчивости к стрептомицину (aadA1 — штамм S30, aadA2b — штамм S31, aph (3 ”) - Ib и aph (6) -Id –штамм S38), ампициллину, амоксициллину, цефазолину, пиперациллину и тикарциллину (bla_{TEM-1B}), амикацину и тобрамицину (aac (6’) -Iaa), сульфаметоксазолу (sul3-S30 и Sul3-S30; sul2-S38), триметоприму (dfrA14-S30 и S31), доксициклину и тетрациклину (tet (A) -S30 и S31; tet (B) -S38), хлорамфениколу (cmlA1), рифампицину, эритромицину и азитромицину (mefB — S30 и S31), пуромицину и эритромицину (mdfA / cmr), новобиоцину, налидиксовой кислоте и норфлоксацину (mdtABC-tolC).

Штамм сальмонелл S30 обладал конъюгативной плазмидой F-типа pSZL30.1 (276 251 n.t.), несущей гены устойчивости к антибиотикам dfrA14 и tetA. pSZL30.1 принадлежит к группе несовместимости IncFIB и содержит четыре токсин-антитоксиновых локуса (ccdA / ccdB, vapB / vapC, relB / relE и

pemI / pemK), которые отвечают за его стабильное наследование в популяции из-за механизма «постсегрегационного убийства». Конъюгативная плазмида Ti-типа pSZL30.2 (53 986 n.t.) содержит гены устойчивости sat1, cmlA1, aadA1, sul3, и bla_{TEM-1B}, принадлежит к группе несовместимости IncX1 и содержит токсин-антитоксиновый локус relB/relE. Штамм SalmonellaS31 обладал конъюгативной плазмидой F-типа pSZL31.1 (280 239 n.t.), несущей гены устойчивости к антибиотикам sat1, cmlA1, sul3, tetA, aadA2b и dfrA14. pSZL31.1 принадлежит к группе несовместимости IncFIB и содержит четыре токсин-антитоксиновых локуса (ccdA/ccdB, vapB/vapC, relB/relE и pemI/pemK). Конъюгативная плазмида Ti-типа pSZL31.2 (53 147 n.t.) из группы несовместимости IncX1 содержала токсин-антитоксиновый локус relB/relE и несла гены устойчивости к антибиотикам cmlA1, sul3 и bla_{TEM-1B}.

Штамм Salmonella S38 обладал плазмидой pSZL38.1, принадлежащей к p0111 группе несовместимости и содержащей токсин-антитоксиновый локус relB/relE. Сравнение нуклеотидной последовательности pSZL38.1 с последовательностями GenBank выявило 98,84% гомологии с pD72C штамма *E. coli* D72C, что может указывать на горизонтальный перенос генов в семействе *Enterobacteriaceae*.

Сравнение нуклеотидных последовательностей островов патогенности с геномами секвенированных штаммов показало, что геномы штаммов *Salmonella* S30, S31 и S38 содержат следующие полноразмерные острова патогенности: SPI-1, SPI -2, SPI-4, SPI-5, SPI-9, SPI-11, SPI-13, SPI-14 и CS54. Геном штамма S38 также содержал полноразмерные острова патогенности SPI-3, SPI-6, SPI-12 и SPI-16, тогда как в геномах штаммов S30 и S31 отсутствовали некоторые из генов, вовлеченных в перечисленные выше острова патогенности. Острова патогенности SPI-7, SPI-8, SPI-10, SPI-15, SPI-18, SPI-19, SPI-20, SPI-21, SPI-22 и SPI-23 не были обнаружены в геномах сальмонелл штаммовS30, S31 и S38.

Анализ наличия профагов в секвенированных геномах с помощью программного пакета PHASTER выявил 14 профагов в геноме S30 и 13

профагов в геномах S31 и S38. 15 профагов не были повреждены, а остальные были сомнительными или неполными. Сравнение последовательностей этих профагов с данными GenBank показало, что большинство из них широко распространено в геномах ранее секвенированных штаммов сальмонелл.

Геномный анализ секвенированных штаммов позволил выявить гены, ответственные за активность антибиотиков, и была определена их локализация. Было обнаружено, что штаммы сальмонелл S30, S31 и S38 устойчивы к стрептомицину (табл.57).

Устойчивость сальмонелл к аминогликозидам также связана с экспрессией ферментов, модифицирующих лекарственные препараты. Штамм S38 имел сразу два разных гена, связанных с устойчивостью к аминогликозидам, локализованными в хромосомах - aph (3”) - Ib и aph (6) –Id.

Формирование генетической устойчивости к стрептомицину у всех трех штаммов могло быть связано с интенсивным использованием стрептомицина в животноводстве, о чем свидетельствуют результаты исследования 66 образцов мяса убойных животных, в которых была обнаружена относительно высокая концентрация стрептомицина –5 × 10–1 (от 3 × 10–1 до 8 × 10–1) мг / кг при пределе 0,2 мг / кг на территории Российской Федерации. Устойчивость штаммов сальмонелл S30, S31 и S38 к β-лактамным антибиотикам могла быть вызвана наличием в геномах этих штаммов гена blaTEM-1B, локализованного в плазмидах p SZL30.2 и pSZL31.2. и в хромосоме штамма S38 (табл.34).

Таблица 34 - Гены устойчивости к антибиотикам в геномах сальмонелл.

Гены устойчи-вости	Белок	Антибиотик	Расположение для штаммов		
			S30	S31	S38
aadA1	Аминогликозид (3”) (9) - аденилилтрансфераза	Стрептомицин	pSZL30.2	-	-
aadA2b			-	pSZL31.1	-
aph(3’’)-Ib	Аминогликозид 3 ’ аденилилтрансфераза		-	-	хромосома
aph(6)-Id	Аминогликозид О-фосфотрансфераза		-	-	хромосома
bla_{TEM-1B}	β-лактамаза класса А	Ампициллин	pSZL30.2	pSZL31.2	хромосома
aac(6’)-Iaa	Хромосомно-кодируемая аминогликозид N (6’)-ацетилтрансфераза	Амикацин, тобрамицин	хромосома	хромосома	хромосома
sul3	Дигидроптероат-синтаза	Сульфаметоксазол	pSZL30.2	pSZL31.1 pSZL31.2	-
sul2			-	-	хромосома
tet(A)	Тетрациклиновый эффлюксныйтранспортер MFS	Тетрациклин	pSZL30.1	pSZL31.1	хромосома
tet(B)			-	-	хромосома
cmlA1	эффлюксный транспортер MFS семейства Bcr/CflA	Хлорамфеникол	pSZL30.2	pSZL31.1 pSZL31.2	-
mefB	эффлюксныйтранспортер MFS	Азитромицин, ERY	pSZL30.2	хромосома pSZL31.2	-
mdfA/cmr	эффлюксныйтранспортер MFS	RIF, PUR, ERY	хромосома	хромосома	хромосома
mdtABC-tolC	эффлюксныйтранспортер MFS	NB, NAL, NOR	хромосома	хромосома	хромосома

Таким образом, в результате проведенного исследования было обнаружено, что штаммы SZL 30 и SZL 31 устойчивы к следующим антибиотикам: стрептомицину, ампициллину, амикацину, тобрамицину, триметоприму, сульфаметоксазолу, тетрациклину и хлорамфениколу, что коррелировало с выявленными генетическими элементами, фиксированными в геноме или локализованными в плазмидах. Однако выявленная фенотипическая устойчивость к имипенему не была подтверждена на генетическом уровне; возможно, что генетические детерминанты

устойчивости к имипенемам могут быть неспецифическими генами-носителями. Была показана фенотипическая устойчивость штамма SZL 38 к следующим антибиотикам: стрептомицину, ампициллину, амикацину, тобрамицину, триметоприму, сульфаметоксазолу и тетрациклину. Для штамма SZL 38 наблюдалась 100% корреляция между фенотипическими и генотипическими данными. На основе анализа геномов этих штаммов были идентифицированы генетические детерминанты, предположительно ответственные за устойчивость к стептомицину, ампициллину, амикацину, и тетрациклину.

Сравнение нуклеотидных последовательностей плазмид pSZL30.2 и pSZL31.2 с данными GenBank показало, что они проявляют наивысшую гомологию (99,9%) при 66%-ном покрытии с безымянной плазмидой из штамма *Shigella flexneri* 95-3008 (CP026773.1). Все гены устойчивости к антибиотикам, обнаруженные в штамме *Salmonella* SZL 38, были локализованы в хромосоме.

Показано, что геномы штаммов *Salmonella* SZL 30, SZL 31 и SZL 38 содержали полноразмерные острова патогенности: SPI-1, SPI-2, SPI-4, SPI-5, SPI-9, SPI-11, SPI- 13, SPI-14 и CS54. Кроме того, в геноме штамма SZL 38 были обнаружены полноразмерные острова патогенности SPI-3, SPI-6, SPI-12 и SPI-16. Появление штаммов различных сероваров сальмонелл с множественной лекарственной устойчивостью указывает на необходимость дальнейших исследований путей передачи этих генетических детерминант и мониторинга распространения этих микроорганизмов.

4.7 ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 4

При оценке разнообразия состава микрофлоры абиотических объектов отмечена сезонная изменчивость. Так, на вспомогательном оборудовании в межсезонье встречалось до 14 видов, в зимний – 8 видов, в летний период – 11 видов микроорганизмов, в том числе *Klebsiella pneumonia, Pseudomonas*

aeruginosa, Myroides odoratimimus, вызывающие тяжелые инфекции человека и обладающие устойчивостью к антибиотикам последнего выбора.

Результаты исследования абиотических объектов производственной среды показали, что значительные разбросы по степени контаминации наблюдались для технологического, вспомогательного оборудования, инвентаря и конструкций как в зависимости от сезона, так и в зависимости от функции и места в производственной цепи. Ожидаемая тенденция снижения КМАФАНМ от грязной зоны (начало технологического процесса) к чистой зоне (окончание технологического процесса) наблюдалась, но не была выраженной. В целом технологическое оборудование характеризовалось различным уровнем микробной контаминации от менее 10^1 КОЕ/см^2 до свыше 10^7 КОЕ/см^2.

Исследования, выполненные в данное главе, были использованы для подготовки новой редакции ГОСТ 32031 (Приложение В).

Тара и колеса тележек продемонстрировали зимой максимально высокий уровень контаминации - $2*10^7$и $3*10^7$КОЕ/см^2, соответственно.

Абиотические объекты производственной среды могли быть источником контаминации мяса птицы патогенными бактериями родов *Salmonella, Campylobacter* и вида *Listeria monocytogenes* в межсезонье и летний период. Наличие патогенов в чистой зоне увеличивает этот риск и свидетельствует о недостаточной эффективности гигиенических мероприятий на предприятии. В холодный период (зима) патогенные микроорганизмы обнаружены не были. Полученные данные позволят изменить подходы к дезинфекции объектов производственной среды, а именно усилить санитарные мероприятия в теплое время года. Выявление патогенов в межсезонье и летом могло быть связано с повышенной активностью и более широким распространением грызунов и диких птиц в теплый период года. Наибольшая контаминация *Campylobacter* spp. наблюдалась на птицекомбинатах. Были идентифицированы два основных представителя рода *Campylobacter* и показана высокая распространенность вида *Campylobacter*

jejuni, наиболее часто вызывающего кампилобактериоз человека. Напротив, на МПЗ данный вид встречался редко. Однако присутствовал другой вид *Campylobacter coli* (в 95 %), который в настоящее время также рассматривается как возможный источник заболеваний.

При мониторинге объектов производственной среды птицекомбинатов, включая продукцию (тушки цыплят-бройлеров), в общей сложности, на разных стадия технологического процесса, 47 изолятов *Campylobacter* были выделены из 117 образцов (40,2%), из них 87,2% были идентифицированы как *C. jejuni*, а 12,8% - как *C. coli*.

Проведены микробиологические исследования контаминации мясных продуктов импортного и отечественного производства патогенными бактериями *Listeria monocytogenes* в зависимости от вида мяса, технологии и сезонности в период с 2017 по 2019 гг. Было проанализировано 2777 образцов продукции, в 8,8 % из которой было обнаружено наличие данного патогена (244 положительные пробы). Объектами исследования были образцы мясных продуктов из различных видов сырья: полуфабрикаты из мяса птицы натуральные, рубленые и полуфабрикаты с использованием пряностей; кусковые и рубленые полуфабрикаты из говядины и свинины, полуфабрикаты из смешанного мясного сырья – в тесте и рубленые. Также были проанализированы мясные продукты готовые к употреблению.

Установлено, что частота обнаружения бактерий *L. monocytogenes* в мясной продукции за три года наблюдения (2017-2019 гг.) возрастала. Наибольшая выявляемость данного патогена приходится на продукцию из мяса птицы, в среднем составляя 18,7 % (107 из 571 исследованных образцов), на втором месте по контаминации продукция из мяса говядины – 13,2 % (57 из 432 исследованных образцов). На долю мясной продукции из смешанного сырья (говядины и свинины) пришлось 5,3 % (60 из 1141 исследованных образцов) исследованных образцов, в полуфабрикатах из свинины бактерии *L. monocytogenes* обнаружены всего в 3,2% (20 из 633 исследованных образцов) случаев.

Среди изученных полуфабрикатов из мяса птицы (пробы от которых отбирались без обжига поверхности), минимально контаминированными изучаемым патогеном оказались натуральные полуфабрикаты, в то время как при исследовании тушек птицы целиком (с обжигом), в глубоких слоях бактерии *L. monocytogenes* обнаружены не были. Также, с каждым годом увеличивается количество готовых к употреблению продуктов, заражённых патогенными бактериями *L. monocytogenes.*

Отмечено, что технология полуфабрикатов в значительной степени влияет на уровень контаминации *L. monocytogenes* мясных продуктов. В процессе производства применяются различные технологические подходы, увеличивающие риск заражения готового продукта, поскольку нет своевременных данных об обсемененности листериями сырья, из которого данный продукт изготовлен. Установлено, что существенную роль для микробиологических исследований играют различные подходы к пробоподготовке анализируемых образцов мясных отрубов, крупно- и мелкокусковых, а также рубленых полуфабрикатов. Так, в сырье (в тушах, полутушах) и крупнокусковых полуфабрикатах производится оценка на наличие бактерий *L. monocytogenes* в глубоких слоях мышечной ткани с предварительным обжигом, а контаминация листериями поверхности остается не учтённой. В то же время для исследования мелкокусковых и рубленых полуфабрикатов установлен другой способ пробоподготовки – без обжига поверхности, соответственно оценивают поверхностные и глубокие слои суммарно. Такой подход в оценке искажает истинное положение дел. Не зная настоящего уровня контаминации поверхности туш, полутуш, крупнокусковых полуфабрикатов бактериями вида *L. monocytogenes*, производители используют такое сырье в дальнейшем для производства других видов мясных полуфабрикатов, увеличивая риск выпуска небезопасной продукции, с последующей контаминацией оборудования, рабочих поверхностей и других объектов производственной среды.

Максимальная выявляемость бактерий *L. monocytogenes* в мясных продуктах на протяжении трех лет наблюдений приходилась на летний период времени, составляя 14,2 % (из 755 исследованных проб в летний период выявлено 107 положительных). В период с 2017 по 2019 гг. количество обнаружений в зимний, весенний и осенний месяцы в среднем варьировало в пределах 6,7-7,1%.

При изучении геномных характеристик *Listeria monocytogenes* и *L. welshimeri*, выделенных с двух МПЗ преобладающим генотипом *L. monocytogenes* был ST (SequenceType) 8. Разнообразие дополняли ST321, 121, ST2330 (CC9 – ClonalComplex 9). L. welshimeri, была представлена ST1050 и 2331. Геномные характеристики изолятов *L. welshimeri* подтвердили их высокие адаптивные возможности, как к условиям производства (включая устойчивость к дезинфектантам), так и к метаболическим особенностям желудочно-кишечного тракта животных. *L. monocytogenes* CC9 и CC121 и в других странах коррелируют с пищевыми производствами. Однако *L. monocytogenes* CC8 и 321 могут вызывать заболевание инвазивным листериозом. Совпадение профиля интерналинов производственного изолята ST8 с клиническим изолятом ST2096 (CC8) вызывает настороженность.

Проведенное исследование показало эффективность молекулярно-генетических методов в определении разнообразия листерий, выявленных на МПЗ, и заложило основы мониторинга персистирующих контаминантов.

Таким образом, в результате проведенного исследования было обнаружено, что штаммы SZL 30 и SZL 31 устойчивы к следующим антибиотикам: стрептомицину, ампициллину, амикацину, тобрамицину, триметоприму, сульфаметоксазолу, тетрациклину и хлорамфениколу, что коррелировало с выявленными генетическими элементами, фиксированными в геноме или локализованными в плазмидах. Однако выявленная фенотипическая устойчивость к имипенему не была подтверждена на генетическом уровне; возможно, что генетические детерминанты устойчивости к имипенемам могут быть неспецифическими генами-

носителями. Была показана фенотипическая устойчивость штамма SZL 38 к следующим антибиотикам: стрептомицину, ампициллину, амикацину, тобрамицину, триметоприму, сульфаметоксазолу и тетрациклину. Для штамма SZL 38 наблюдалась 100% корреляция между фенотипическими и генотипическими данными. На основе анализа геномов этих штаммов были идентифицированы генетические детерминанты, предположительно ответственные за устойчивость к стептомицину, ампициллину, амикацину, и тетрациклину.

ГЛАВА 5. ИЗУЧЕНИЕ БИОПЛЕНОК ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ

5.1 Изучение состава нативных биопленок

В России изучению биопленочной контаминации пищевых производств уделяется явно недостаточное внимание. Вместе с тем разработка эффективных методов и средств борьбы с БП на предприятиях пищевой промышленности возможна только на основе разносторонних исследований биопленкообразования, учитывающих региональные условия, местную специфику поступающего сырья, условий его обработки и переработки и др.

На данном этапе исследований изучали наличие биопленок в различных технологических зонах мясоперерабатывающего завода как возможного резервуара контаминирующей микрофлоры и определяли таксономический состав биопленок, их структурную организацию, морфологическую и возрастную гетерогенность биопленочного консорциума.

Это исследование являлось базовым для дальнейшего изучения сезонной динамики биопленкообразования на мясоперерабатывающих предприятиях, изменения таксономических, возрастных и структурных характеристик БП, с целью разработки эффективных способов подавления развития и (перекрёстного) распространения биопленочных микроорганизмов, в том числе патогенов на предприятиях пищевой промышленности.

5.1.1 Микроскопический анализ биопленок.

Световая микроскопия располагает большими возможностями для изучения биопленок, в том числе, использованными в настоящей работе методами трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) – исследованием ультратонких срезов совокупно с цитохимическим анализом кислых мукополисахаридов биопленочного матрикса.

Визуально отобранные в разных местах и цехах МПЗ биоплёнки различались толщиной и консистенцией. *Образец 3* представлял собой тонкую сухую биопленку (БП), в отличие от других, непригодную для получения и исследования ультратонких срезов. Она была изучена только методами метагеномного анализа.

Микроскопический анализ ультратонких срезов БП выявил во всех образцах хорошее развитие биополимерного матрикса, различающегося в разных образцах плотностью и химическим составом. В *Образцах 2, 4, 5* наряду с полисахаридным матриксом, окрашиваемым рутениевым красным, обнаруживались непрокрашиваемые околоклеточные области матрикса, по-видимому, белковой или нуклеиновой природы.

Все образцы были представлены поливидовыми биопленками, гетерогенными как по морфологии бактериальных клеток, так и их предполагаемому физиологическому возрасту.

Ниже приведено описание ультраструктуры образцов нативных биопленок, отобранных в различных местах МПЗ.

Образец 1, отобранный в стыках швов разделочного стола в цехе обвалки и жиловки, отличался наибольшей гетерогенностью микробного населения по морфологии клеток и их физиологического возрасту (рис. 26, 27). Видны очень крупные (более 2 мкм) клетки мышечной ткани, захваченные в БП, и бактериальные клетки нескольких морфотипов (рис. 26). При большем увеличении (рис. 27) были обнаружены мембранные везикулы (В), формирующиеся на клетках, а также выявляемые в матриксе. Обнаруживаемые в БП везикулы рассматривались как производные наружной мембраны грамотрицательных бактерий, что связано с транспортом из клетки экзоферментов и эндотоксинов [Sarah R., 2006; Vitse. J., 2020].

Особо были отмечены необычные «волосатые» клетки, выявляемые как при малом (рис. 26), так и большом (рис. 27) увеличении. Такие клетки, покрытые плотным фибриллярным слоем (ФС), были впервые обнаружены как характерный морфотип клеток-персистеров I типа у бактерии

Staphylococcus aureus [Демкина., 2015]. Персистеры обнаруживались в культуре, выращенной в богатой среде (LB), после воздействия на 24-часовую культуру (стационарная фаза) антибиотика ципрофлоксацина как антибактериального селектирующего агента, убивающего ординарные вегетативные клетки и оставляющего нативные антибиотикотолерантные клетки-персистеры [Levin-Reisman, I., 2017; Bergh Van den, 2016].

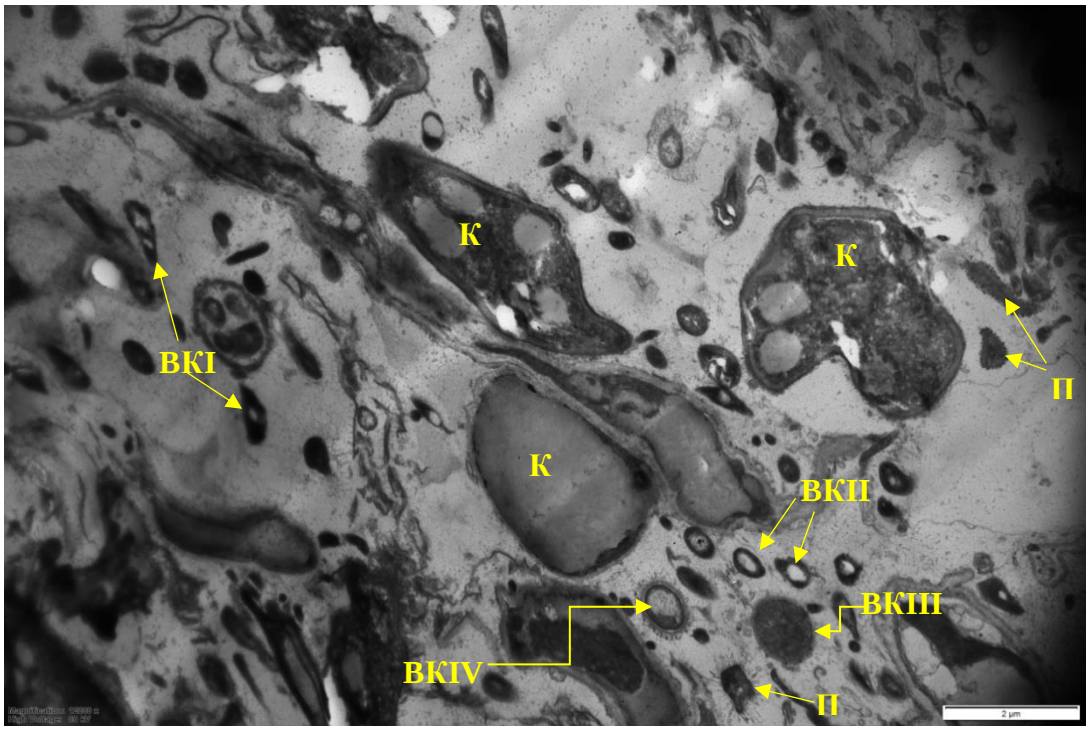


Рисунок 26 - Электронная микрофотография биоплёнок образца 1. Обозначения: ВКI; ВКII; ВКIII, ВКIV – вегетативные клетки морфотипов I-IV, соответственно; П – персистеры, покрытые фибриллярным слоем; ФС – фибриллярный слой; КМ – клетки мяса.

Матрикс БП №1, как и остальных образцов, был образован полисахаридами и хорошо прокрашивался рутением красным.

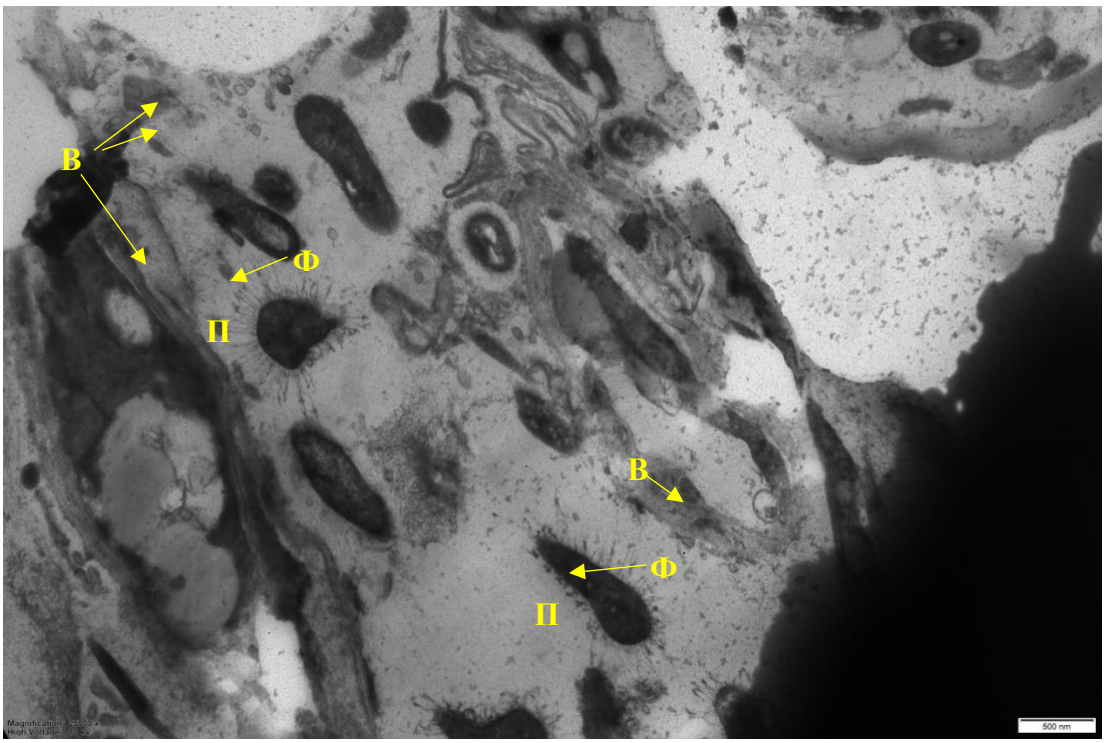


Рисунок 27 - Электронная микрофотография биоплёнки образца 1 (Увеличено). Обозначения: П – персистеры, покрытые фибриллярным слоем; ФС – фибриллярный слой; В – везикула.

Образец 2 также представляет собой поливидовую биопленку. По сравнению с образцом 1 в ней большая часть бактерий консорциума была представлена вегетативными клетками (рис. 28) грамотрицательного типа (Г-), что хорошо видно при большом увеличении (рис. 29). Наряду с вегетативными клетками в БП обнаруживаются покоящиеся формы, имеющие утолщенную клеточную оболочку, электронноплотную цитоплазму и компактизованный нуклеоид, располагающийся в центральной области клетки. Отличительной особенностью биопленок этого образца, а также образцов 4 и 5, являлся хорошо сформированный, но неоднородный по химической природе матрикс. Основной объём БП был представлен полисахаридным матриксом, не однородным по степени окрашивания рутением красным. В окрашенном матриксе просматривалась его неоднородная волокнистая структура (ВС), хорошо различимая при большем увеличении (рис. 28) и обнаруживаемая в образцах других БП (1, 4, 5). Возможно, такая структура способствовала более прочному взаимодействию

клеток. Наряду с плотным матриксом полисахаридной природы в нём присутствовали большие области, очень плохо или не прокрашиваемые рутением красным. Они формировались как капсульный слой (КС) вокруг единичных клеток и групп клеток (рис. 28, 29) и содержали, по-видимому, полимеры неуглеводной природы (белковой, нуклеиновых кислот). Эта гетерогенность матрикса, очевидно, отражает таксономическую гетерогенность биопленок, но при этом не зависит от физиологического возраста клеток, так как в одном локусе выявляются вегетативные клетки (ВК) и ПФ (рис. 28).

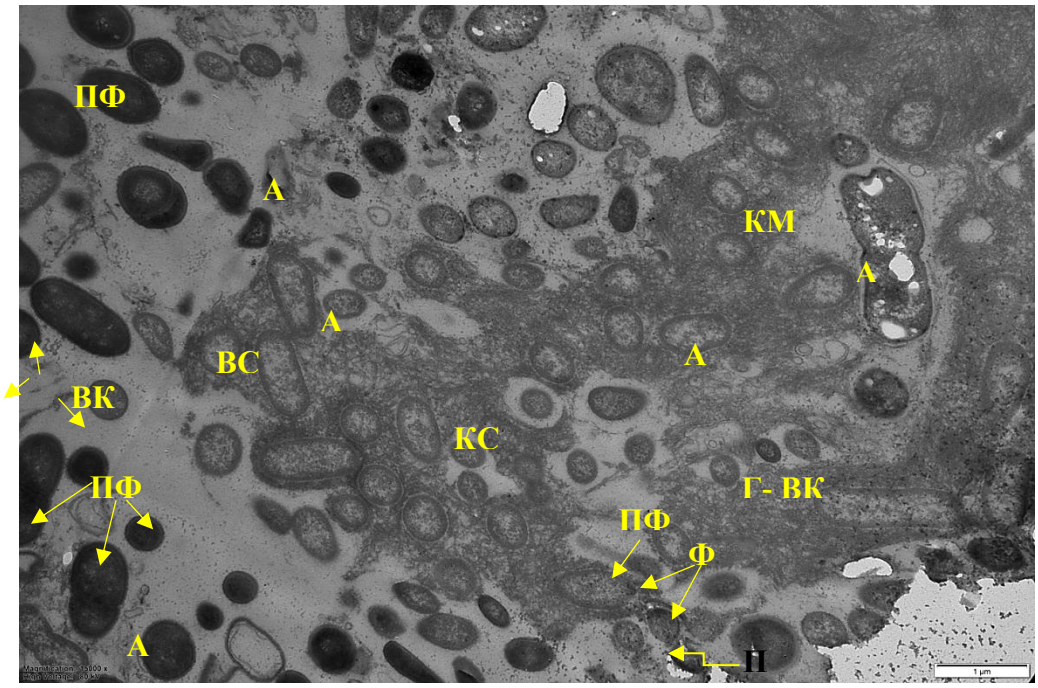


Рисунок 28 - Электронная микрофотография биопленки образца 2. Обозначения: ВК - вегетативные клетки; Г-ВК - вегетативные клетки грамотрицательных бактерий; ПФ – покоящиеся формы; ВС - волокнистые структуры матрикса; КС – капсульный слой; П – персистеры; ФС – фибриллярный слой; А – автолизированная клетка.

Была отмечена также выраженная возрастная гетерогенность клеток биопленочного консорциума, где в микрозоне(ах) одновременно присутствовали: вегетативные клетки; покоящиеся формы, отличавшиеся утолщенной клеточной оболочкой, электронно-плотной цитоплазмой (по

сравнению с вегетативными клетками), компактизованным нуклеоидом (КН); а также автолизированные клетки (А), имевшие только остаточную клеточную оболочку – «чехол».

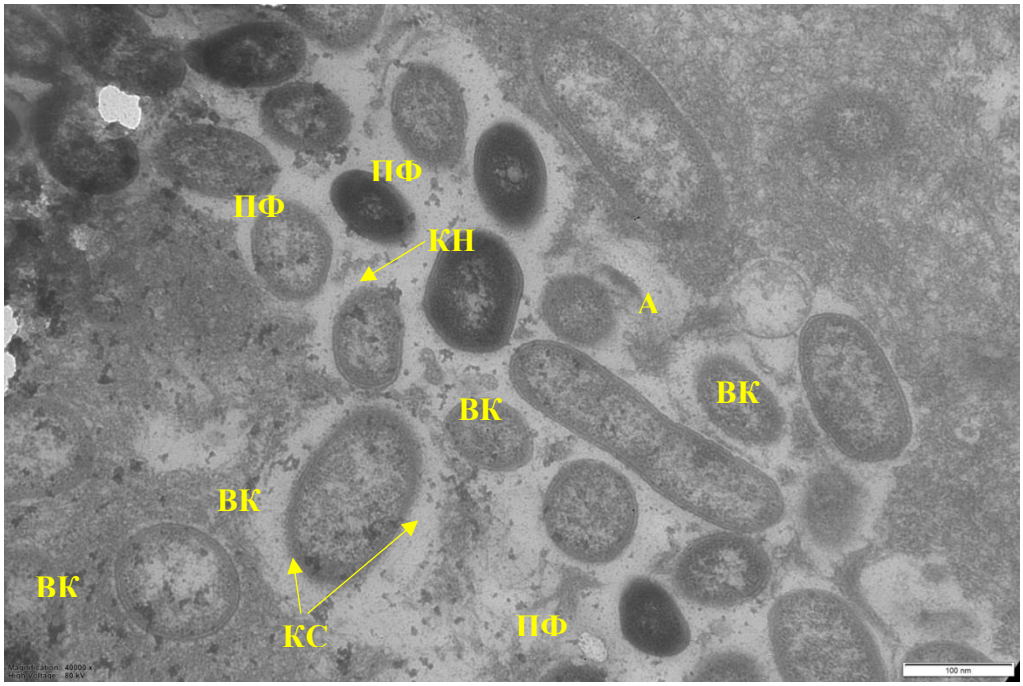
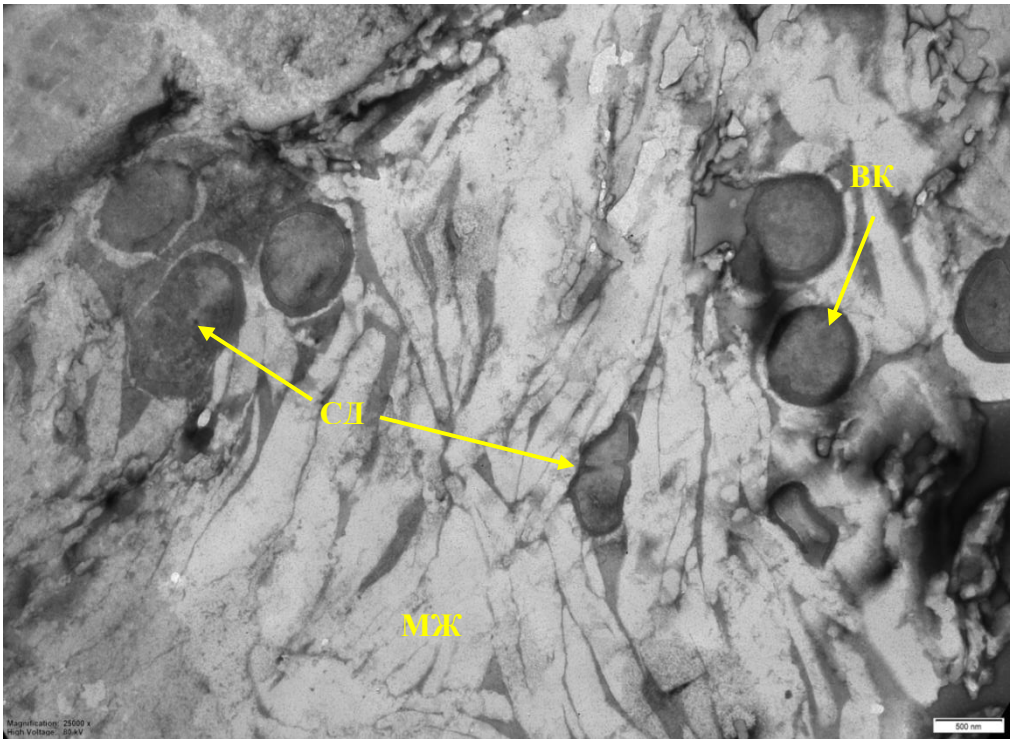


Рисунок 29 - Электронная микрофотография биопленки образца 2 (увеличено). Обозначения: те же, что и на рис. 3, а также: КН – компактизованный нуклеоид.

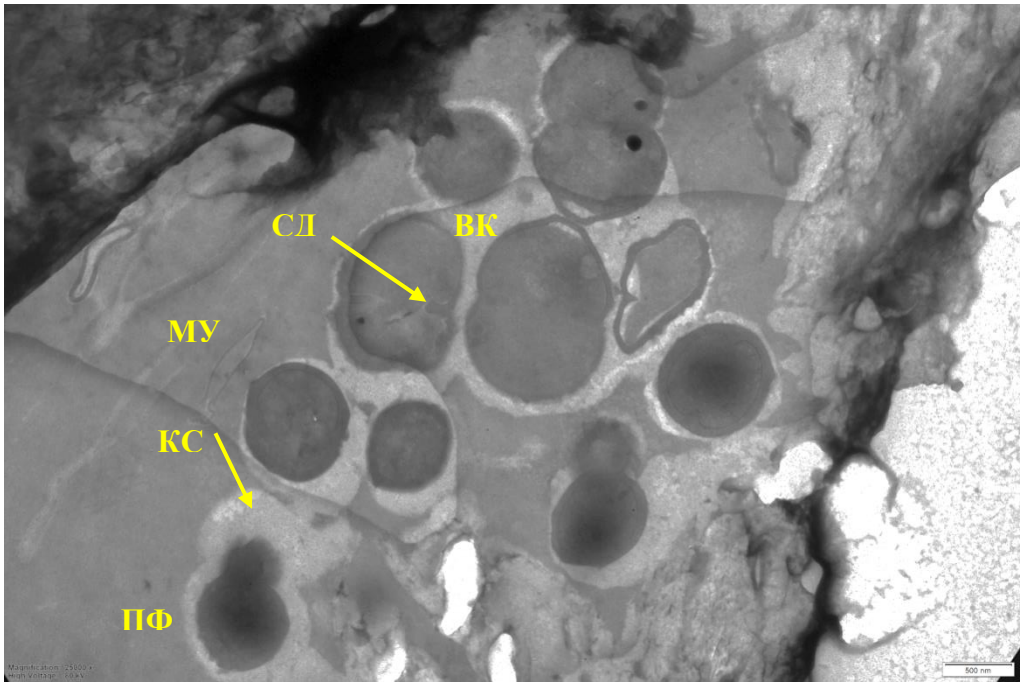
Образец 4 представлял собой поливидовую биопленку, содержавшую 5 типов морфологически различных клеток, многие из которых аналогичны клеткам из образцов 1 и 2 (рис. 30). На срезах хорошо выявлялись вегетативные и покоящиеся клетки; клетки с множественными включениями, по-видимому, полиоксимасляной кислоты (ПОМК), которая накапливается в стационарных и покоящихся клетках. Также отмечено образование вокруг клеток или групп клеток капсульного слоя неполисахаридной природы. На рис. 30 видны различные морфологические типы клеток. Следует отметить их микроколониальный рост, хорошо демонстрируемый на примере клеток II типа – палочковидных, на микрофотографии видимых в виде удлиненных клеток и их компактно упакованных поперечных срезов (ВК II) (рис. 30).

Рисунок 30 - Электронная микрофотография биоплёнки образца 4. Обозначения: ВК – вегетативные клетки; ПФ – покоящиеся формы; КС – капсульный слой; I, II, III, IV,V- микроколонии клеток I-V морфотипов, соответственно; В – везикулы; ПОМК – полиоксимасляная кислота, КМ – клетка мышечной ткани мяса.

Образец 5 был представлен также поливидовой биопленкой, но при просмотре ультратонких срезов было обращено внимание на следующие особенности строения этой БП. Во-первых, в полимерном матриксе обнаруживались зоны двух типов. В одной зоне матрикс был организован в виде плотных жильных структур (рис. 31 А), которые неравномерно прокрашивались рутением красным. В матриксе располагались клетки грамположительной бактерии (судя по строению клеточной оболочки), растущей микроколониально (рис. 31 А, Б). В пределах одной микроколонии выявлялись клетки разного физиологического возраста, вегетативные клетки (ВК), делящиеся септацией (имеющие выраженные септы деления, СД), и толстостенные покоящиеся формы (ПФ) (рис. 31 Б). Вокруг клеток располагался капсульный слой, непрокрашиваемый рутением красным. При этом отметим, что если в образце 2 (рис. 29) капсульный слой образовывался грамотрицательными бактериями, то в образце 5 – грамположительной бактерией.



А



Б

Рисунок 31 - Электронные микрофотографии образца 5. Обозначения: М – матрикс (жилистые структуры МЖ или углеводной природы МУ); ВК – вегетативные клетки и ПФ – покоящиеся формы одной микроколонии; СД – септа деления; КС – капсульный слой.

5.1.2 Результаты таксономического анализа нативных биопленок

Таксономический состав биопленок пяти образцов был определен на основании анализа вариабельного V3-V4 региона гена 16SpРНК[9]. После обработки данных для всех образцов получили 86 017 последовательностей, которые были объединены в кластер 470 операционных таксономических единиц с минимальной идентичностью 0,97. Это позволило описать полностью биоразнообразие исследуемых сообществ, что подтверждалось рассчитанным индексами видового разнообразия. При анализе бактериального метагенома часто используют различные оценки реального количества таксонов. Для оценки разнообразия биологических сообществ применяют различные индексы – численные показатели, рассчитывающиеся на основе числа таксонов в сообществе и числа особей (в метагеномике – число сиквенсов) в разных таксонах. Микробное разнообразие в основном связано с двумя факторами: один — это количество видов, то есть богатство, другой - разнообразие, однородность распределения особей в сообществе. Обычно существует три типа связанных индексов: индекс глубины секвенирования (наблюдаемые виды и покрытие Гуда), индекс обилия флоры (Chao1 и ACE) и индекс разнообразия флоры (Шеннон и Симпсон) **[**Tom, C.J., 2003**].**

Наиболее часто для оценки количества OTU (OTE) (Операционная таксономическая единица — это оперативное определение, используемое для классификации групп близкородственных особей) в сообществе используется Индекс Chao. Чем больше Chao, тем больше число OTU. Значения OTU выражается в процентах. В частности, самое большое значение Chao1, полученное для *Образца 1*, составляло 325,5 в других образцах - ниже (табл. 35).

[9] Работы выполнялись при участии Марданова А. В.

Николаев Юрий Александрович Заведующий Лабораторией выживаемости микроорганизмов Института микробиологии им. С.Н. Виноградского (ФГУ ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии»

Таблица 35- Индексы видового разнообразия биопленок №№ 1-5.

Образец	chao1	richness	richness2	shannon_e
1	324,5	231	164	3,99
2	169,2	140	101	3,43
3	219,3	197	161	3,13
4	123,4	93	66	2,92
5	192,3	152	115	2,98

Другой индекс, индекс Шеннона, используется для оценки разнообразия микроорганизмов в образце и чем он выше, тем выше разнообразие сообщества. В *Образце 1* он также имел наибольшее значение. Таким образом, полученных данных было достаточно для полного описания биоразнообразия исследуемых образцов.

Таксономический анализ показал, что все OTU принадлежали бактериям. Представителей архей в исследуемых сообществах не обнаружено. Все найденные OTU принадлежали к 11 филумам (табл 36). Во всех образцах доминировали, в основном, представители филумов: *Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria*. В трех образцах 2, 3, 5 доминировали представители филума *Bacteroidetes*, на долю которых приходится более половины полученных данных, в *Образце 1 Bacteroidetes* (38,28%) уступали *Proteobacteria* (42,83%). Наиболее равномерное распределение долей между филумами наблюдалось в образце 4: *Actinobacteria* – 36,29%, *Firmicutes* – 32,83%; *Bacteroidetes* - 22,27% (рис. 32). Среди минорных групп встречались представители *Acidobacteria, Chloroflexi, Cyanobacteria, Epsilonbacteraeota, Fusobacteria, Patescibacteria, Planctomycetes, Verrucomicrobia* и др.

Таблица 36 - Таксономический анализ биопленок №№ 1-5.

OTU	№1	№2	№3	№4	№5
Actinobacteria	4,40	1,79	3,18	36,29	3,62
Bacteroidetes	38,28	67,68	61,40	22,27	50,89
Chloroflexi	0,02	0,04	0,95	0,01	0,00
Cyanobacteria	0,41	0,00	0,00	0,03	0,00
Firmicutes	0,60	14,50	4,36	32,83	17,23
Fusobacteria	0,01	0,48	0,05	0,00	0,03
Patescibacteria	7,35	0,14	2,11	0,04	2,84
Planctomycetes	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00
RsaHF	0,02	1,09	0,02	0,00	0,08
Proteobacteria	42,83	14,28	27,90	8,52	25,08
Verrucomicrobia	6,08	0,00	0,00	0,00	0,01

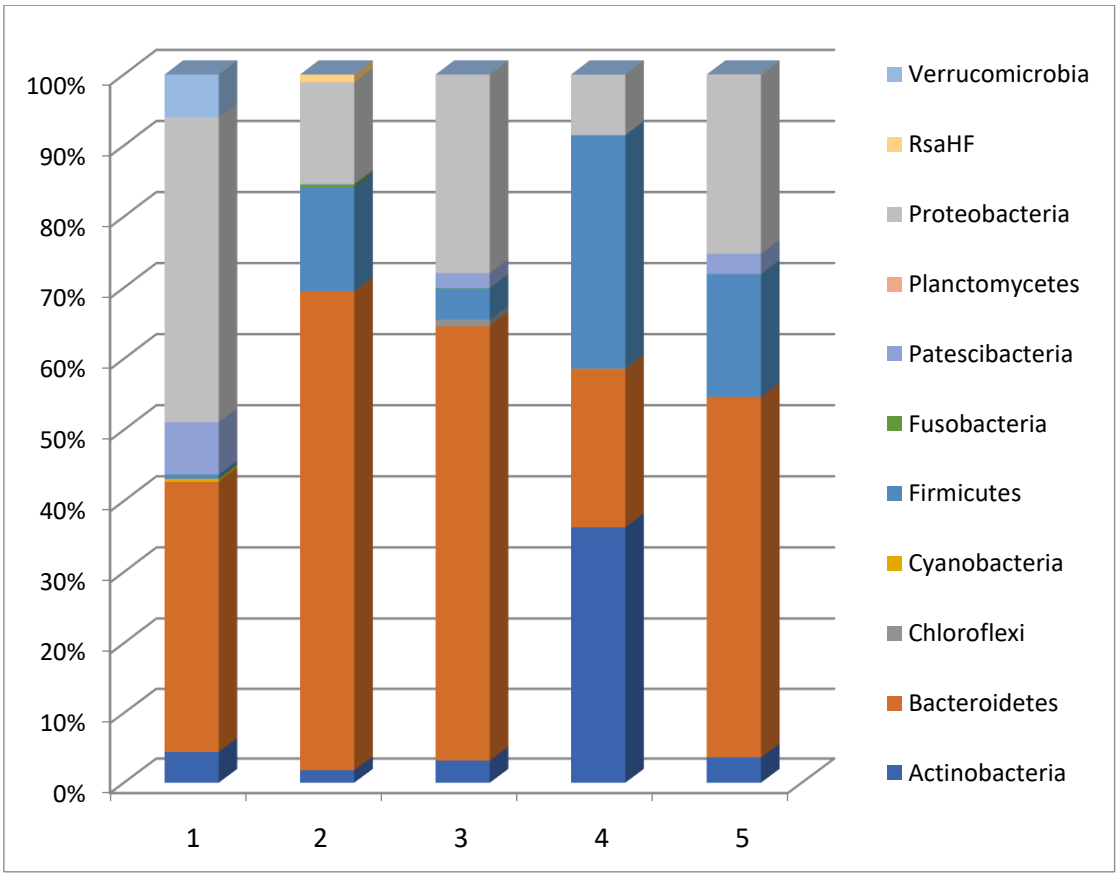


Рисунок 32 - Таксономический состав биопленок

Образец 1 отличался наибольшим разнообразием микробного сообщества. В этом образце основным представителем филума были

Proteobacteria Otu 6, доля которых составляла 18,16%. Эта группа относится роду Pseudomonas, принадлежащего классу Gammaproteobacteria. Представители Pseudomonas являются аэробными психрофильными эврибионтами. Некоторые представители этого рода вызывают порчу пищевой продукции, в том числе и мясной продукции [Ercolini, D., 2010]. Proteobacteria активно развиваются в холодных условиях и способны образовывать биопленки на поверхностях, непосредственно контактирующих с пищевой продукцией [Coughlan, L., 2016].

Второе место по представленности OTU в образце 1 – Otu 8 (7.79 %) принадлежало *Flavobacterium sp*. (филум *Bacteroidetes*). Представители этого рода широко распространены в воде. Известно, что некоторые штаммы *Flavobacterium* способны образовывать биопленки [Basson, A., 2008].

На долю каждой из оставшихся OTU приходилось менее 5% чтений от общего числа, таким образом, остальные представители биопленочного сообщества в *Образце 1* были минорными.

Образец 2. Сообщество образца 2 отличалось меньшим разнообразием, при этом на долю OTU доминантных видов приходилось 43,56% чтений, в то время как в № 1 – 25,95%. Доминировавшие таксономические группы otu1 (16,27%), ot10 (7,88%) и otu20 (7,38%) и otu153 (12,04%) относились к филуму *Flavobacterium*. Морфологически *Fluviicola* схожи с *Flavobacterium* [Woyke, T., 2011]. Следует отметить, что представители этого рода были обнаружены в биопленках сточных вод, однако их роль в формировании самих биопленок не ясна [Turki, Y., 2017]. Это соответствовало месту отбора образца 2 (отобран из сливного трапа сырьевого цеха).

Образцы 2, 3 и 5 были представлены биопленками, достаточно схожими по таксономическому составу: в них доминантные OTU принадлежат *Flavobacterium*. Ещё одна доминантная OTU в образце 3 принадлежала роду *Simplicispira* класса *Betaproteobacteria*, представители которого также способны образовывать биопленки в условиях канализационных коллекторов [Auguet, O., 2015].

В Образце 5, помимо *Flavobacterium,* доминантными компонентами сообщества были представители родов *Vagococcus* (7,01%) и *Arcobacter* (5,53%). Бактерии рода Vagococcus были обнаружены в образцах микробиоты тушек бройлеров [Lauritsen, C.V., 2019]. Бактерии *Arcobacter* являются патогенами человека и животных. Из 15 известных штаммов *Arcobacter* 3 штамма (*A. butzleri, A. cryaerophilus* и *A. skirrowii*) являются причиной серьёзных инфекционных заболеваний, попадая в организм человека вместе с животной пищей [Ahmed, R., 2013].

Образец 4 был представлен наиболее отличавшимся микробным сообществом. Во-первых, в данном сообществе было наименьшее видовое разнообразие, представленное всего 125 OTU. Во-вторых, в них доминировали представители филумов:

- *Actinobacteria*: *Corynebacterium* (16,02%), *Kocuria* (13,52%);
- *Bacteroidetes*: *Sphingobacterium* (11,1%), *Chryseobacterium* (9,5%);
- *Firmicutes*: Carnobacterium (8,85%) и Tetragenococcu (6,59%).

Вторыми по представленности в этом сообществе были бактерии рода *Kocuria*, которые являются эврибионтами, а также встречаются на коже человека и других млекопитающих.

Ещё один эврибионт, доминирующий в сообществе 4 - бактерии рода *Sphingobacterium*, ранее обнаруженные в различных объектах, в том числе в почве [Mallick, S., 2019]

Показано, что жизнедеятельность *Chryseobacterium joostei* подобно *Pseudomonas fluorescens* обусловливает порчу молока [Bekker, A., 2016], а также загрязнение продуктов из мяса животных и птицы, попадая на продукты из окружающей среды.

Ещё одна доминантная таксономическая группа – представители рода *Tetragenococcus* - относится к молочнокислым бактериям, встречающимся в ферментированных пищевых продуктах [Roling, W., 1996].

Таким образом, микробные сообщества *Образцов* 1-5 содержали характерные для пищевых биопленок микроорганизмы, в том числе

участвующие в порче пищевых продуктов. Микробные сообщества исследованных образцов отличались таксономическим составом и высоким разнообразием – включали представителей 11 филумов, среди которых были выделены представители нескольких доминирующих родов. Характерным признаком микробных сообществ в образцах 1, 2, 3, 5 являлось наличие среди ключевых доминант представителей рода *Flavobacterium*, участвующих в формировании биопленок и порче пищевой продукции. Вероятно, высокое разнообразие сообщества обусловливало формирование биопленки, имевшей неоднородный по химической природе матрикс, защищавший биопленочных бактерий от внешних факторов среды, но не позволявший активно развиваться минорным представителям. В отношении минорных компонент изученных сообществ было отмечено, что некоторые из них также являлись характерными для пищевых биопленок бактериями, например, *Brochothrix thermosphacta* (Otu383).

5.1.3 Закономерности сезонных изменений микробных БП

Необходимо отметить, что в настоящее время в международных базах научного цитирования отсутствуют работы, посвященные непосредственно сезонным изменениям в БП на пищевых производствах[10].

Основное микробное загрязнение на предприятия по убою и переработке скота поступает из ЖКТ и со шкур животных, чьё микробное население, безусловно, связано с сезонностью. По причине связанности в единую технологическую цепь процессов от убоя и разделки туш до продукции, логично ожидать, что сезонные изменения должны иметь место. Отчасти, описана сезонная ситуация с биопленками при изучении листерий на скотобойнях Квебека. Показано, что были установлены различия листерий по способности образовывать БП в зависимости от сезона, при этом

[10] Работы выполнялись при участии Николаева Ю.А.

максимальную способность к образованию БП эти микроорганизмы проявляли в феврале-мае [Tamazight, C., 2015].

Эти данные подтверждают правильность ожидания сезонных различий в БП, а также отсутствие систематических исследований по влиянию сезонности на состав и свойства БП. Таким образом, результаты, описанные в этом разделе, имеют важное фундаментальное и прикладное значение.

На данном этапе исследований были изучены закономерности сезонных изменений нативных БП объектов производственной среды на том же предприятии по убою и переработке птицы. С использованием электронной микроскопии оценивали соответствие отобранных образцов морфологии биопленок, а также изучали структурный состав нативных БП в зависимости от сезона.

Результаты исследования БП в межсезонье.

Образец А47 Трап/потрошение не являлся БП, был представлен органическим материалом, гетерогенным по структуре, микробных клеток не выявлено (рис. 33).

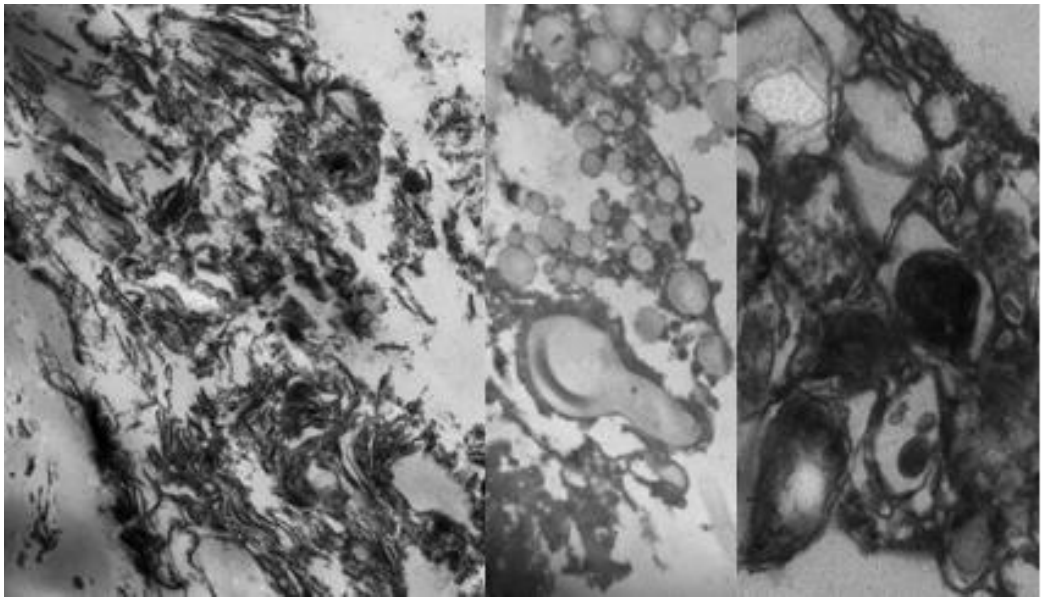


Рисунок 33 -Микрофотографии материала. Образец А47, Трап/потрошение. Масштабная линейка – 1 мкм.

Образец А 50 Потолок/потрошение (рис. 34) был представлен классической зрелой поливидовой БП, условиями образования которой

являлись, по-видимому, обилие конденсата и редкая санитарная обработка. Визуализировались органические частицы, достаточно плотные, большое количество мембранных везикул (рис. 34 А) и ПФ Г+ бактерий (электронноплотные толстостенные) (рис. 34 А), автолизированные клетки, а также прорастающая ПФ с частично разрушенной оболочкой (рис. 34Б).

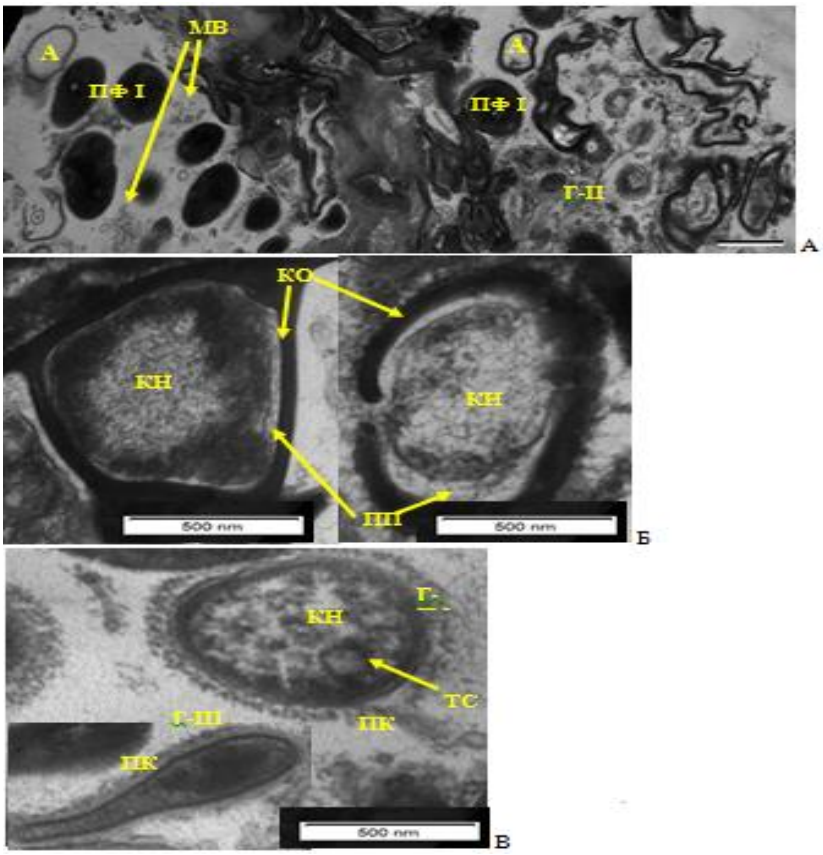


Рисунок 34 - Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образцаА50 (Потолок/потрошение): А – старая БП, микроколонии клеток I и II морфотипов, представленные покоящимися формами (ПФ); Б – покоящиеся формы с кристаллизованным нуклеоидом (КН), слева – интактная, справа – прорастающая ПФ, хорошо видна периплазма (ПП); В – ПФ клеток грамотрицательного типа (Г- ПФ) с биокристаллизованным нуклеоидом (БН) с тороидальными структурами (ТС), окруженные структурированной полисахаридной капсулой (ПК). Масштабная линейка – 1 мкм (А) или 500 нм (Б и В).

Другой морфотип (Г-II) был представлен очень мелкими Г- бактериями, растущими микроколониально (рис. 34 А, справа). Также были обнаружены необычные Г-мелкие клетки (0.1–0.5 μм, III морфотип), окруженные сформированной полисахаридной капсулой (рис. 34 В), растущие

микроколониально, где наряду с вегетирующими клетками присутствовали ПФ с утолщенной клеточной оболочкой и тороидальными структурами биокристаллического нуклеоида (рис. 34 В).

Образец А42 Трап/охлаждение (рис. 35). БП не развита, визуализировались органические остатки, капли жира, редко встречались старые бактериальные клетки нескольких морфотипов, по-видимому, занесенные (рис. 35 А, В). Обнаружены L-формы, окруженные только цитоплазматической мембраной (рис. 35 В).

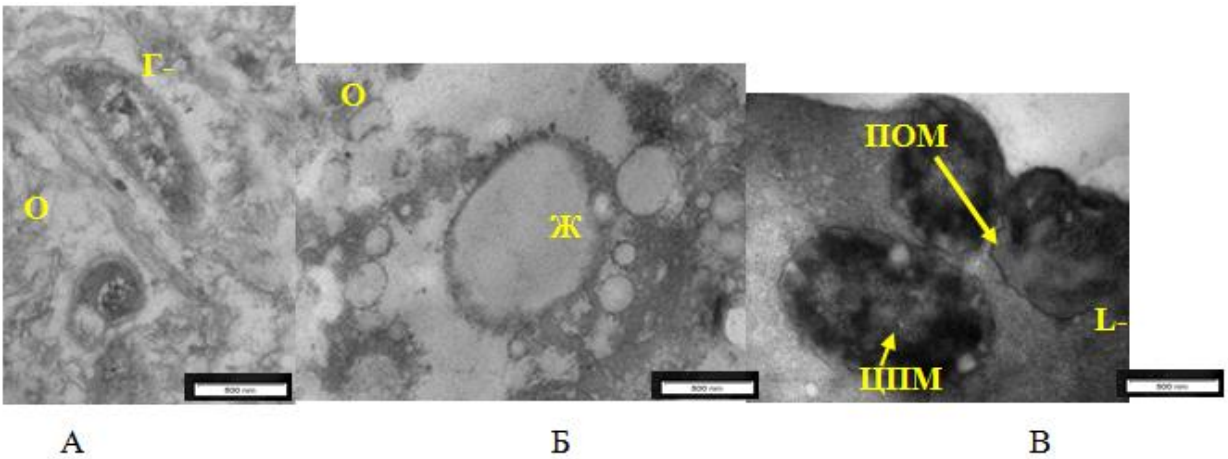


Рисунок 35 - Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образцаА42 (Трап/охлаждение): А – единичная клетка грамотрицательного типа (Г-) в остатках органического материала (ОМ); Б - капли жира (Ж); В – старые L-формы (L-ф) с включениями ПОМК и компактизованным нуклеоидом, окруженные цитоплазматической мембраной (ЦПМ). Масштабная линейка – 500 нм.

Образец А43 Ступень/охлаждение был представлен старой БП, содержащей старые вегетативные клетки с включениями ПОМК (рис. 36 А, Б) нескольких морфотипов: овоидные крупные клетки Г+ типа (рис. 36 А), растущие часто в общих капсулах (рис. 36 В) и длинные палочки (рис. 36А). Присутствовало много автолизированных клеток и ПФ нескольких морфотипов, различающихся структурной организацией оболочек (рис. 36 Б).

Образец А48 Потолок/охлаждение (рис. 37) содержал старую, вероятно, функционально неактивная БП. Образец включал области с гетерогенным по окрашиванию рутением красным матриксом, редкими клетками (рис. 37, А), и участки с кальцинированной структурой (рис. 37, Б),

без признаков БП. Обнаружены ПФ толстостенные, с компактизованным нуклеоидом, сгруппированные в цепочку в едином чехле (рис. 37, В).

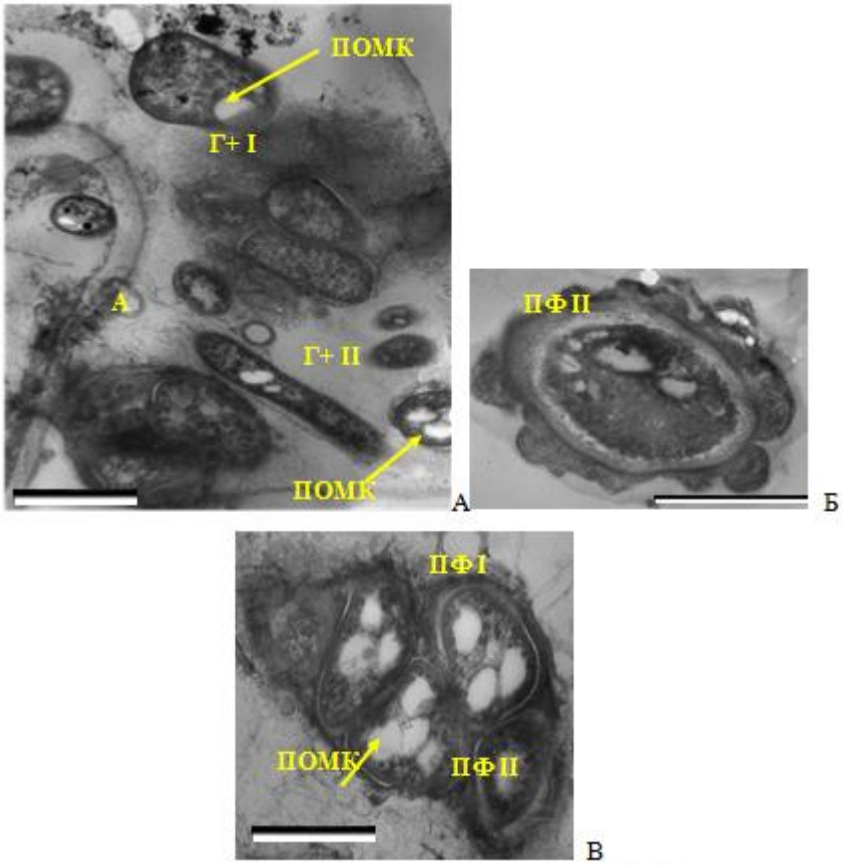


Рисунок 36 - Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца А43 (Ступень/охлаждение): А – старые клетки грамположительного типа двух морфотипов (Г+ I и II); Б - ПФ разных типов, различающиеся структурой клеточных оболочек; В – старые клетки с ПОМК в общей полисахаридной капсуле и покоящаяся клетка 2го типа.
А(желтый шрифт) – автолизированные клетки. Масштабная линейка – 1 мкм.

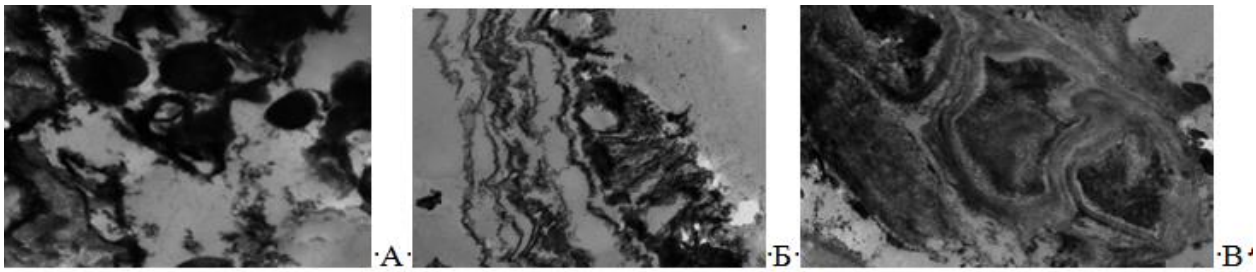


Рисунок 37- Тонкий срез образцаА48 (Потолок/охлаждение): А – клетки в окружении органического материала; Б – многослойное чередование органического и, вероятно, минерального материала; В - покоящиеся формы в общем матриксе-капсуле.

Образец А 45 Стена/охлаждение (рис. 38) был отобран в помещении с температурой 0 ºС – минус 2 ºС. Образец представлял замороженную массу. В нём обнаружена зрелая БП, слоистая, включающая: области типичной БП с матриксом, характеризующиеся обилием Г- клеток одного морфотипа, очень старых с биокристаллизованным нуклеоидом, комковатой текстурой цитоплазмы (рис. 38 А, Б), и области из рыхлого органического материала, неравномерно окрашиваемого рутением. Очевидно, что БП была сформирована психрофильным микроорганизмом.

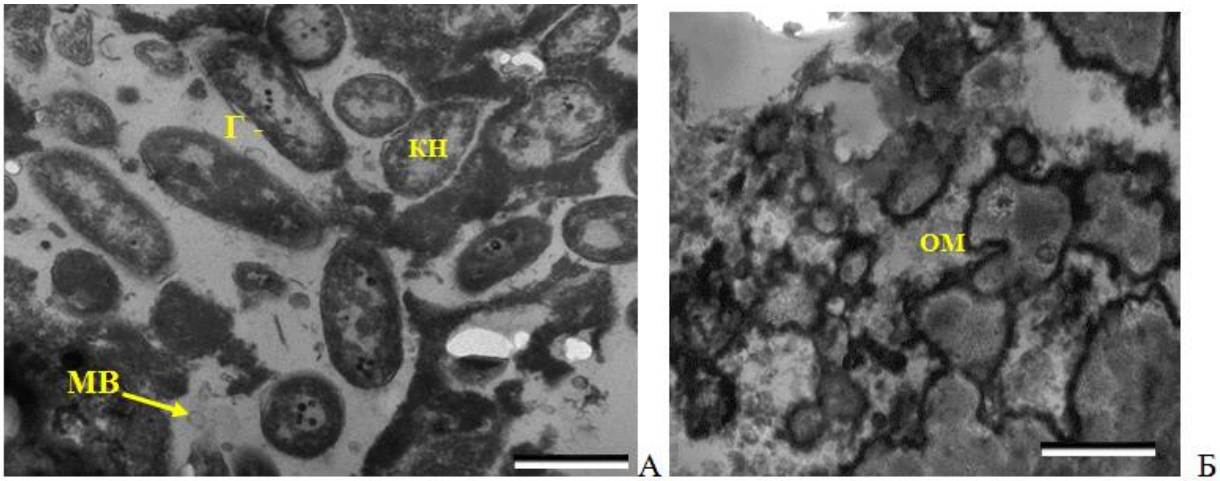
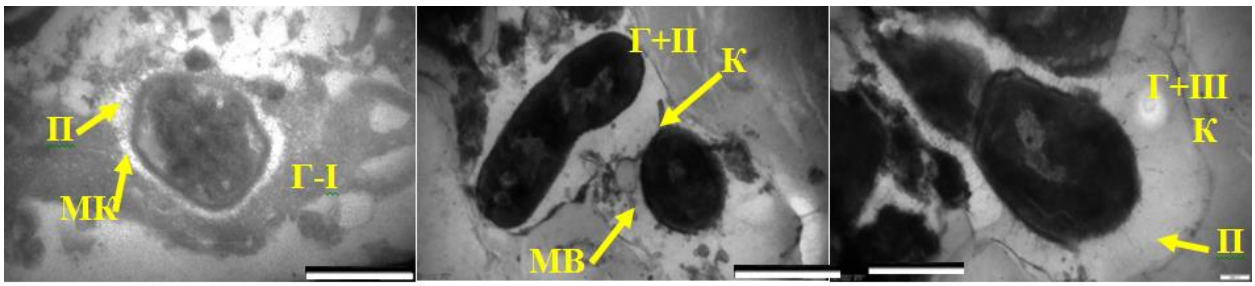


Рисунок 38 - Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образцаА45 (Стена/охлаждение): А – моновидовая плёнка Г+ бактерий, старых с компактизованным нуклеоидом (КН) и мембранными везикулами (МВ); Б – зона рыхлого органического материал (ОМ). Масштабная линейка – 1 мкм.

Образец А49 Ролик/охлаждение не содержал БП. Рисунок не приводится.

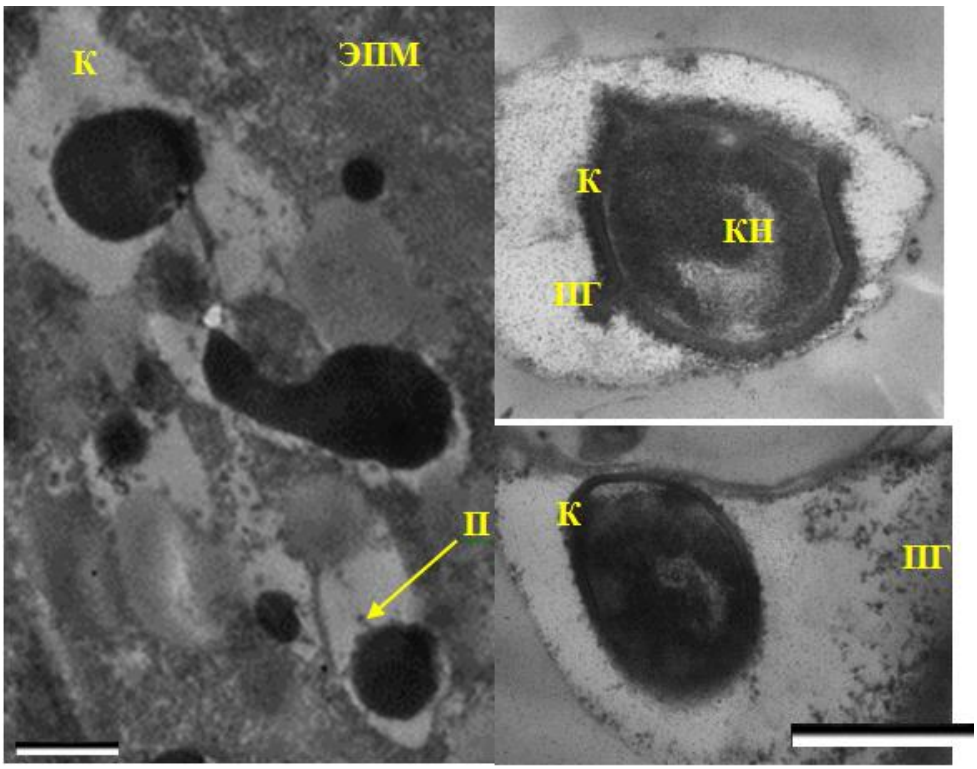
Образец А44 Колесо 1/упаковка (рис. 39) был представлен БП с развитым, неоднородно окрашиваемым рутением матриксом рыхлым органическим материалом. Бактериальная компонента была представлена клетками различных морфотипов по строению клеточной стенки и с пилями. Клетки, как правило, были окружены капсульным материалом неполисахаридной природы.



А Б В

Рисунок 39 - Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образцаА44 (Колесо 1/упаковка): А – В – отдельные клетки трёх морфотипов (Г-I, Г+II, Г-III): А – клетки Г-I с короткими пилями (П) в неполисахаридной микрокапсуле (МК); Б – клетки Г+II в неполисахаридной капсуле (К) с мембранными везикулами; В - клетки Г+III с длинными пилями. Масштабная линейка – 1 мкм.

Образец А46 Колесо 2/упаковка был представлен зрелой БП, с хорошо развитым гранулярным матриксом (рис. 40 А), включающим клетки с короткими пилями. ПФ разной степени созревания с утолщенной клеточной оболочкой и биокристаллизованным нуклеоидом (рис. 40 Б) окружены капсулой неполисахаридной природы, ограниченной ВПМ слоем, образованным гранулярными полисахаридными частицами. БП, по-видимому, старая.

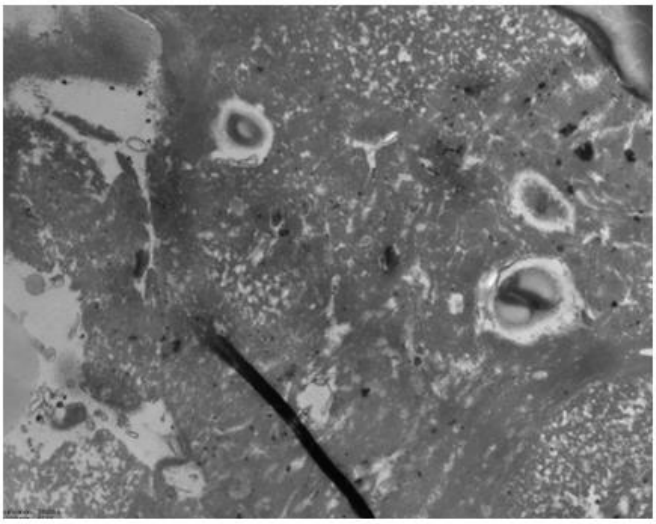


А Б

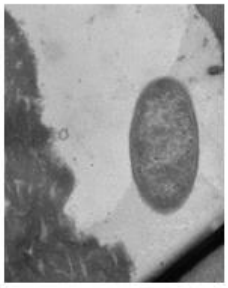
Рисунок 40 - Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца А46 (Колесо 2/упаковка): А – старая БП, с плотным матриксом (ЭПМ) полисахаридной природы, Г+ клетки с короткими пилями (П), некоторые окружены капсулой неполисахаридной природы (К); Б – ПФ разных морфотипов, различающихся толщиной клеточной оболочки, с компактизованным нуклеоидом (КН), окруженные двухкомпонентной капсулой из неполисахаридного материала (К) и полисахаридных гранул (ПГ). Масштабная линейка – 1 мкм.

Результаты исследования БП в зимний период.

Образец А118 Трап/потрошение не являлся БП и был представлен плотным органическим материалом, гетерогенным по структуре (рис. 41), содержал немного жира и немного клеток (старые нативные или старые мертвые), как правило, в окружении неполисахаридного матрикса.



Общий вид



Отдельная клетка

Рисунок 41 - Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образцаА118(Трап/потрошение).

Образец А112 Шнек/охлаждение (рис. 42) был представлен органическим материалом, жировыми каплями, бактериальных клеток мало, БП не было.

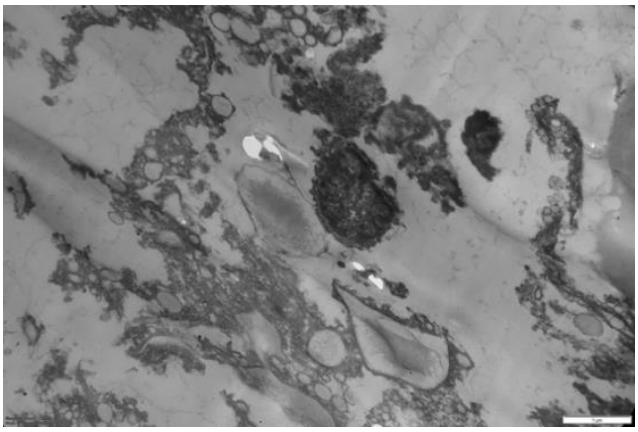


Рисунок 42 Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образцаА112 (Шнек/охлаждение).

Образец А113 Трап/охлаждение (рис. 43) был представлен гетероморфным органическим материалом, внутри которого находились Г-клетки, в капсулах, старые. Микроколонии клеток одного вида/типа. Начало формирования БП.

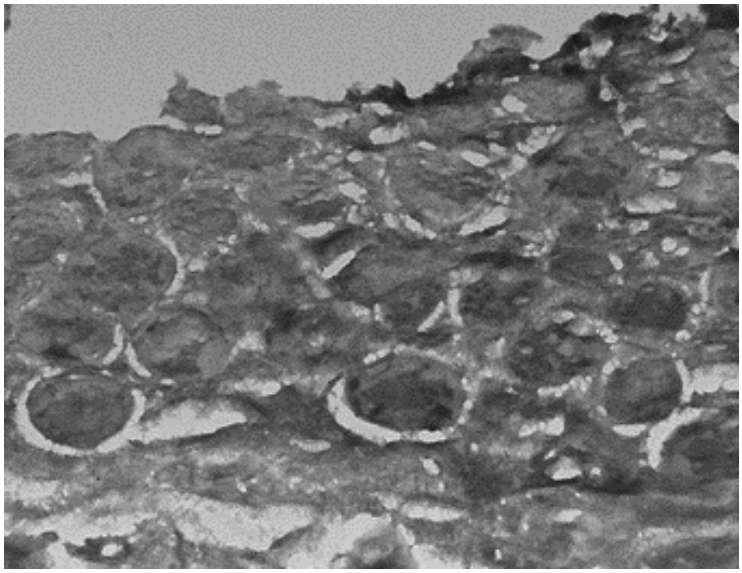


Рисунок 43 - Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образцаА113(Трап/охлаждение).

Образец А114 Ступень/охлаждение (рис. 44) представлял собой фрагментированную старую БП. Матрикс гомогенной, слабо связывающей РКр. (Волнообразные структуры на фото – артефакты от приготовления срезов.) Клетки очень крупные, активные (много везикул, чаще внутри клетки), Г+ типа, с запасными веществами типа жира, иногда ветвились. Часто клетки были покрыты рыхлой объемной капсулой и клеточной стенкой.

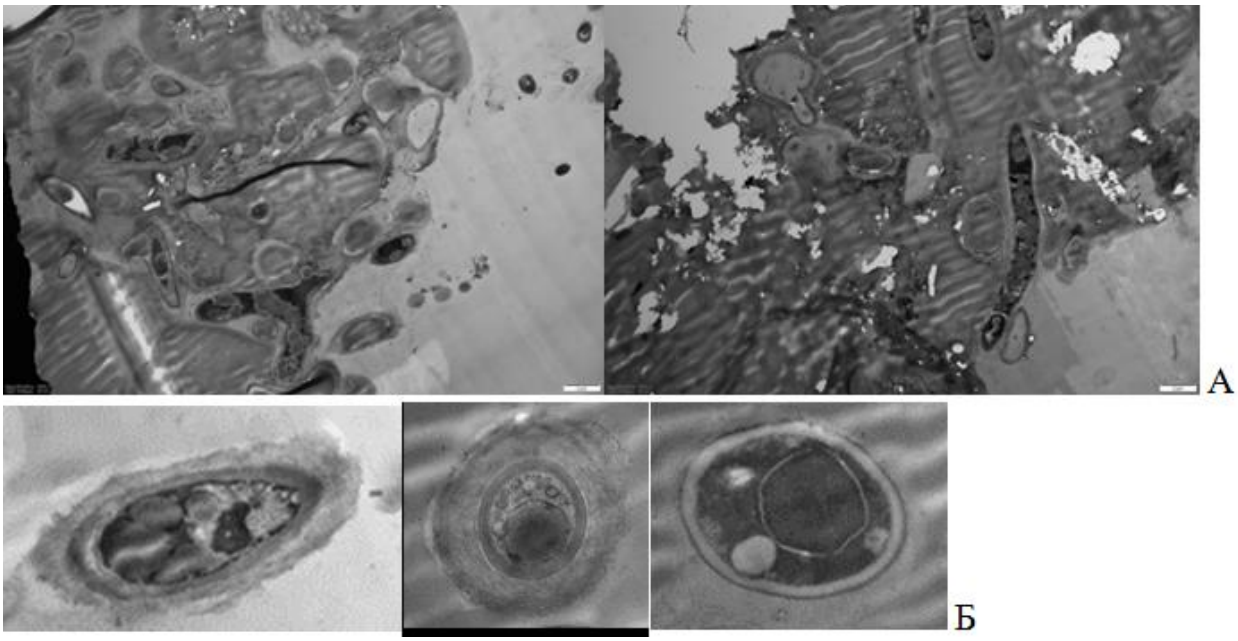


Рисунок 44 - Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образца А114 (Ступень/охлаждение): общий вид (А) и разные типы форм покоя (Б).

Образец А116 Стена/охлаждение представлял собой смесь кусочков ржавчины и биоматериала, крошился при резке, не было возможности подготовить препарат.

Образец А115 Колесо 1/упаковка (рис. 45) представлял собой классическую зрелую БП, содержащую много органических частиц разной морфологии. Клеток много, разнообразие велико – Г+ и Г-, с преобладанием Г+, крупные и мелкие, есть растущие и автолизированные, разный матрикс, много везикул (вне клеток). Капсулы клеток очень рыхлые. Местами была видна многослойность БП. Много четких микроколоний, велико разнообразие ПФ.

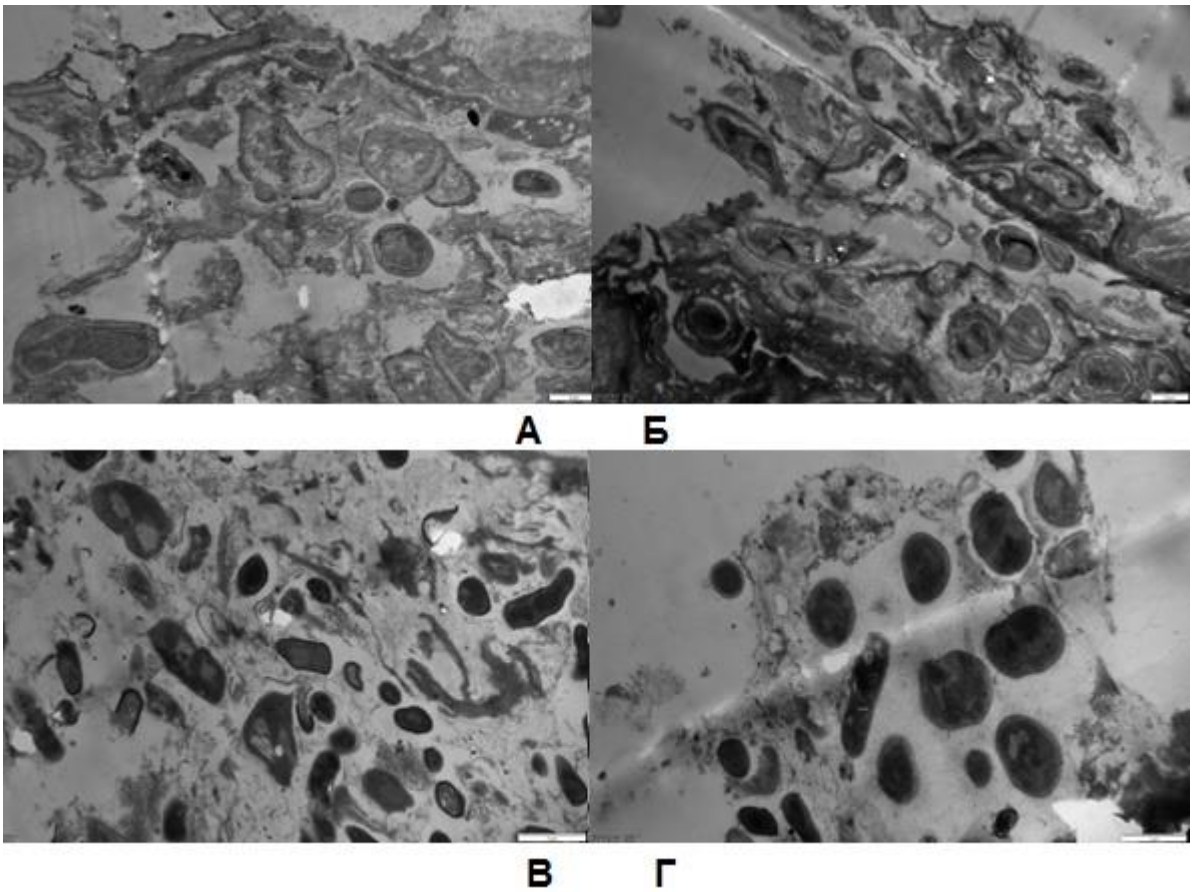


Рисунок 45 - Электронно-микроскопический снимок тонких срезов образцаА115(Колесо 1/упаковка): А - Г+ клетки растущие и ПФ; Б -ПФ Г+ клеток; В, Г - микроколонии Г+ и Г- клеток

Результаты исследования БП в летний период.

Образец А151 Трап/потрошение, взятый с металлической части конструкции (рис. 46), не являлся БП и был представлен органическим материалом, гетерогенным по структуре, содержал немного жира, наблюдались мышечные волокна. Клеток много, живые, главным образом, Г+, все отдельно лежащие, как активные, так и покоящиеся. На пластиковой крышке трапа картина была аналогичная (рис. 47). Материал был представлен массой органического материала, БП не было. Клеток очень много, преобладали Г+, активные, делящиеся. ВПМ не было. Клетки заносные. Везикул и пилей мало, но много полисахаридов. Это первая стадия формирования – занос клеток на органический материал, начало размножения. Материал трапа (металл или пластик) принципиально не сказались на наличии и обилии адгезированного материала.

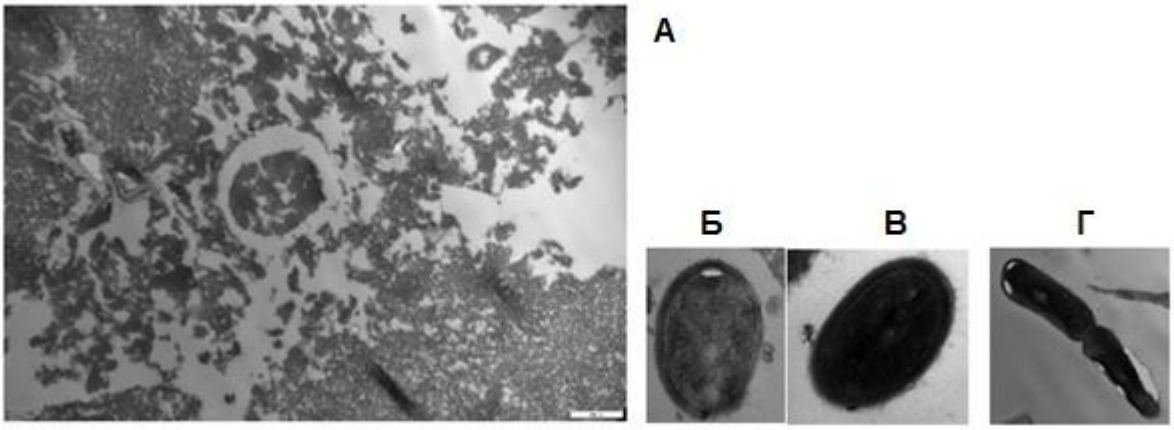


Рисунок 46 - Микрофотография материала образца А151 (Трап/потрошение), взятого с металлической поверхности: А – общий вид; Б – активная клетка; В – покоящаяся клетка; Г - делящиеся клетки.

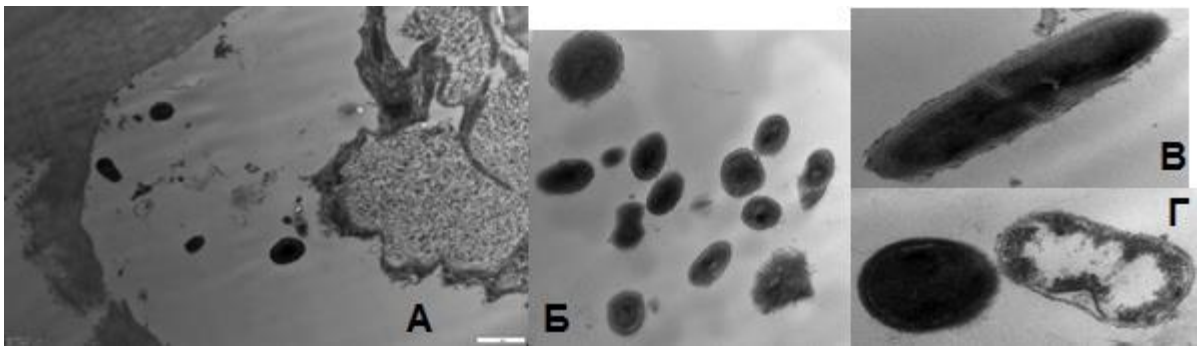


Рисунок 47- Микрофотография материала образца А151 (Трап/потрошение), взятого с пластиковой крышки: А – общий вид, органический материал и Г+клетки; Б – микроколонии Г+ клеток и одна Г- клетка (треугольной формы); В – делящиеся Г+ клетки; Г – Г+ и Г- клетки.

Образец А153 Потолок/потрошение (рис. 48) был представлен плотными частицами, похожими на неорганические. Клеток не обнаружено. БП не было.

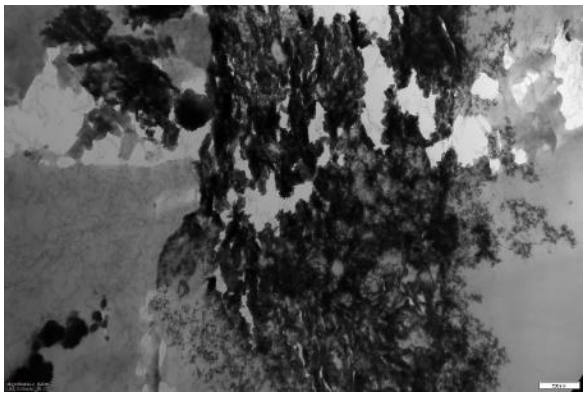


Рисунок 48 - Микрофотография материала образца А153(Потолок/потрошение).

Образец А145 Шнек/охлаждение (рис. 49) был представлен остатками органического материала, жировыми каплями, бактериальных клеток нет, БП нет.

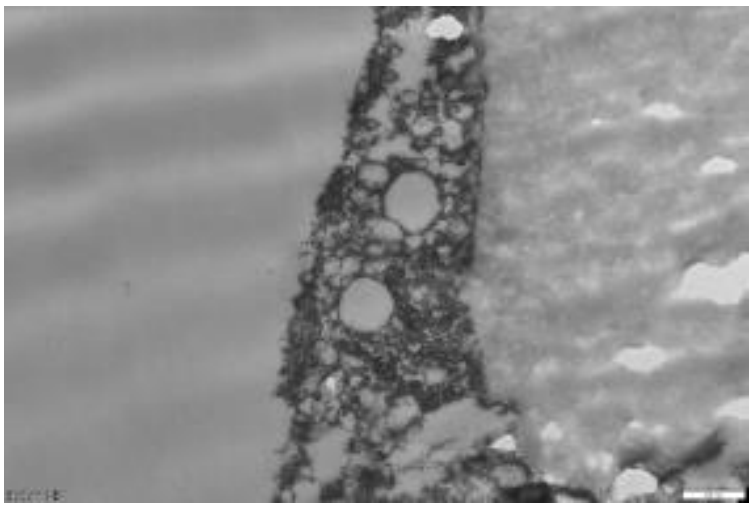


Рисунок 49 - Микрофотография материалаА145 (Шнек/охлаждение).

Образец А146 Трап/охлаждение(рис.50) был представлен органическим материалом разной морфологии и плотности (темные и светлые участки, гомогенные и с гранулярными частицами), много жировых капель, много плотных нитей полисахаридов. Клеток мало, разного физиологического состояния. Полноценной БП нет. Видимо, наблюдалось начало формирования БП – формирование слоя органического материала и занос в него посторонней микрофлоры, в том числе – из других БП (образец содержал фрагменты матрикса – полисахаридные волокна).

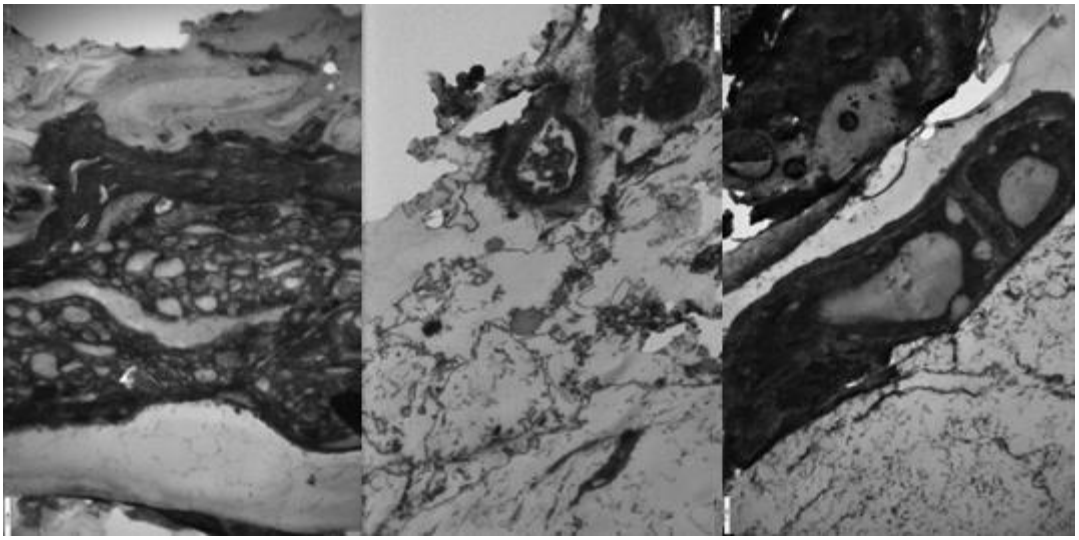


Рисунок 50 - Микрофотографии материала образца А146 (Трап/охлаждение).

Образец А152 Потолок/охлаждение (рис. 51) был представлен многослойной массой разнородных частиц органики. Клеток немного, старые, Г+ и Г-. Обнаружены уникальные Г- волосатые (с огромными пилями) клетки, старые, в том числе лизированные. Видимо, старая биопленка, неактивная.

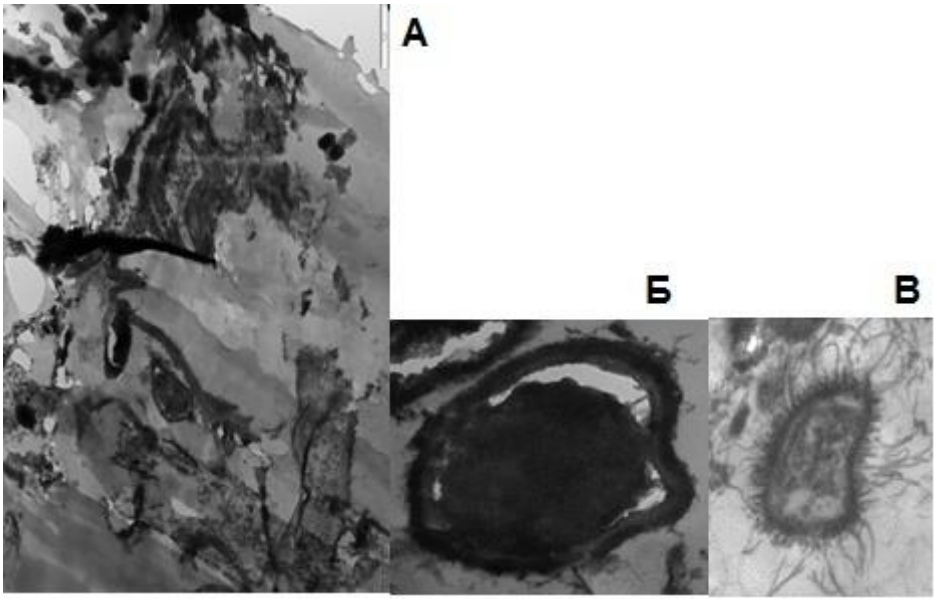


Рисунок 51 - Микрофотогафии образца А152 (Потолок/охлаждение): А – общий вид; Б – Г- старая клетка; Г- клетка с биокристаллизованным нуклеоидом (БКН)

Образец А149 Стена/охлаждение (рис. 52) был отобран в помещении с температурой ниже 0 °С. Образец был представлен зрелой сформированной поливидовой БП, в составе доминировали Г+, мало Г-, в микроколониях, присутствовали растущие клетки и ПФ с конденсированным нуклеоидом, лизированные. В образце много органики разной морфологии - плотные частицы. Матрикс - углеводный и неуглеводный. Обнаружено интересное явление – капсула неуглеводной природы окружена частицами органического материала, не проникающими внутрь. В ПФ виден биокристаллизованный нуклеоид (БКН).

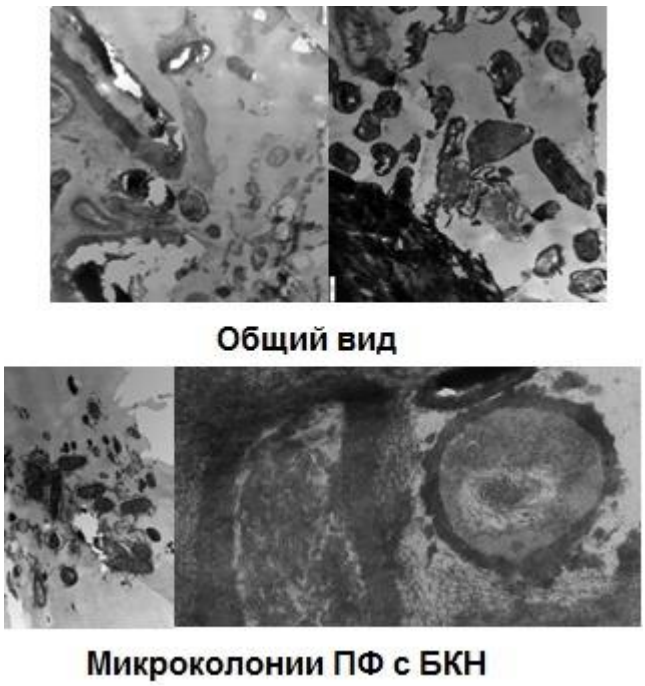


Рисунок 52 -Микрофотографии образца А149 (Стена/охлаждение).

Образец А155 Ролик/охлаждение (рис. 53) представлял собой сформированную старую БП, содержащую много органических частиц. Все признаки БП: матрикс - УГВ и не-УГВ, микроколонии, преобладали Г-, были и много Г+, много везикул, прекрасные волокна УГВ. Клеток очень много – активных и мертвых (автолизных). С биокристаллизованным нуклеоидом. С ПОМК. Выявлено необычное явление – два слоя ЭПМ, внутренний слой – не-УГВ, а наружный – из тяжей УГВ. Ещё выявлено много плазмолизоподобный клеток, видимо, Г-: когда снаружи остался внешний ПМ, а внутри – ПФ с одной ПМ. Это является аналогом споры и экзоспория Г+ бактерий. В образце выявлено огромное биоразнообразие форм клеток: много мелких форм с поперечником <1 мкм (видимо, Г+), есть единичные крупные бациллы (1х2 мкм), есть экзотические формы с фестончатыми краями. Впервые обнаружены клетки спирохет с ундулирующей мембраной. По строению клетки и виду обнаруженный организм ближе всего к возбудителю боррелизоза *Borrelia burgdorferi* [Izac, J.R., 2019].

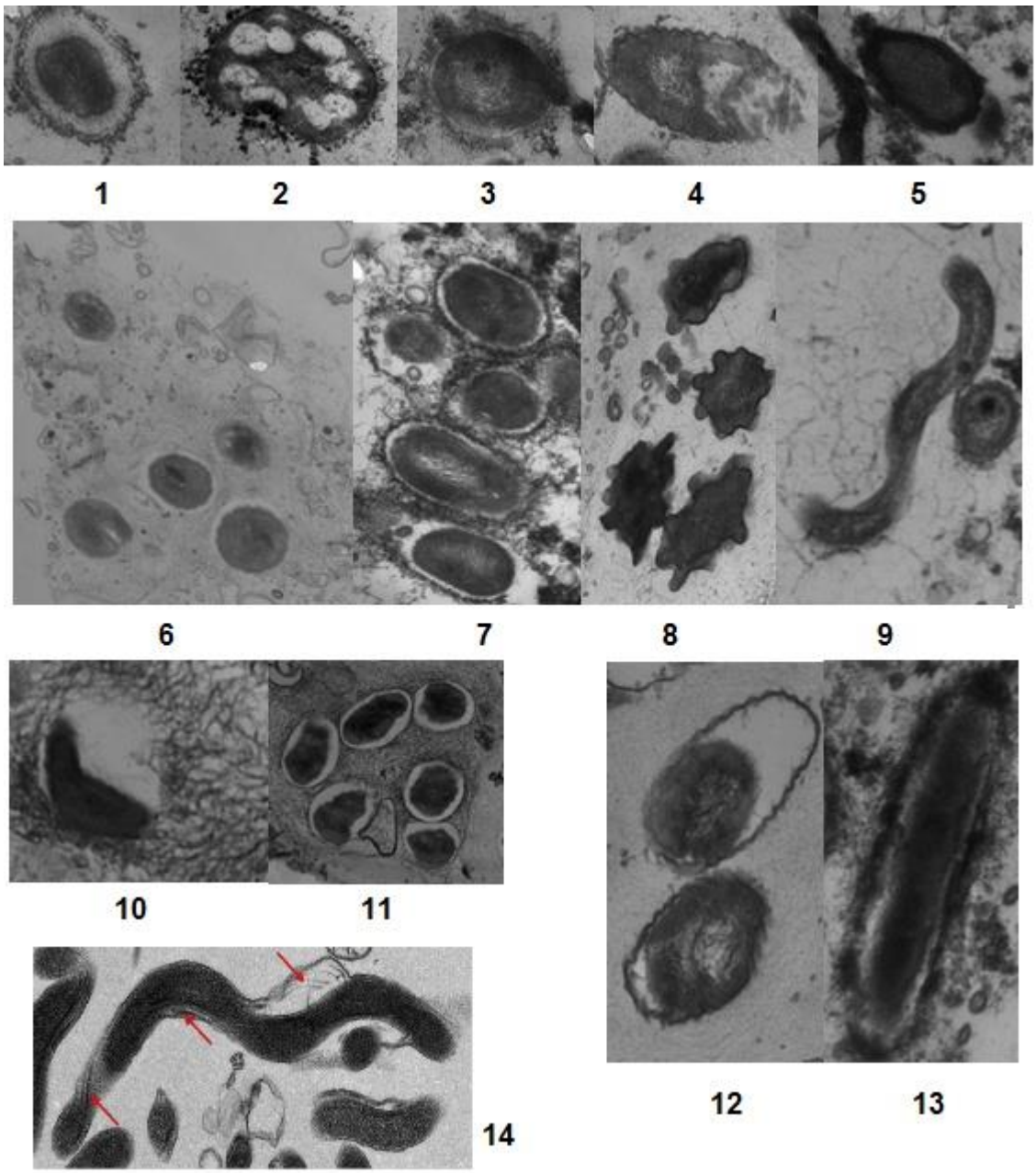


Рисунок 53 - Микрофотографии образца А155 (Ролик/охлаждение)**:**1 – Г- активная клетка; 2 – Г- с ПОМК; 3 – Г- с БКН; 4 – фестончатый край КС; 5 – ПФ Г+менее 1 μ; 6 - микроколонии Г- в матриксе; 7 - микроколонии Г+ разного физиологического состояния; 8 – микроколонии Г-; 9 - Г- Спирохета; 10 - Г+ в тяжах УГВ и в микрокапсуле без УГВ; 11 - клетка Г-; 12 - ПФ в оболочке; 13 - Г+ длиной 2 μ;
14 - фото*B. Burgdorferi i*из [486] для сравнения.

В **образце А148 Колесо 1/упаковка** (рис. 54) присутствовали массово полуразложившиеся мышечные волокна. Клетки присутствовали в небольшом количестве, разной морфологии, Г+ и Г-. Были как активные клетки, выделявшие везикулы, так и отмершие клетки. Настоящей БП нет, вероятнее

всего наблюдалась стадия формирования БП, т.к. клетки были окружены экзополисахаридными капсулами, часто объединены в группы из 2-3 клеток, выделяли мембранные везикулы, часто клетки были прикреплены к мышечным волокнам.

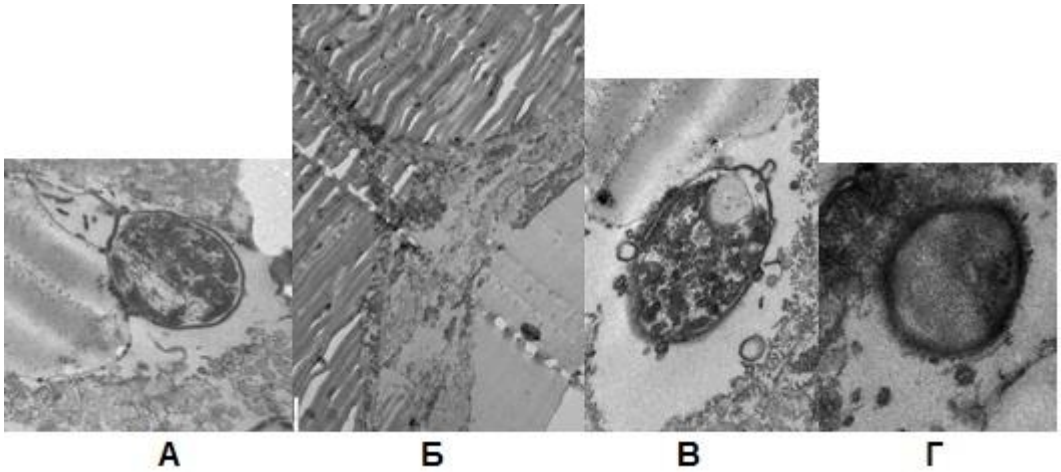


Рисунок 54 -Микрофотографии образца А148 (Колесо 1/упаковка):
А – общий вид; Б, В – Г- клетки; Г – Г+ клетка.

Образец А150 Колесо 2/упаковка (рис.55) был представлен плотной массой спрессованных частиц органического вещества, много капель жира. Клеток очень мало, живые. Это не БП, а первая фаза заселения – налипание клеток на органическую подложку.

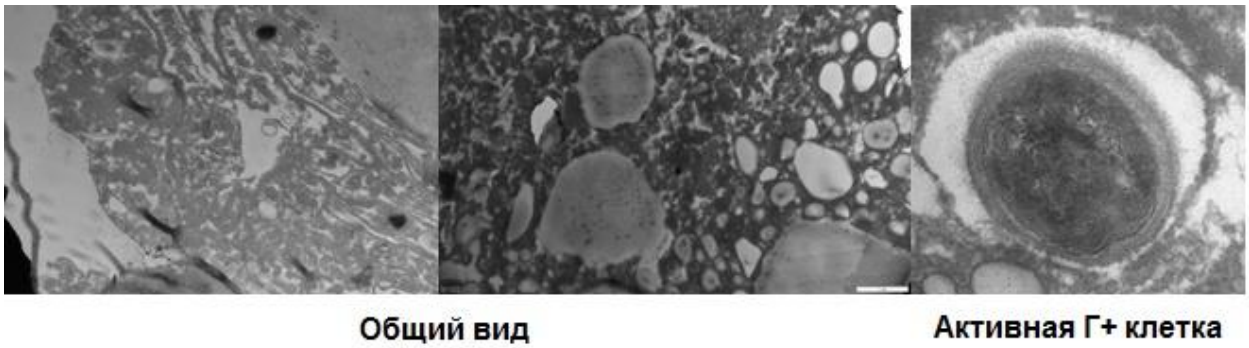


Рисунок 55 - Микрофотографии образца А150 (Колесо 2/упаковка).

Свойства БП в зависимости от сезона исследования.

Для выявления возможных сезонных изменений в структуре БП вышеприведенный массив визуальных данных был формализован в два этапа.

Сначала были определены основные показатели, характеризующие образцы БП: наличие/отсутствие БП, при отсутствии БП – количество клеток микроорганизмов, наличие органического вещества. Для БП был проведен второй этап формализации – охарактеризованы: стадия развития БП – формирующаяся, молодая, зрелая, неактивная; наличие/отсутствие мембранных везикул, микроколоний, форм покоя, доминирование Г+ или Г- бактерий, наличие неорганических частиц. С учётом этих характеристик была составлена табл. 37.

Как видно из табл. 37, в обнаружении и в характеристиках БП наблюдались закономерности. Влияние сезонных различий на наличие БП носило разнокачественный характер: в некоторых местах БП не было в течение года, в других – они всегда присутствовали, в-третьих – наблюдались максимумы в летний период, в-четвертых – наоборот, в зимний период. Не исключено, что зафиксированные различия были обусловлены большим количеством факторов, чем только сезонность.

Таблица 37 – Обобщенные данные об основных свойствах образцов биоматериалов.

№ пп	Место отбора (образцы при отборе)	Характеристики биоматериала			
		Межсезонье	Зима	Лето	Общий итог
1	Трап/потрошения (А47, А118, А151)	БП нет Клеток нет	БП нет Клеток мало	БП нет Клеток много	БП нет
2	Потолок/ потрошение (А50, А153)	Зрелая БП Г-; ПФ	Не отбирался по техническим причинам-	БП нет Клеток нет	БП да/нет
3	Шнек/ охлаждение (А112, А145)	БП нет. Начало формирования, жир, отдельные клетки	БП нет. Начало формирования, жир, отдельные клетки	БП нет. Клеток нет, жир, органический материал	БП нет/начало формиро-вания
4	Трап/ охлаждение (А42, А113, А146)	БП нет. Начало формирования, жир, отдельные клетки	БП нет. Начало формирования, жир, микро-колонии	БП нет. Начало формирования, жир, микро-колонии	БП нет/начало формиро-вания
5	Ступень/ охлаждение (А43, А114, А147)	Старая БП Преобладание Г+	Старая БП Преобладание Г+	БП нет	БП старая, преобладание Г+/нет
6	Потолок/ охлаждение (А48, А152)	Старая БП, неорганические. ПФФ	Не отбирался по техническим причинам	Старая БП, неорганическ. ПФФ	БП старая
7	Стена/охлаждение (А45, А116, А149)	Слоистая старая БП	БП нет	Слоистая старая БП Преобладание Г+	БП старая
8	Ролик/охлаждение (А49, А155)	БП нет	Не отбирался по техническим причинам -	Зрелая БП с огромным разнообразием, преобладание Г- !**Боррелии**	БП старая/нет
9	Колесо 1/ упаковка (А44, А115, А148)	Зрелая БП Г+ и Г- Разные ВПМ	Зрелая БП Г+ и Г- Г+ больше	Стадия формирования Клетки есть, но мало	БП есть/в процессе формиро-вания
10	Колесо 2/упаковка (А46, А117, А150)	Зрелая БП	-	Стадия формирования	БП есть/ форми-руется

Только образцы с четырех мест отбора позволили сравнить структуру БП по сезонам, поскольку тип БП в этих образцах не менялся. Структура БП

была сравнена по показателям: наличие мембранных везикул, типу внеклеточного матрикса – углеводной или неуглеводной природы, моно- или поливидовые, преобладание Г+/Г- бактерий, молодая-старая, типы форм покоя (табл. 38). К сожалению, ни в одном месте отбора не удалось сравнить структуру БП по всем трём сезонам сравнения

Таблица 38 - Сравнение четырех типов БП по сезонам.

Сезон / Обр. №	Межсезонье	Зима	Лето	Вывод
Ступень/ охлаждение (А43, А114, А147)	Зрелая, активная Поливидовая МКол + МВ + (мало) ВПМ – не УГВ Г+ ПФФ разные	Зрелая, активная Поливидовая МКол МВ + ВПМ–не УГВ Г+ ПФФ разные	БП нет	Одинаковая структура
Потолок/ охлаждение (А48, А152)	Старая, неактивная Моновидовая МКол есть МВ нет ВПМ–УГВ/неУГВ Г+ ПФФ разные	БП нет	Старая, неактивная Поливидовая МКол нет МВ нет; ВПМ–УГВ/неУГВ Г+ и Г- ПФФ разные	Разная структура
Стена/охлаждение (А45, А116, А149)	Зрелая, активная Поливидовая МКол + МВ мало ВПМ–УГВ/неУГВ Г+ (преобл) и Г- ПФФ разные	БП-	Зрелая, активная Моновидовая МКол + МВ много ВПМ–неУГВ Г-; ПФФ одного типа	Разная структура
Колесо 1/ упаковка (А44, А115, А148)	Зрелая, активная Поливидовая Микроколонии + МВ мало ВПМ–УГВ/неУГВ Г+ и Г- ПФФ мало, однотипные	Зрелая, активная Поливидовая Микроколонии + МВ мало ВПМ–УГВ/неУГВ Г+ и Г- ПФФмало, однотипные	БП-	Одинаковая структура
Сокращения: МКол + - наличие микроколоний, МВ+ - наличие мембранных везикул, ВПМ–УГВ/неУГВ – внеклеточный матрикс углеводной/неуглеводной природы.				

Как видно из табл. 38, БП в разных местах отбора имели или одинаковую структуру по сезонам, или различную.

Существенное изменение структуры БП произошло в двух случаях – для БП на потолке и на стене. Рациональной причины таких изменений найти не

удалось. Только наличие боррелии в летнее время можно объяснить активностью переносчиков этого патогена (клещей) летом.

Далее исследовали микробиоту нативных БП абиотических объектов производственной среды технологического, вспомогательного оборудования, инвентаря и конструкций как в зависимости от сезона, так и в зависимости от функции и места в производственной цепи. Результаты выполненных исследований представлены в табл. 39, 40 и 41, соответственно, для межсезонья, зимнего и летнего периода. В табл. 42 дан анализ состава микрофлоры по сезонам. В табл. 43 представлены сводные данные, позволяющие проанализировать сходства/различия видового состава микробиоты БП по сезонам.

Таблица 39 - Микрофлора БП на объектах производственной среды в межсезонье

Шифр образца	Наименование производственного объекта	Тип объекта	Патогенные микроорганизмы			Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы
			рода *Salmonella*	*L. monocytogenes*	Campylobacter	Наименование микроорганизма
1	2	3	4	5	6	7
А43	Ступень/охлаждение	К	н/о	н/о	н/о	*Hafnia alvei* *Lelliottia amnigena,* *Pseudomonas gessardii* *Raoultellaornithinolytica* *Serratia liquefaciens* *Yersinia spp*
А44	Колесо 1/упаковка	ВО	н/о	н/о	н/о	*Enterobacter cloacae* *Kocuria carniphila* *Pseudomonas extremorientalis* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas koreensis* *Serratia proteamaculans*
А45	Стена/охлаждение	К	н/о	н/о	н/о	*Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas grimontii* *Pseudomonas libanensis* *Serratia fonticola* *Yersinia enterocolitica*
А46	Колесо 2/упаковка	ВО	н/о	н/о	н/о	*Microbacterium liquefaciens* *Pseudomonas brenneri* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas libanensis* *Pseudomonas tolaasii*
А48	Потолок/охлаждение	К	н/о	н/о	н/о	*Candida zeylanoides* *Kocuria polaris* *Pseudomonas lundensis* *Pseudomonas koreensis*
А50	Потолок/потрошение	К	н/о	н/о	н/о	*Fictibacillus arsenicus* *Kocuria rosea* *Pseudomonas lundensis* *Staphylococcus saprophyticus*

Таблица 40 - Микрофлора БП на объектах производственной среды в зимний период

Шифр образца	Наименование производственного объекта	Тип объекта	Патогенные микроорганизмы			Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы
			рода *Salmonella*	*L. monocytogenes*	Campylobacter	Наименование микроорганизма
1	2	3	4	5	6	7
А113	Трап/охлаждение	К	н/о	н/о	н/о	*Citrobacter spp* *Escherichia coli* *Lelliottia amnigena* *Pseudomonas spp* *Raoultella terrigena* *Serratia fonticola* *Yersinia enterocolitica ssp*
А114	Ступень/охлаждение	К	н/о	н/о	н/о	*Enterobacter cloacae* *Hafnia alvei* *Lelliottia amnigena,* *Pseudomonas spp* *Raoultella ornithinolytica* *Raoultella spp* *Raoultella terrigena* *Serratia liquefaciens* *Yersinia intermedia*
А115	Колесо 1/упаковка	ВО	н/о	н/о	н/о	*Enterobacter cloacae* *Kocuria carniphila* *Pseudomonas brenneri* *Pseudomonas fragi* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas koreensis* *Pseudomonas spp* *Serratia proteamaculans* *Serratia spp*
А117	Колесо 2/упаковка	ВО	н/о	н/о	н/о	*Pseudomonas agarici* *Pseudomonas corrugata* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas spp* *Pseudomonas tolaasii*

Таблица 41 - Микрофлора БП на объектах производственной среды в летний период

Шифр образца	Наименование производственного объекта	Тип объекта	Патогенные микроорганизмы			Мезофильные аэробные и факультативно-анаэробные микроорганизмы
			рода *Salmonella*	*L. monocytogenes*	Campylobacter	Наименование микроорганизма
1	2	3	4	5	6	7
146	Трап/охлаждение	К	н/о	н/о	н/о	*Candida parapsilosis* *Carnobacterium maltaromaticum* *Pseudomonas brenneri* *Pseudomonas frederiksbergensis* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas libanensis* *Pseudomonas lundensis* *Pseudomonas veronii* *Serratia liquefaciens*
А147	Ступень/охлаждение	К	**Обн.**	н/о	н/о	*Aeromonas sp* *Buttiauxella gaviniae* *Lelliottia amnigena* *Pseudomonas lundensis* *Pseudomonas proteolytica* *Pseudomonas poae* *Pseudomonas trivialis* *Rhodococcus triatomae*
А148	Колесо 1/упаковка	ВО	н/о	н/о	н/о	*Aeromonas salmonicida ssp salmonicida* *Carnobacterium divergens* *Carnobacterium maltaromaticum* *Pseudomonas corrugata* *Pseudomonas extremorientalis* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas proteolytica* *Pseudomonas tolaasii* *Serratia proteamaculans* *Yarrowia lipolytica* *Yersinia frederiksenii*

Окончание таблицы 41

1	2	3	4	5	6	7
A149	Стена/охлаждение	К	н/о	н/о	н/о	*Burkholderia plantarii* *Pseudomonas grimontii* *Pseudomonas libanensis*
A155	Ролик/охлаждение	ВО	н/о	н/о	н/о	*Achromobacter denitrificans* *Burkholderia plantarii* *Carnobacterium maltaromaticum* *Lelliottia amnigena* *Pseudomonas corrugata* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas veronii* *Raoultella ornithinolytica* *Serratia fonticola* *Yarrowia lipolytica* *Yersinia intermedia*
A151	Трап/потрошение	К	н/о	н/о	н/о	*Acinetobacter johnsonii* *Pseudomonas corrugata* *Pseudomonas fulva* *Pseudomonas koreensis* *Pseudomonas tolaasii* *Serratia liquefaciens*

Таблица 42 – Анализ состава микробиоты БП

Шифры	Объект	Описание микробиоты БП
1	2	3
А113, А146	Трап/охлаждение	Межсезонье: видовое разнообразие более обширное по сравнению с летним периодом. Установлено наличие мезофильных и психрофильных патогенных и условно-патогенных бактерий. Лето: большая часть микрофлоры являлась непатогенными микроорганизмами рода *Pseudomonas,* отвечающих за порчу пищевой продукции. В оба периода выделены патогенные микроорганизмы рода *Serratia*(возбудители различных инфекций человека, проявляют резистентность к антибактериальнымкантибактериальным препаратам).
А43, А114, А147	Ступень/ охлаждение	Подтверждено наличие *Salmonella*. Большая часть микрофлоры относится к психрофильным патогенным и условно-патогенным бактериям. Межсезонье: выделено 6 родов (6 видов) микроорганизмов. Рекомендованы корректирующие мероприятия. Зима: выделено 7 родов (9 видов) микроорганизмов, предположительно резистентных к применяемым дезинфектантам. Лето: выделено 5 родов. Половина видового состава принадлежала роду *Pseudomonas,* представители которого вызывают порчу пищевой продукции. Отмечено наличие микроорганизмов рода *Lelliottia*и*Pseudomonas*во всех сезонах. Обнаружены редкие представители: *Raoultella terrigena* является грамотрицательной, оксидазоотрицательной, аэробной, неподвижной, капсулированной, неспорообразующей бактерией. Содержит многочисленные факторы вирулентности, обнаруженные в *Klebsiella pneumonia* (возбудитель инфекций).
А44, А115, А148	Колесо 1/упаковка	Межсезонье: установлено минимальное родовое (4) и видовое (6) разнообразие выделенных микроорганизмов. Зима: так же 4 рода, но разнообразие микрофлоры увеличилось до 9 видов. Лето: микроорганизмы были представлены уже 6 родами и 11 видами. В биоплёнках во всех периодах выявлено наличие как мезофильных, так и психрофильных патогенных и условно-патогенных бактерий. Установлена высокая «сходимость» выделенной микрофлоры по сезонам и зонам/цехам: наличие микроорганизмов рода *Serratia*и*Pseudomonas* было отмеченово всех сезонах, а бактерий родов *Enterobacter и Kocuria*– в двух из трёх периодах. Выделены дрожжи *Yarrowia lipolytica* (могут вызывать инфекции у пациентов с ослабленным иммунитетом и пациентов в критическом состоянии)
А45, А149	Стена/ охлаждение	Наличие нативных БП подтверждено в 2х из 3х периодов. Межсезонье: выделено 3 рода микроорганизмов (*Pseudomonas, Serratia* и *Yersinia*). Лето: 2 рода (*Burkholderia*, среди представителей к значительное количество патогенов человека и животных; Pseudomonas). Обнаружен*Serratia fonticola*- малоизученный патоген человека (описан как вызывающий инфекции кожи и мягких тканей после травмы, был выделен у пациентов из мочеполовой системы).
А46, А117	Колесо 2/ упаковка	Межсезонье: установлено 2 рода (*Microbacterium*– 1 вид и*Pseudomonas*– 4 вида). Лето: БП не подтвердилась. Установлены 3 рода (*Brochothrix*– 1 вид, *Microbacterium* – 1 вид и *Pseudomonas*– 4 вида). *Brochothrix thermosphacta*-непротеолитический микроорганизм порчи мяса

Окончание таблицы 42

1	2	3
А48, А152	Потолок/ охлаждение	Межсезонье: в БП присутствовали как Г+ (*Candida zeylanoides, Kocuria polaris*), так и Г- (*Pseudomona slundensis, Pseudomonas koreensis*) микроорганизмы. Лето: БП состояла из Г- (*Pseudomonas chlororaphis ssp chlororaphis, Pseudomonas lundensis*) и коккового микроорганизма *Staphylococcus saprophyticus ssp saprophyticus*. Независимо от сезона микробиота БП состоит из *Pseudomonas*, обладающих очень хорошей способностью образовывать БП. СимбиозГ- и Г+ микроорганизмов способствует устойчивости БП к воздействию дезинфектантов.
А49, А155	Ролик/ охлаждение	Межсезонье: очень разнообразная микрофлора (*Carnobacterium maltaromaticum, Lelliottia amnigena, Pseudomonas corrugate, Pseudomonas gessardii, Raoultella ornithinolytica, Serratia fonticola*), как и в летний период (*Achromobacte rdenitrificans, Burkholderia plantarii, Carnobacterium maltaromaticum, Lelliottiaamnigena, Pseudomonas corrugate, Pseudomonas gessardii, Pseudomonas veronii, Raoultella ornithinolytica, Serratia fonticola, Yarrowia lipolytica, Yersinia intermedia*). Лето: наличие двух видов *Yersinia. Raoultella ornithinolytica, (*инкапсулированная Г- аэробная палочка, принадлет к семейству *Enterobacteriaceae).* Дрожжи *Yarrowia lipolytica* . Особых изменений в составе БП в разные сезоны не наблюдалось.
А50, А153	Потолок / потрошение	Межсезонье: присутствовали как Г+ (*Fictibacillus arsenicus, Kocuria rosea, Staphylococcuss aprophyticus*), так и Г- (*Pseudomonas lundensis*) микроорганизмы. Лето:не была подтверждена структура БП. Выявлены Г+ (*Fictibacillus arsenicus, Kocuria polaris, Kocuria rosea*) микроорганизмы, в т.ч. дрожжей *Candida zeylanoides. Kocuria*- устойчивы к радиации, *Fictibacillus arsenicus*- спорообразующая бактерия. Микробиота потолка не зависела от сезона.
А151	Трап /потрошение	БП представляла симбиоз Г- бактерий, таких *Acinetobacter johnsonii* (микроорганизм порчи пищевых продуктов), 4 вида *Pseudomonas* (*P.corrugate, P.fulva, P.koreensis, P.tolaasii*) и *Serratialiquefaciens*. *Acinetobacter spp*. - способнывыживать в течение длительного времени как на сухих поверхностях, так и в воде, образовывать БП и противостоять дезсредствам, выдерживать более 60 минут при 60 °С.

Таблица 43- Сводные данные по идентификации микробиоты БП по сезонам.

Межсезонье		Зима		Лето	
Шифр	Микроорганизмы	Шифр	Микроорганизмы	Шифр	Микроорганизмы
1	2	3	4	5	6
-	-	A113	*Citrobacter spp* *Escherichia coli* *Lelliottia amnigena* *Pseudomonas spp* *Raoultella terrigena* *Serratia fonticola* *Yersinia enterocolitica ssp*	A146	*Candida parapsilosis* *Carnobacterium maltaromaticum* *Pseudomonas brenneri* *Pseudomonas frederiksbergensis* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas libanensis* *Pseudomonas lundensis* *Pseudomonas veronii* *Serratia liquefaciens*
A43	*Hafnia alvei* *Lelliottia amnigena,* *Pseudomonas gessardii* *Raoultella ornithinolytica* *Serratia liquefaciens* *Yersinia spp*	A114	*Enterobacter cloacae* *Hafnia alvei* *Lelliottia amnigena,* *Pseudomonas spp* *Raoultella ornithinolytica* *Raoultella spp* *Raoultella terrigena* *Serratia liquefaciens* *Yersinia intermedia*	A147	*Aeromonas sp* *Buttiauxella gaviniae* *Lelliottia amnigena* *Pseudomonas lundensis* *Pseudomonas proteolytica* *Pseudomonas poae* *Pseudomonas trivialis* *Rhodococcus triatomae*
A44	*Enterobacter cloacae* *Kocuria carniphila* *Pseudomonas extremorientalis* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas koreensis* *Serratia proteamaculans*	A115	*Enterobacter cloacae* *Kocuria carniphila* *Pseudomonas brenneri* *Pseudomonas fragi* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas koreensis* *Pseudomonas spp* *Serratia proteamaculans* *Serratia spp*	A148	*Aeromonas salmonicida ssp salmonicida* *Carnobacterium divergens* *Carnobacterium maltaromaticum* *Pseudomonas corrugata* *Pseudomonas extremorientalis* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas proteolytica* *Pseudomonas tolaasii* *Serratia proteamaculans* *Yarrowia lipolytica* *Yersinia frederiksenii*

Продолжение таблицы 43

1	2	3	*4*	5	*6*
А45	Pseudomonas gessardii *Pseudomonas grimontii* *Pseudomonas libanensis* *Serratiafonticola* *Yersinia enterocolitica*	А116-не подтвержде на структура, характерная для БП	*Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas libanensis* *Pseudomonas spp* *Serratia fonticola* *Yersinia enterocolitica ssp enterocolitica* *Yersinia spp*	А149	*Burkholderia plantarii* *Pseudomonas grimontii* *Pseudomonas libanensis*
А46	*Microbacterium liquefaciens* *Pseudomonas brenneri* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas libanensis* *Pseudomonas tolaasii*	А117	*Pseudomonas agarici* *Pseudomonas corrugata* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas spp* *Pseudomonas tolaasii*	А150 не подтвержде на структура, характерная для БП	*Brochothrix thermosphacta* *Microbacterium liquefaciens* *Pseudomonas brenneri* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas libanensis* *Pseudomonas tolaasii*
А48	*Candida zeylanoides* *Kocuria polaris* *Pseudomonas lundensis* *Pseudomonas koreensis*	-	-	А152	*Pseudomonas chlororaphis ssp chlororaphis* *Pseudomonas lundensis* *Staphylococcus saprophyticus ssp saprophyticus*
А49 не подтвержд ена структура, характерна я для БП	*Carnobacterium maltaromaticum* *Lelliottia amnigena* *Pseudomonas corrugata* *Pseudomonas gessardii* *Raoultella ornithinolytica* *Serratia fonticola*	-	-	А155	*Achromobacter denitrificans* *Burkholderia plantarii* *Carnobacterium maltaromaticum* *Lelliottia amnigena* *Pseudomonas corrugata* *Pseudomonas gessardii* *Pseudomonas veronii* *Raoultella ornithinolytica* *Serratia fonticola* *Yarrowia lipolytica* *Yersinia intermedia*

Окончание таблицы 43

1	2	3	*4*	5	*6*
A50	*Fictibacillus arsenicus* *Kocuria rosea* *Pseudomonas lundensis* *Staphylococcus saprophyticus*	-	-	A153 не подтвержде на структура, характерная для биопленки	*Candida zeylanoides* *Fictibacillus arsenicus* *Kocuria polaris* *Kocuria rosea*
-	-	-	-	A151	*Acinetobacter johnsonii* *Pseudomonas corrugata* *Pseudomonas fulva* *Pseudomonas koreensis* *Pseudomonas tolaasii* *Serratia liquefaciens*

Для получения более полной информации о разнообразии микроорганизмов БП изучаемых объектов были проведены молекулярно-генетические исследования. В результате секвенирования ампликонов 16S рРНК гена выявили 29 бактериальных филумов, которые участвуют в образовании БП в производственной среде. Из 29 бактериальных филумов только представители *Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidota* и *Actinobacteriota* были доминирующими микробными сообществами. Во всех отобранных пробах (кроме А113, А151 и А153, которые по результатам электронной микроскопии не являлись структурно организованными БП), доминировали представители филума *Proteobacteria,* количество чтений для этого филума составляло от 46,3% до 99,6%, в то время как в пробе А151,доминировали представители филума*, Firmicutes,* количество чтений для которых составляло 79,5%. Количество чтений представители филума *Firmicutes*, во всех пробах кроме А151, составляло от 0,04% до 11,7%. Количество чтений представители филума *Actinobacteriota*, во всех пробах кроме А113, составляло от 0,02% до 26,7%. Количество чтений представители филума *Bacteroidota,* во всех образцах, составляло от 0,15% до 30,5%. В пробах А43, А48 и А149 выявлено значительное количество чтений представителей филума *Patescibacteria*, которое составило 12,9%, 7,31% и 2,7%, соответственно (рис. 56).

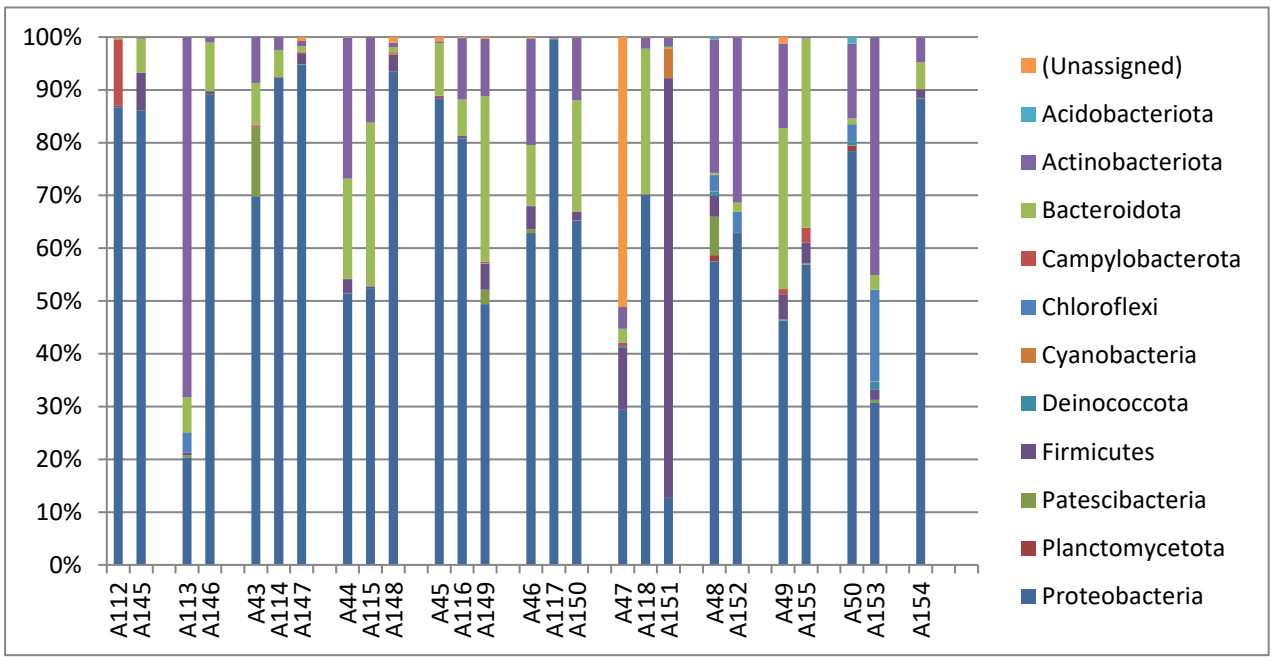


Рисунок 56 - Таксономический состав образцов микробных БП: А43-А50 – межсезонье; А112-А118 - зима, А145-А154 - лето. На рисунке представлены филумы, количество чтений, которых более или равно 0,5% от общего количества чтений.

Результаты секвенирования ампликонов 16SрРНКгена выявили 29 бактериальных филумов, которые участвовали в образовании БП на абиотических поверхностях в производственной среде. Из 29 бактериальных филумов только представители *Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidota* и *Actinobacteriota* были доминирующими микробными сообществами. Динамика изменения этих филумов в БП менялась по-разному. Численность *Proteobacteria* менялась в диапазоне 12-94% ,*Firmicutes* - 0,1-79%(наибольшее число наблюдалось в образцах БПв летний период), *Bacteroidota* – 0,1-31% (доминировали в образцах колеса тележек и стен в помещении для охлаждения тушек) и *Actinobacteriota* - 0,02-44% (доминировали в микробных сообщества БП в межсезонный и летний периоды).В относительно большом количестве в конструкциях также были детектированы *Patescibacteria* (потолок на участке потрошения, ступень и потолок на участке охлаждения,),*Chloroflexi* (трап и потолок на участке охлаждения, потолок на участке потрошения), *Cyanobacteria*(трап на участке потрошения).

Кластеризация микробных сообществ биоплёнок подтвердила, что состав микробных сообществ биоплёнок не устойчив, и это изменение зависит от сезона(рис. 57).

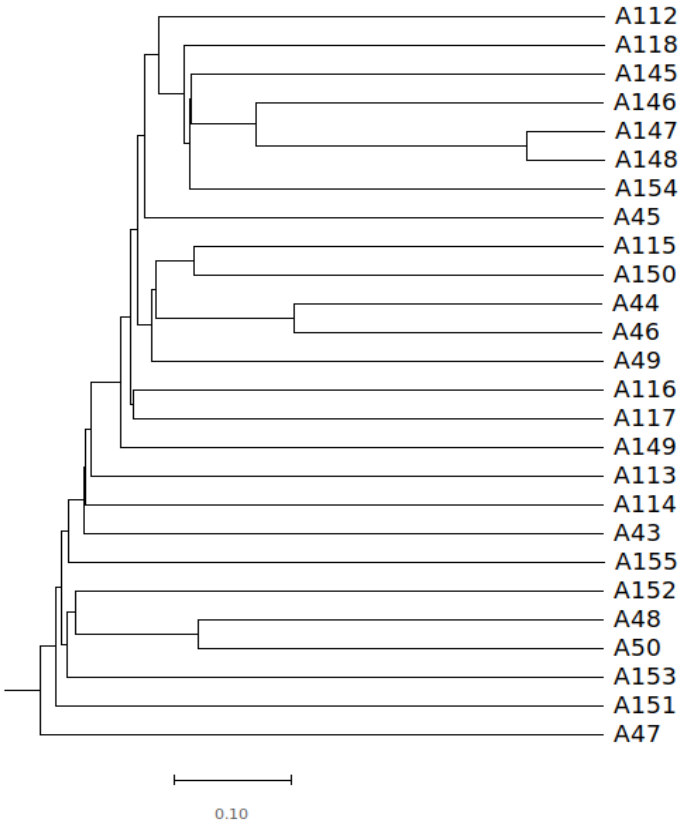


Рисунок 57 - Филогенетическое дерево на основании анализа по Jaccard, иллюстрирующее сходство микробных сообществ БП:
A43-A50 – межсезонье; A112-A118 - зима, A145-A154 - лето.

В ряде образцовпромышленных БП обнаружены патогенные бактерии видов *Campylobacter jejuni* и *Staphylococcus aureus*. При этом, суммарное количество чтений 16S рРНК *Staphylococcus aureus*в пробах не превышало 0,4% от общего количества чтений, а количество чтений 16S рРНК*Campylobacter jejuni*в пробах не превышает 0,2% от общего количества чтений (табл. 44).

Таблица 44 - Патогенные бактерии, обнаруженные в производственных БП.

Патоген	Шифр	Номер OTE/ идентичность
Campylobacter jejuni	A47 – 0,19%, A145 - 0,01%, A147 - 0,06%, A148 - 0,03%, A149 - 0,07%, A153 - 0,01%.	Otu1164/ 99,1%
Staphylococcus aureus	A46 – 0,11%, A47 – 0,19%, A48 – 0,16%, A49 – 0,05%, A145 – 0,03%, A147 – 0,02%, A148 – 0,02%, A151 – 0,21%, A152 – 0,01%, A153 – 0,27%.	Otu227/ 98.9%
	A46 – 0,04%,A47 – 0,19%,A48 – 0,23%, A144 – 0,17%, A145 – 0,01%, A151 – 0,1%, A153 – 0,11%.	Otu64/ 98,7%

Помимо патогенных бактерий в образцах БП были детектированы бактерии родов *Brochothrix и Pseudomonas,* вызывающие порчу мяса и мясной продукции. Бактерии рода *Brochothrix* были обнаружены в составе образцов A44, A46, A115, A147, A148, A150 и A153 и A144, число чтений данных бактерий составляло от 0,01% до 0,71%, от общего количества чтений. Бактерии рода *Pseudomonas* были обнаружены в составе всех образцов, за исключением A50, количество чтений этих бактерий составляло от 0,03% до 74,9%, от общего количества чтений. Наибольшая доля бактерий рода *Pseudomonas* наблюдалась в образцах A45 (74,4%), A49 (33,3%), A114 (39,5%), A117 (74, 9%), A147 (58, 3%) и A148 (57,8%).

В таблице 45 представлено сопоставление идентификации микроорганизмов классическими микробиологическими методами и методом секвенирования 16S. Из табл. 41 видно, на сколько повышается информативность данных о составе микрофлоры производственной среды при использовании современных методов исследований.

Таблица 45 - Идентификация микроорганизмов БП классическими и современными микробиологическими методами

№ пп	Шифр	Филумы микроорганизмов, выявленные в разные сезоны разными методами					
		Межсезонье		Зима		Лето	
		Классика	16 S	Классика	16 S	Классика	16 S
1	2	3	4	5	6	7	8
1.	A112, A145	-	-	*Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Proteobacteriaγ, Ascomycota,*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota, Firmicutes, Proteobacteria*
2.	A113, A146	-	-	*Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Chloroflexi Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*	*Ascomycota, Firmicutes, Proteobacteriaγ,*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*
3.	A 43, A114, A147	*Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota, Cyanobacteria, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*	*Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota, Cyanobacteria, Firmicutes, Proteobacteria*
4.	A 44, A115, A148	*Actinobacteriota, Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, acteroidota, Chloroflexi, Firmicutes, Proteobacteria*	*Ascomycota, Firmicutes, Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota, Cyanobacteria, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*

Продолжение таблицы 45

1	2	3	4	5	6	7	8
5	A 45, A116, A149	*Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*	*Proteobacteria β, Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota, Cyanobacteria, Deinococcota, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*
6	A46 , A117, A150	*Actinobacteriota, Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Chloroflexi, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*	*Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Proteobacteria*	*Actinobacteriota, Firmicutes, Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*
7	A47, A118, A151	*Ascomycota, Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota, Chloroflexi, Firmicutes, Proteobacteria*	*Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Firmicutes, Proteobacteria*	*Ascomycota, Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Cyanobacteria, Deinococcota, Firmicutes, Proteobacteria*
8	A 48, A152	*Actinobacteriota, Ascomycota, Proteobacteriaγ*	*Acidobacteriota Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcota, Firmicutes, Patescibacteria, Planctomycetota, Proteobacteria*	-	-	*Firmicutes, Proteobacteriaγ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Chloroflexi, Firmicutes, Proteobacteria*

Окончание таблицы 45

1	2	3	4	5	6	7	8
9	A49, A155	*Firmicutes, Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*	-	-	*Ascomycota, Firmicutes, Proteobacteria β, Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota, Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*
10	A50, 153	*Actinobacteriota, Firmicutes, Proteobacteria γ*	*Acidobacteriota, Actinobacteriota, Bacteroidota, Chloroflexi, Deinococcota, Firmicutes, Patescibacteria, Planctomycetota, Proteobacteria*	-	-	*Actinobacteriota, Ascomycota, Firmicutes*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Chloroflexi, Cyanobacteria, Deinococcota, Firmicutes,* A153 *Patescibacteria,* A153 *Proteobacteria*
11	A 151	-	-	-	-	*Proteobacteria γ*	*Actinobacteriota, Bacteroidota, Campylobacterota Firmicutes, Patescibacteria, Proteobacteria*

5.2 Разработка методологии идентификации, сбора и оценки наличия биопленочного фенотипа микробных контаминантов пищевого производства

В настоящее время детекция (обнаружение) и идентификация бактерий в состоянии биопленки затруднены, поскольку экзополисахаридный матрикс препятствует механическому переносу бактерий на питательные среды для последующей идентификации. Высока вероятность получения так называемых ложноотрицательных результатов микробиологических посевов.

В результате выполнения предыдущих этапов работы разработан проект методологии идентификации, сбора и оценки наличия биопленочного фенотипа микробных контаминантов пищевого производства. Документ содержит следующие разделы: общие положения и область применения; методы индикации биоплёнок на месте in situ (экспресс-тесты); методы детального исследования биоплёнок, порядок отбора проб биоплёнок; перечень возможных мест обнаружения и отбора биоплёнок и перечень цитируемой литературы.

Один из методов (методы индикации биоплёнок на месте in situ (экспресс-тесты)) оформлен в виде методических рекомендаций МР 4.2.0161–19 «Методы индикации биологических пленок микроорганизмов на абиотических объектах» (Приложение Д), в которых описаны этапы индикации БП на пищевых предприятиях:

l- визуальная индикация мест локализации биопленок с помощью каталазного экспресс-теста; 2- визуальная индикация мест локализации биопленок с помощью флуорохромных красителей и дальнейшей визуализации их при помощи специального освещения; 3- разрушение экзополисахаридного матрикса биопленки специальными ферментными индикаторами с последующим отбором и микробиологическим исследованием проб смывов.

Рекомендованы места отбора проб на пищевых предприятиях:

-застойные, труднодоступные для моющих и дезинфицирующих средств зоны (стыковые соединения, сварные швы, узкие каналы, мембранные фильтры, решетки сепараторов, сита и т.д.);

-резьбовые соединения сосудов и резервуаров; полы и стены; пористые поверхности оборудования и инвентаря (пластиковая тара, корродированный металл); объемные резервуары (малые фиксированные и движущиеся внутренние элементы); конвейеры (мелкие элементы (болты, уплотнители), трещины на полотне); пробоотборники, краны, клапаны, дренажные каналы; шланги, уплотнители, перчатки, резиновые и силиконовые насадки; поверхности и края инвентаря, подверженные механическим нагрузкам (лезвие ножей, край пластиковых и металлических совков, разделочные доски, пластиковая и металлическая тара).

Методические рекомендации предназначены, прежде всего, для проведения исследований БП на пищевых производствах с целью предотвращения микробной контаминации пищевой продукции. Отличительной особенностью документа является существенно расширенный перечень мест возможного обнаружения БП (потолок, колеса внутреннего транспорта, готовая продукция и пр.).

Кроме того, были разработаны МР № 784-00419779-2021 «Методика создания моделей моно- и мультивидовых биопленок грамотрицательных и грамположительных бактерий» (Приложение Г), в которых описаны лабораторные модели БП микроорганизмов для изучения устойчивости/чувствительности к дезинфектантам.

5.3 Исследование формирования биопленок патогенами и сапротрофами in vitro.

Основной целью данного этапа исследования было изучение роли биопленок, образующихся на разных этапах и локациях в производственной

среде предприятий и их роди в распространении патогенных микроорганизмов. В дальнейшем результаты этих исследований, будут использованы в разработке адекватной и эффективной тактики борьбы с пищевыми инфекциями.

Была изучена способность микроорганизмов, отобранных из производственной среды, формировать биопленки. Были исследованы 48 изолятов пищевых патогенов и условно-патогенных микроорганизмов, которые были выделены из различных объектов. Для создания максимально реалистической модели биопленки, были выбраны температурные и временные режимы характерные для производственных цехов предприятий. Результаты количественного анализа формирования бактериальных биопленок в микротитровальных полистироловых планшетах представлены на рис. 58.

Проведенные исследования показали, что один из основных пищевых патогенов *Listeria monocytogenes* способен формировать биопленки уже за сутки при температуре всего +4ºС. В тоже время, было обнаружено, что и непатогенные виды такие, как *L.inocua и L.welshimeri*, также способны к интенсивному биопленкообразованию. Это достаточно низкая температура для формирования биопленок. Обусловлено это, видимо, тем, что эти патогены хорошо адаптированы к таким условиям.

Для более детального понимания различий в способности к биопленкообразованию *L.monocytogenes*, выделенных с различных объектов производственной среды были проведены исследования на штаммах, выделенных с конкретных мест локализации на мясоперерабатывающем предприятии - культура №71, выделенная с внешней поверхности низкой тележки для транспортировки сырья; культура №72, выделенная с конвейера для разделки мясного сырья; культура №73, изолированная с корпуса ленточной пилы, культура №76, обнаружена в трапе.

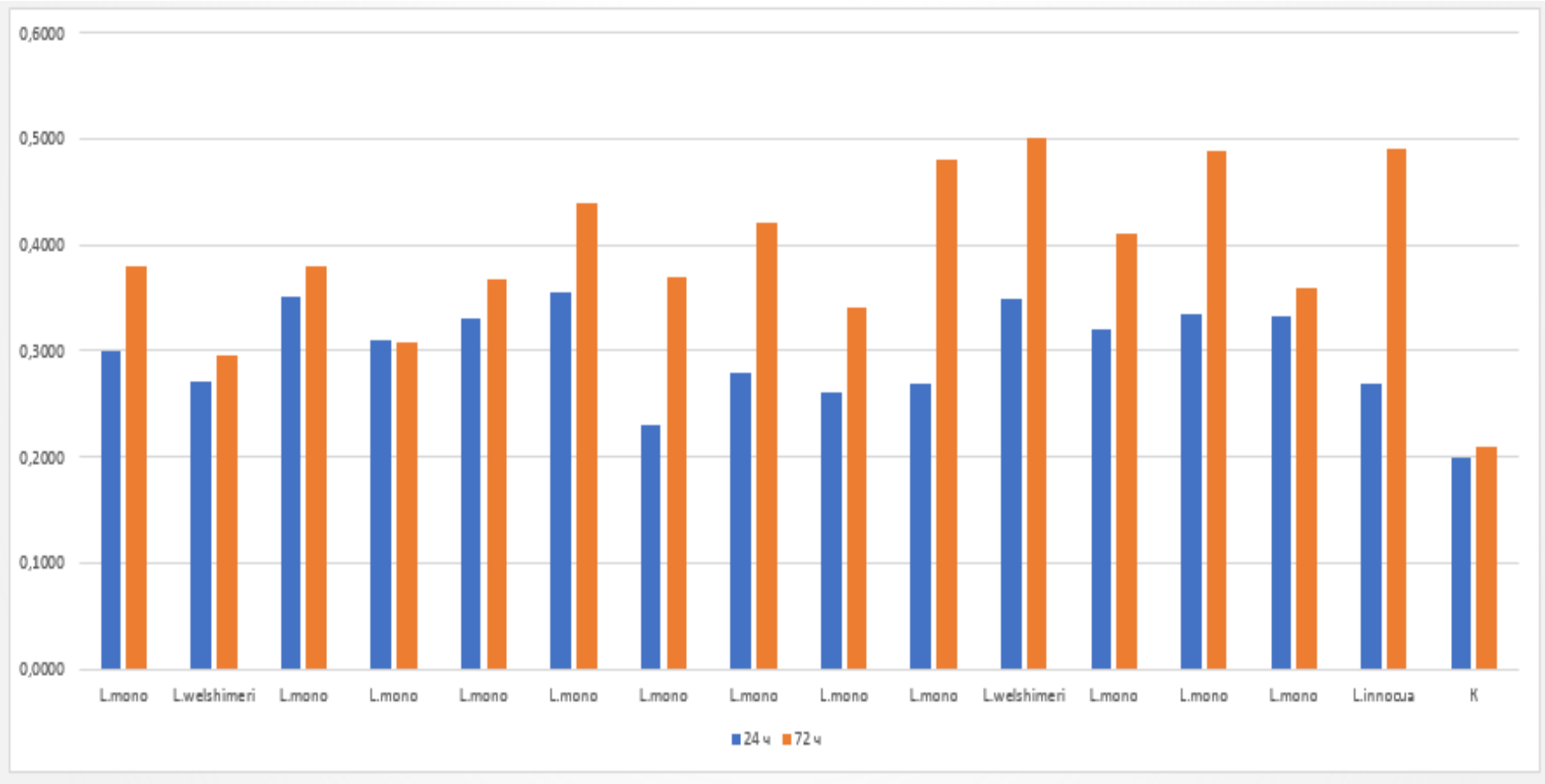


Рисунок 58 - Формирование биопленки изолятами *Listeria spp*. в динамике при температуре +4ºС. Здесь и на последующих гистограммах ось абсцисс показывает исследуемые микроорганизмы, а ось ординат-оптическую плотность (ОП).

Представлял интерес проанализировать способность анализируемых штаммов к формированию биопленок при низкой положительной (+4 °С). Ежесуточно проводили измерения оптической плотности.

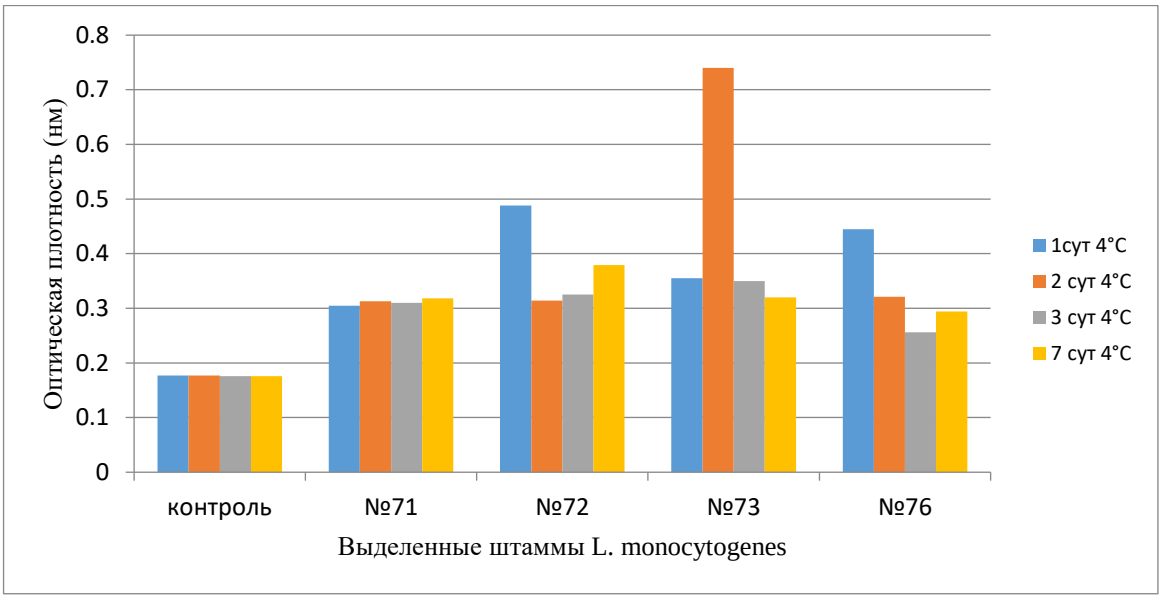


Рисунок 59- Интенсивность образования биопленок различными штаммами *L.monocytogenes* при температуре +4°С.

Как видно из данных, приведенных на рис. 59, наибольшей способностью к биопленкообразованию (оптическая плотность - 0,488 нм) на 1 сутки инкубирования при температуре +4°С обладал штамм №72, выделенный с конвейера участка разделки сырья. Также интенсивную биопленкообразующую способность показал штамм №76, выделенный с трапа, о чем свидетельствовали значения оптической плотности 0,445 нм.

На вторые сутки инкубирования штамм №73, выделенный с ленточной пилы, продемонстрировал самую высокую способность к образованию биопленок для данной температуры – оптическая плотность достигала значений выше 0,740 нм. Все остальные штаммы показали практически одинаковую способность к образованию матрикса. В дальнейшем интенсивность биопленкообразования, практически не отличалась от первых суток.

Аналогично вели себя изоляты *Pseudomonas* spp. *и Salmonella* spp. (рис. 2).

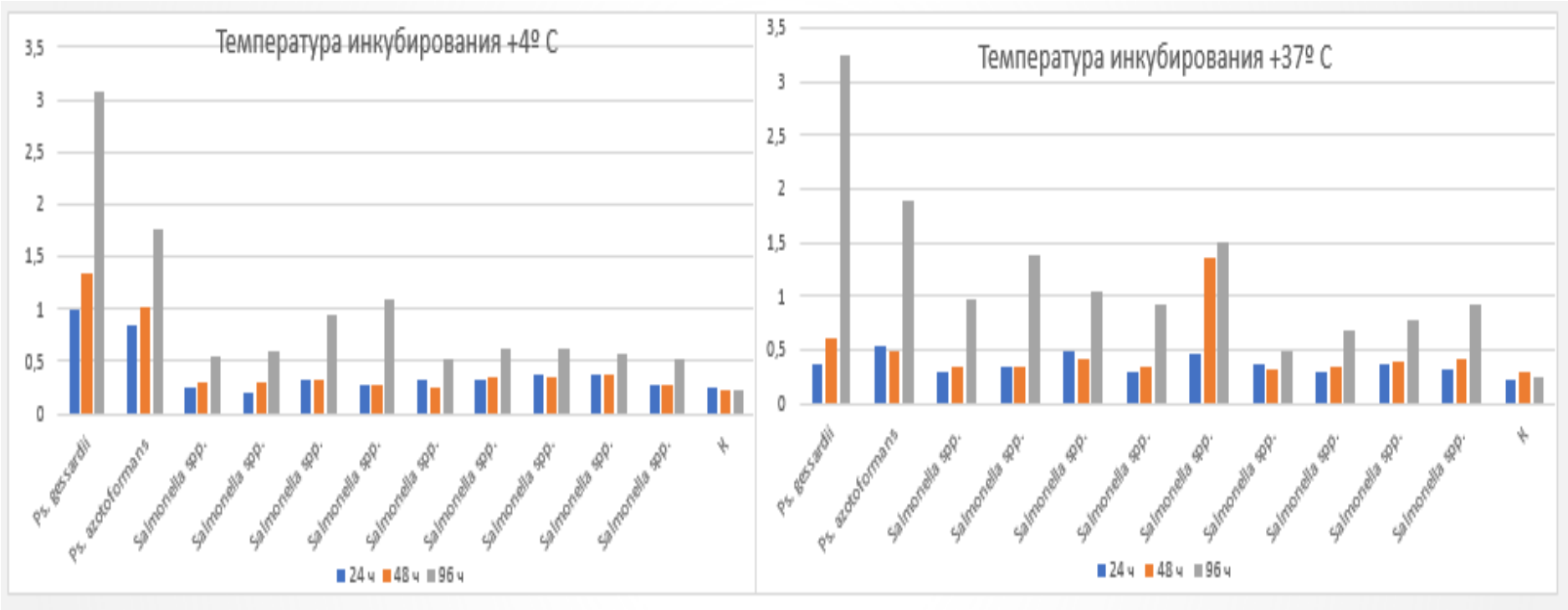


Рисунок 60 - Формирование биопленки изолятами *Pseudomonas spp. и Salmonella spp* в динамике при температуре +4 и +37 ºС.

Проведенный опыт показал, что формирование биоплёнок спустя 96 часов при температуре +4 и +37 ºС практически одинаковое.

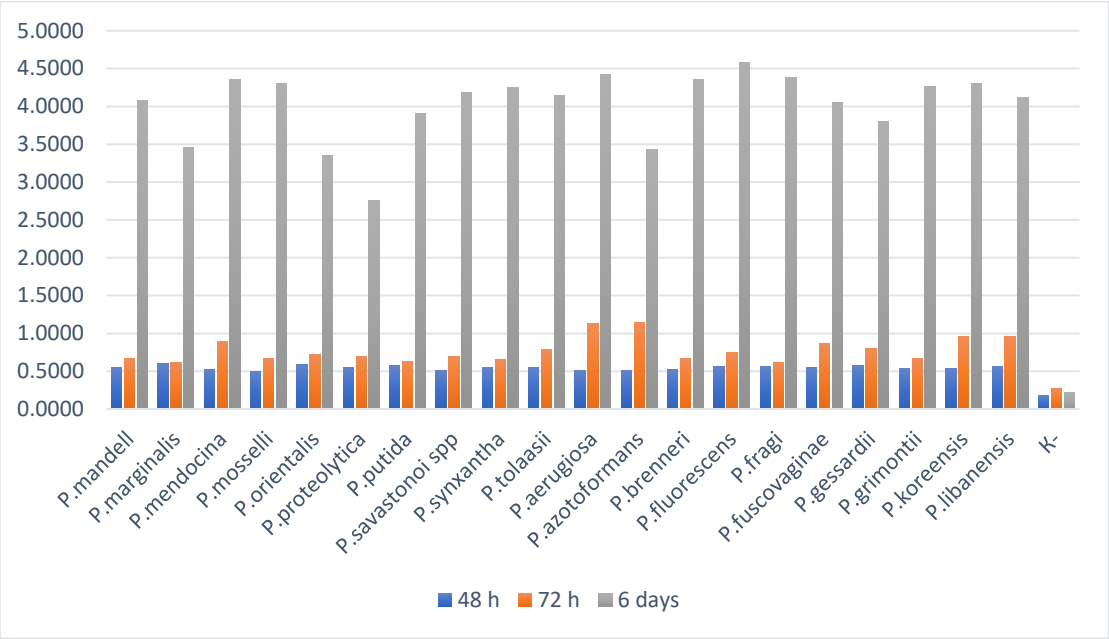


Рисунок 61 а) - Формирование биопленки изолятами *Pseudomonas* spp. в динамике при температуре +10 ºС.

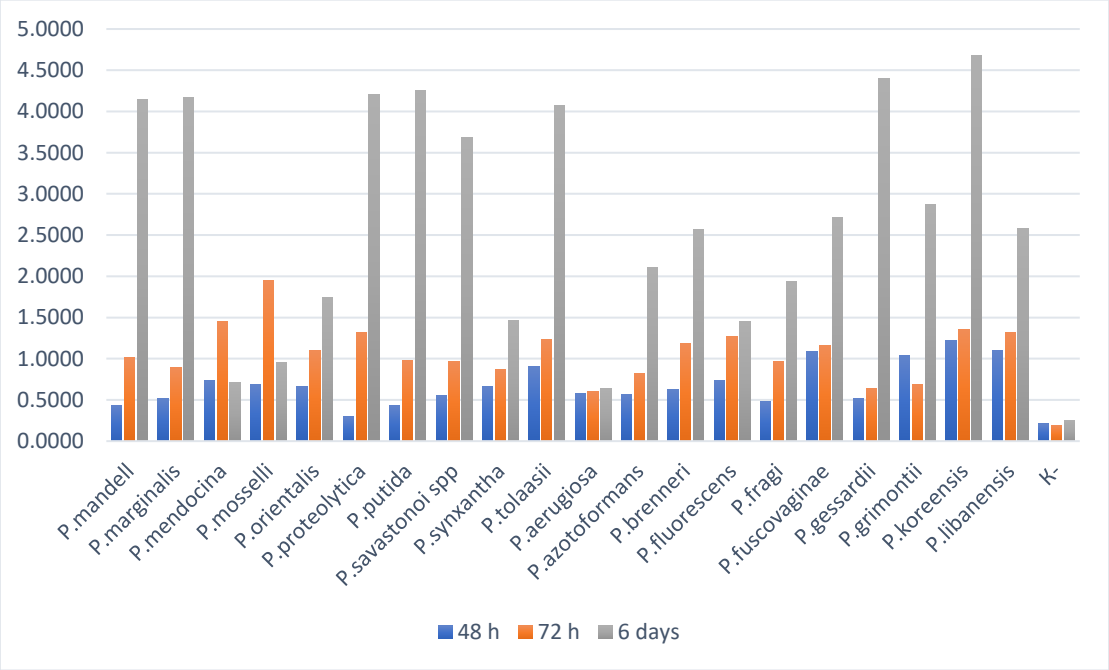


Рисунок 61 б) - Формирование биопленки изолятами *Pseudomonas* spp. в динамике при температуре +25 ºС.

Изоляты *Pseudomonas spp.* проявили высокую способность формирования биопленок. Интересным результатом исследования являлось

то, что спустя 7 суток биопленка, сформированная при температуре +10 ºС сохранилась намного лучше, чем биопленка сформированная при +25 ºС. Частичное разрушение или пролиферация зрелой биопленки — это естественное явление, что и наблюдалось на примере биопленок, растущих при +25ºС. В тоже время, биоплёнки, формирующиеся при низких температурах, оказались более устойчивы и сохранили свою морфологию дольше.

В естественных условиях микроорганизмы редко формируют моновидовые биопленки. В эксперименте было показано, как интенсивно формировались моно- и поливидовая биопленки в динамике (рис. 62).

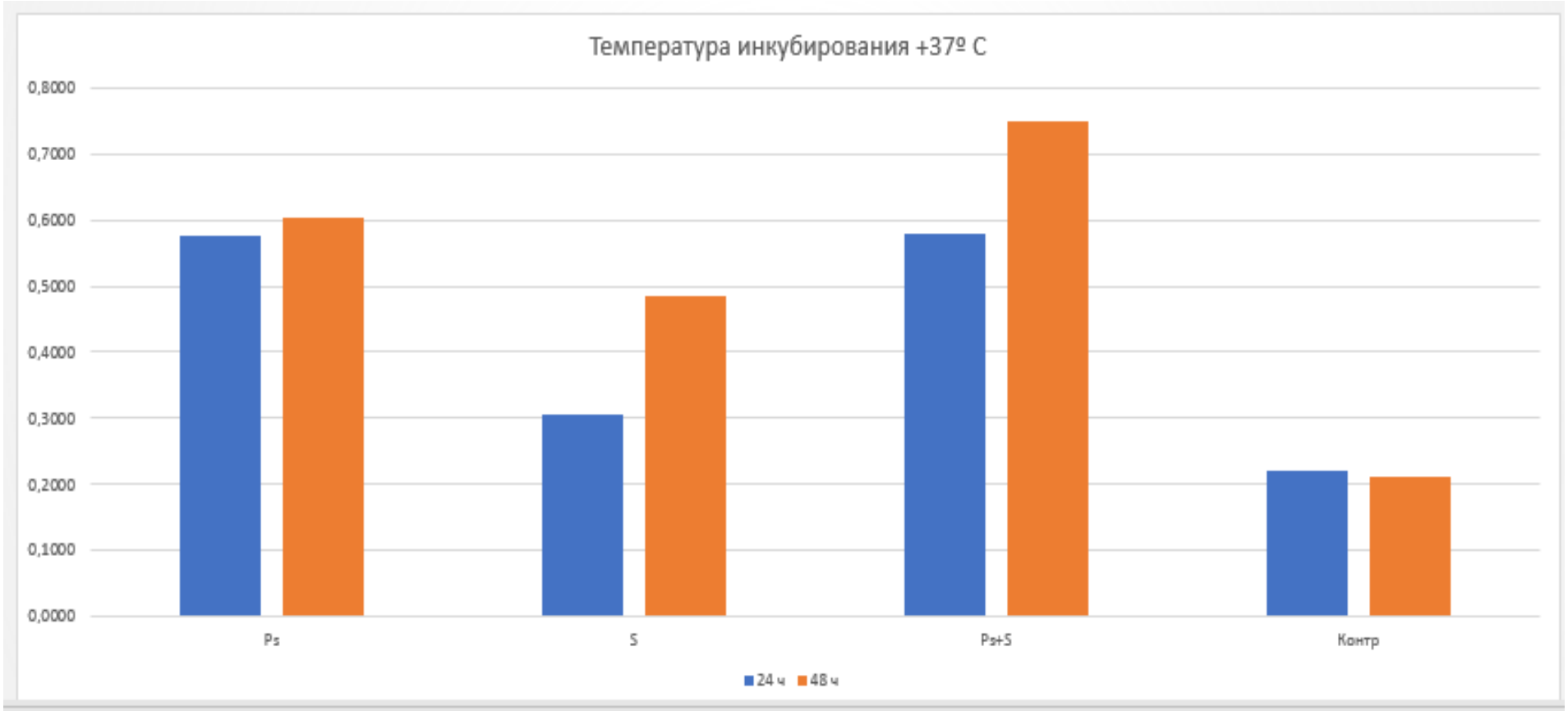


Рисунок 62 – Биопленки, сформированные *Pseudomonas spp. и Salmonella spp.* в отдельности и совместно.

Полученные результаты показали, что совместно *Pseudomonas spp.* и *Salmonella spp.* формировали более интенсивную биопленку, чем каждый микроорганизм по отдельности.

Известно, что биопленки на пищевых предприятиях могут присутствовать на полах, стенах, трубах, а также на поверхности оборудования, включая нержавеющую сталь, тефлон, резину, пластик и стекло. С помощью метода флюоресцентной микроскопии был сделаны снимки биопленок, сформированных микроорганизмами на различных поверхностях (рис. 63 и 64).

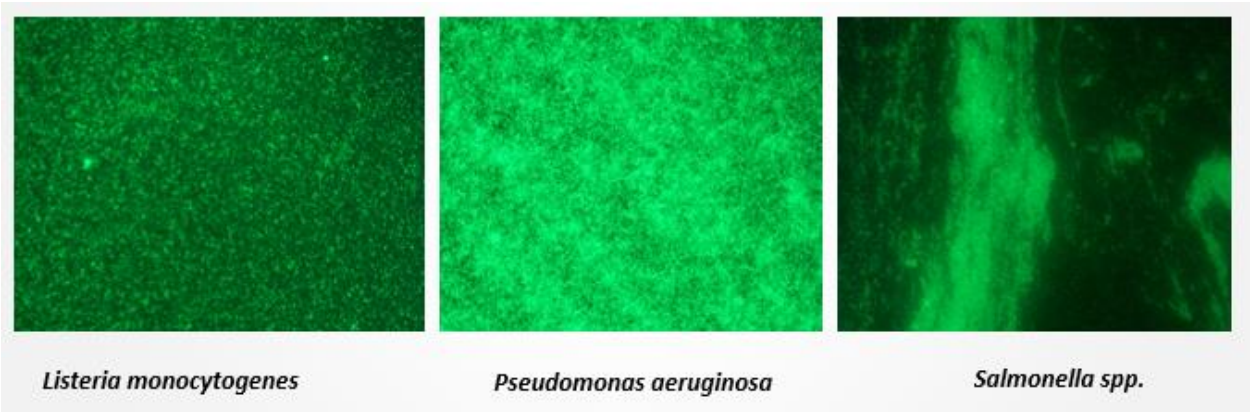


Рисунок 63 - Формирование биопленок на поверхности стекла за 18 часов. Флуоресцентная микроскопия, краситель SYTO©9

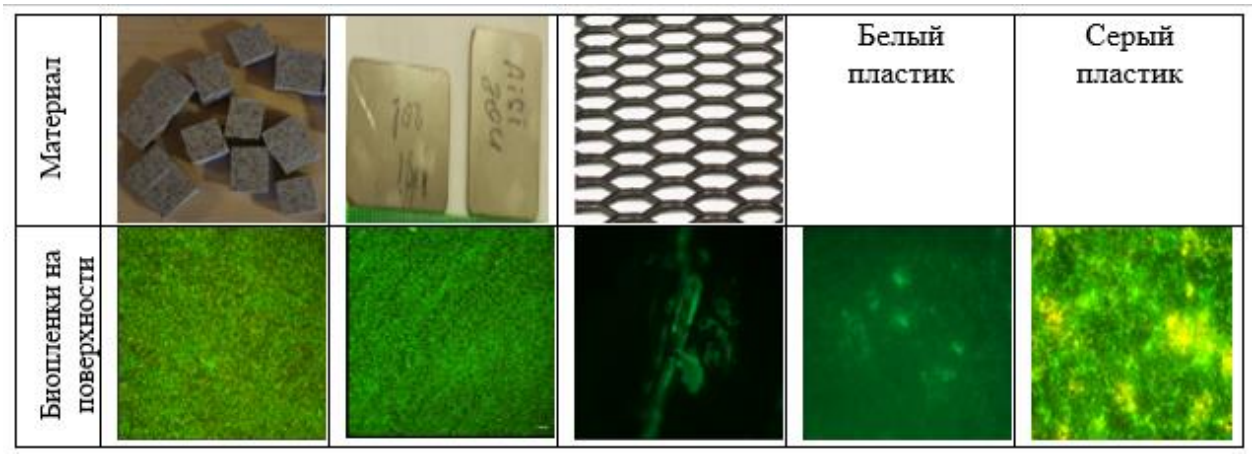


Рисунок 64 - Формирование биопленок бактериями *Listeria monocytogenes* на различных абиотических поверхностях за 24 часа. Флуоресцентная микроскопия, краситель SYTO©9.

Микрофотографии, сделанные с помощью флуоресцентного микроскопа, позволили визуализировать микробное сообщество на различных поверхностях. Краситель SYTO©9 хорошо проникал в бактериальную клетку и окрашивал только ДНК микроорганизмов. Поверхности в зависимости от материала имели разные характеристики. Поверхность кафеля и стали - сравнительно гладкая, а поверхность пластика - рельефная. Но, вне зависимости от материала и характеристик, на всех абиотических поверхностях хорошо формировались биопленки.

Для изучения морфологии бактериальных биопленок самым подходящим инструментом является сканирующая электронная микроскопия (СЭМ). Этот метод позволяет визуализировать практически необработанный – нативный материал. Исследование позволяет сохранить всю структуру биопленки, не обезвоживая и на нарушая матрикс. На рис.7. представлены микрофотографии суточных биопленок.

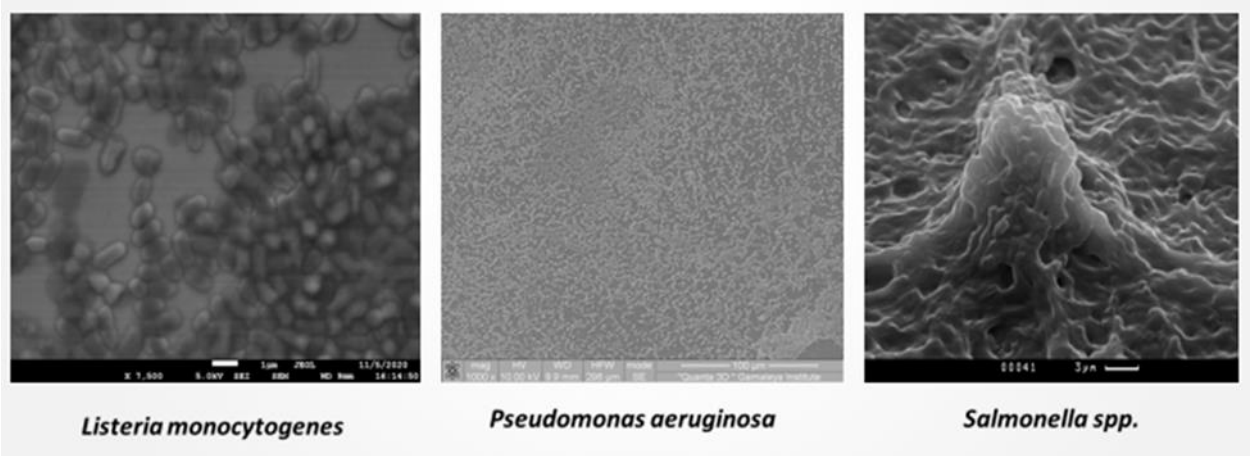


Рисунок 65 - Сканирующая электронная микроскопия биопленок.

Результаты СЭМ полностью сопоставимы с ранее полученными результатами исследований. На полученных фотографиях хорошо видна разница морфологии биопленок различных патогенов. *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella* образовывали плотный слой биопленки с экзоматриксом, в отличие от *Listeria monocytogenes.*

5.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 5

Был исследован таксономический состав и структурная организация пищевых БП (5 образцов), отобранных в разных цехах мясо-перерабатывающего завода с поверхности технологического оборудования и помещений. Хотя БП отбирали в разных местах (разделочные столы, сливной трап, технологическое оборудование, стены), метагеномный анализ показал высокую таксономическую сходность микроорганизмов, доминирующих в разных образцах. Из обнаруженных бактерий (археи не выявлены), относящихся к 11 филумам, доминантными были представители Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmientes, Proteobacteria. Наибольшим разнообразием (согласно индексам видового разнообразия) отличались БП образца 1, отобранного с разделочного стола цеха обработки поступающего сырья. Среди биопленочных контаминантов образцов были обнаружены бактерии, вызывающие порчу мясных, рыбных и молочных продуктов и способные к биопленкообразованию (р.р.Pseudomonas, Flavobacterium, Arcobacter, Vagococcus, Chryseobacterium, Carnobacterium и др.), а также оппортунистические патогенны человека и животных (р.р. Arcobacter, Corinobacteria и др.). Электронно-микроскопические исследования тонких срезов БП согласуются с результатами филогенетического анализа. Было выявлено: (1) разнообразие морфотипов клеток, характерное для смешанных БП, наибольшее в образце 1; (2) морфологическое сходство клеток в БП разных образцов и их микроколониальный рост; (3) возрастную гетерогенность клеток в пределах одной микроколонии с сосуществованием вегетативных и автолизированных клеток, покоящихся форм и, возможно, фенотипа персистеров; (4) гетерогенность химической природы полимерного матрикса по данным окрашивания рутением красным.

Возрастная и фенотипическая гетерогенность биопленочного населения обосновывает необходимость изучения её роли в устойчивости БП к стрессорам, а также для разработки новых подходов и средств для элиминации

толерантных фенотипов патогенов (самих БП, клеток-персистеров, ПФ) для повышения эффективности профилактики биопленкообразования на предприятиях пищевой отрасли.

Сделан вывод, что несмотря на строгое соблюдение мер санитарной обработки и дезинфекции на МПЗ, БП обнаруживались уже через 10-24 часа после мойки и санитарной обработки. Это подтверждало имевшуюся информацию о быстром (в течение несколько часов) образовании БП бактериями как остающимися жизнеспособными после дезинфекции, так и занесёнными [Hall-Stoodley, L., 2004].

В результате проведенных исследований была впервые изучена биоплёночная микробная контаминация абиотических объектов производственной среды пищевого предприятия по сезонам. Установлено значительное биоразнообразие биопленочной микрофлоры, которая включает на ряду с микроорганизмами порчи пищевых продуктов, патогенные микроорганизмы, в том числе редкие. Несмотря на проводимые на предприятии санитарно-гигиенические мероприятия, БП демонстрировали устойчивость к используемым на предприятии средствам дезинфекции.

Отличительными чертами проведенного исследования были: расширение спектра точек отбора образцов БП, включая нетривиальные и не подвергаемые ежедневной санитарной обработке места (потолок, ступень, колеса, ролики транспортеров, помещения с температурой ниже 0ºС); микроскопическая оценка (ПЭМ) БП, степени их зрелости и функциональной активности (развитость матрикса, биоразнообразие морфотипов бактерий, их возрастная гетерогенность); сравнительный анализ структуры БП по сезонам. Исследование и анализ бактериальной контаминации предприятия позволил сделать следующие выводы.

1) В таких тривиальных местах отбора, как сливные трапы или оборудование биоплёнки не были обнаружены, отобранные образцы представлены органическим материалом с очень редким заносом клеток. Отсутствие БП в трапах канализационной системы свидетельствовало о х

Важным было обнаружение моновидовой (по морфотипу клеток) БП в образце, взятом со стены в помещении с температурой ниже 0ºС и обнаружение в этом образце патогенного микроорганизма. Это ставит вопрос о биоплёночном развитии психрофильной пищевой микробиоты, среди которой встречаются патогены, и необходимости усиления санитарной обработки на этих участках и их включении в перечень мест систематического микробиологического анализа.

Описано 19 образцов БП с птицеперерабатывывающего комбината (ППК), отобранных в разные сезоны: низкотемпераурный (зимний), жаркий (летний), переходный (осенний). В большинстве проб из общеизвестных (стены, трапы) и нетрадиционных (потолки, конвейер, подвижный транспорт) местобнаружены БП, или в стадии формирования или зрелые, состоящие из бактерий и матрикса. Сделан вывод о высококачественной дезинфекции на исследованном ППК в традиционных местах (трапах, оборудовании), и необходимости её усиления в местах нетрадиционных – потолках, стенах тоннеле охлаждения. Подтверждена важность применения электронной микроскопии для детекции и выявления структуры БП.Выявлена зависимость структуры и состава БП от сезона (БП на роликах конвейера, колесах тележек, мостках, стене тоннеля охлаждения). На стене коридора охлаждения в летнее время выявленмикроорганизм, схожий с возбудителем боррелиоза. В целом метод детекции наличия БП с применением электронной микроскопии малочувствителен для изучения сезонных изменений в БП.

Проведённые эксперименты показали, что все 48 микроорганизмов, которые были выделены из объектов производственной среды, были способны формировать биопленки. Более того, они хорошо адаптированы к условиям производственной среды предприятий с температурой +4 ºС.

Вышеописанные результаты экспериментов полностью совпадают с общепринятыми представлениями в науке о бактериальных биопленках. Микроорганизмы, выделенные из производственной среды, были хорошо

адаптированы к условиям этой среды, и, в состоянии биопленок, они хорошо сохраняли жизнеспособность.

Таким образом, все штаммы *L.monocytogenes*, выделенные с объектов производственной среды, обладали способностью к биопленкообразованию. Способность штаммов формировать биопленки *in vitro* на поверхности различных материалов, свидетельствовала об их возможности колонизировать объекты производственной среды и являться причиной последующей контаминации готовой продукции.

Штаммы, выделенные с объектов производственной среды, проявляли способность к биопленкообразованию как при низких положительных температурах, так и при комнатной температуре. Некоторые штаммы проявляли свою активность в большей степени при низких положительных температурах, в то время как в оптимальных условиях для роста планктонной культуры эти свойства были выражены в меньшей степени.

Интенсивное образование биопленок при низких положительных температурах наблюдалось в первые сутки жизнедеятельности. Очевидно, активная выработка биопленкообразующего матрикса бактериями при низких положительных температурах необходима в качестве защиты от неблагоприятного внешнего воздействия. В дальнейшем, не происходило значительного увеличения биопленок. В некоторых случаях наблюдалось снижение этой способности.

Полученные результаты представляют интерес для разработки методов контроля санитарного состояния предприятий мясной и птицеперерабатывающей промышленности. В практическом аспекте полученные данные позволять определить и разработать совершенно новые подходы к выявлению причин устойчивой циркуляции патогенов на пищевых предприятиях с целью снижения риска контаминации продуктов и дальнейшего предотвращения распространения токсикоинфекций.

ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ МОНО- И ПОЛИВИДОВЫХ БИОПЛЕНОК, СФОРМИРОВАННЫХ ПИЩЕВЫМИ ПАТОГЕНАМИ И САПРОТРОФАМИ К ВОЗДЕЙСТВИЮ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ, ПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ И ФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДОВ

Разработка эффективных методов и средств борьбы с биопленкообразованием, в том числе на пищевых производствах особенно актуальна в силу устойчивости БП к биологическим (антибиотики) и небиологическим токсикантам (дезинфектантам), физическим факторам (УФ и др.) (Bergh al., 2016). В настоящее время оценка эффективности наиболее часто используемых дезинфицирующих средств на пищевых производствах проводится относительно планктонных форм микроорганизмов. На данном этапе работы была изучена эффективность некоторых промышленных дезинфектантов в отношении биопленок микроорганизмов.

Также были изучены перспективные физические методы предотвращения распростаранения биопленочного роста и оценены антибактериальные полимерные комплексы в качестве превентивных подходов в борьбе с биопленками.

Работы выполнялись в Лаборатории лазерной нанофизики и биомедицины Физического института им.П.Н. Лебедева РАН (физические методы воздействия (метод лазерной абляции и ИК-лазер)) и на кафедре высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ(создание полимерных комплексов).

6.1 Исследование устойчивости биопленок к воздействию дезинфектантов

Исследовали устойчивость к следующим дезинфектантам – OXY , ДИМАКС хлор, БФР Биоцид Энзим (описание приведено в главе 2.2 Методология и методы исследования).

Учитывая полученные данные и то, что в БП бактерии более устойчивы к стрессорам, с Фудлекс ОХУ сразу была взята концентрация в 4 раза больше рекомендованной. На «молодые» (2 сут) БП дезинфектант практически не оказывал действия. Время воздействия не влияло на снижение численности выживших клеток бактерий в БП как для монокультур, так и для бинарной культуры. А «старые» (9сут) БП оказались чуть более чувствительными к действию выбранной концентрации. Чувствительность *E. coli* при биоплёночном росте к Фудлекс ОХУ была в 2 раза выше именно в 9-суточной БП независимо от времени воздействия (рис. 67). *S. aureus* при 30-минутном воздействии дезинфектантом в «старой» БП был почти в 20 раз чувствительнее, чем при аналогичном воздействии на «молодую» БП. Что свидетельствовало о роли метаболизма в защите.

Надо отметить, что бинарная БП (2-х- и 9-тисуточная), несмотря на чувствительность к дезинфектанту отдельных составляющих при росте в моноплёнках (рис. 66), в целом оказалась более устойчивой, чем моно-БП.

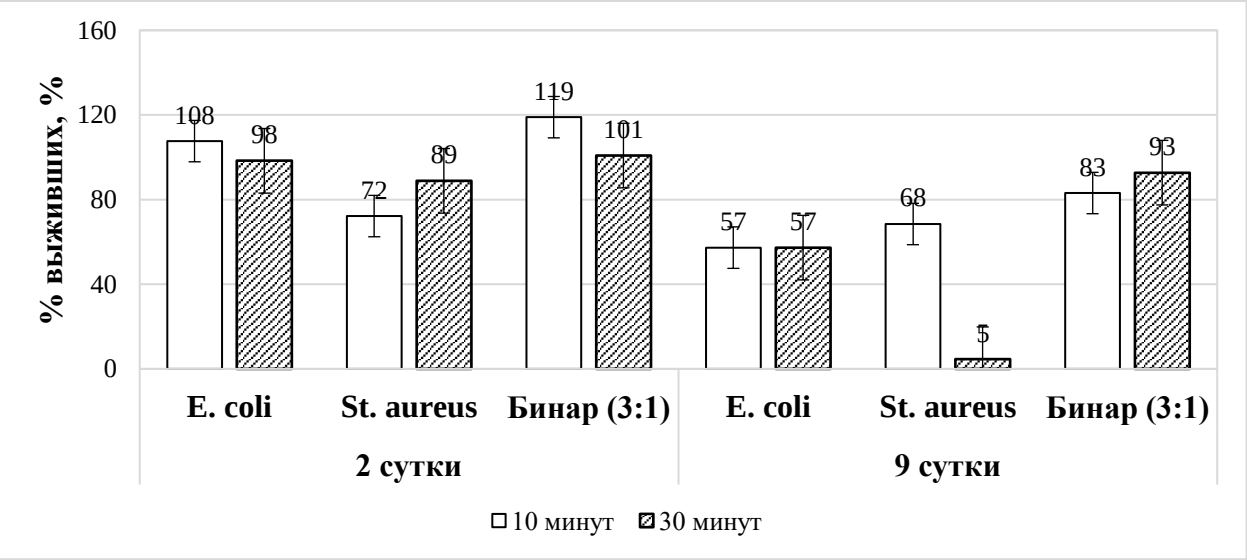


Рисунок 66 -Действие дезинфектанта Фудлекс ОХУ в концентрации 0,2% на выживаемость БП возрастом 2 и 9 суток.

Действие ДИМАКС Хлор в концентрации в 4 раза выше рекомендованной на БП оказалось крайне интересным. Чувствительность «молодой» БП *E. coli* к дезинфектанту была зависима от времени воздействия:

при 10-минутном воздействии выживаемость клеток была ожидаемо почти в 4 раза выше, чем при 30-минутном воздействии (рис. 67). При этом, при воздействии на «старую» БП выявили почти полное стерилизующее действие.

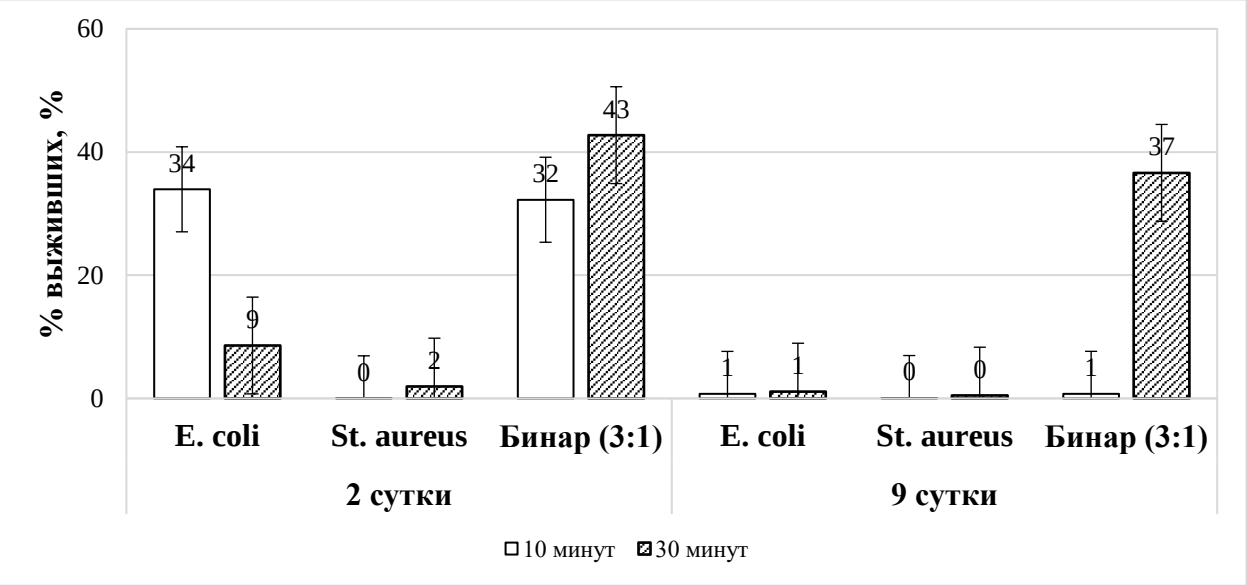


Рисунок 67 -Действие дезинфектанта ДИМАКС хлор в концентрации 0,152% на выживаемость бактерий в БП возрастом 2 и 9 сут.

S. aureus при биоплёночном росте оказался крайне чувствителен к действию ДИМАКС хлор, (рис. 67). Наиболее интересный эффект после воздействия дезинфектанта наблюдали для бинарной БП. При 10-минутном воздействии, как на 2-х, так и на 9-ти суточную БП, выживаемость клеток была выше после 30-минутного воздействия. Причём, если для «молодой» БП эта разница была незначительная (1,5 раза), то для «старой» – от полного стерилизующего эффекта (0%) при 10-минутном воздействии до почти 40% выживших клеток при 30-минутном воздействии. Возможно, это связано со способностью клеток в бинарной БП к репарации после кратковременного стрессового воздействия.

БФР Биоцид Энзим в выбранном широком диапазоне концентраций (от 0.125% до 0.5%), эффективных против жидких культур, не оказывал какого-либо существенного действия на выживаемость клеток в моно- и бинарной БП как при кратковременном воздействии (10 мин), так и при более длительном (30 мин). При самой высокой концентрации дезинфектанта (0.5%) самой

чувствительной была 9-тисуточная БП *S.aureus* – выживаемость клеток снизилась до 8% от контроля (рис. 68).

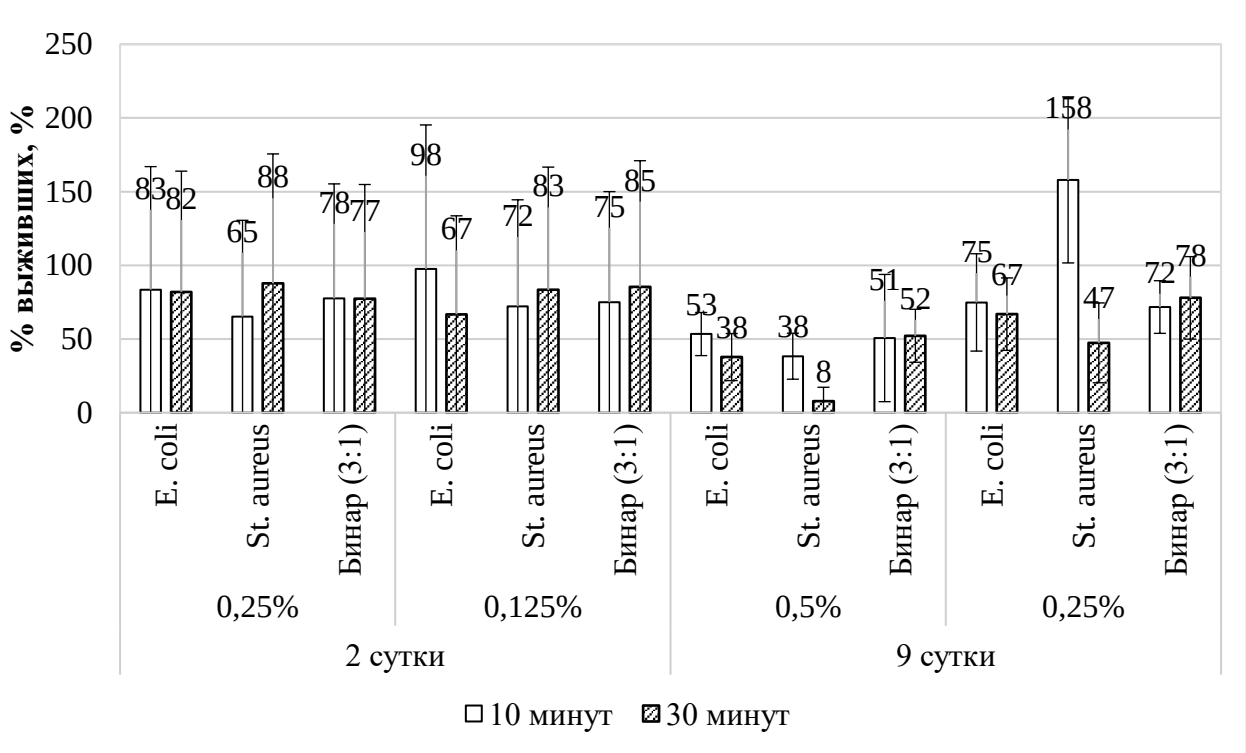


Рисунок 68-Действие дезинфектанта БФР Биоцид Энзим в концентрациях 0,5, 0,25 и 0,125% на выживаемость БП на 2 и 9 сутки.

6.2. Исследование антибактериальных и антибиопленочных свойств физических методов

С учетом того, что БП микроорганизмов образуются на поверхностях технологического, вспомогательного оборудования, а также различных конструкциях, в том числе, на стенах, на потолке, в технологических трапах, системах кондиционирования, а также то, что микроорганизмы в их составе обладают устойчивостью к применяемым дезинфектантам, на следующем этапе работы исследования были направлены на апробацию новых подходов в дезинфекции объектов производственной среды.

Особый интерес представляли антибактериальные наночастицы. Именно наночастицы металлов обладают большим потенциалом и

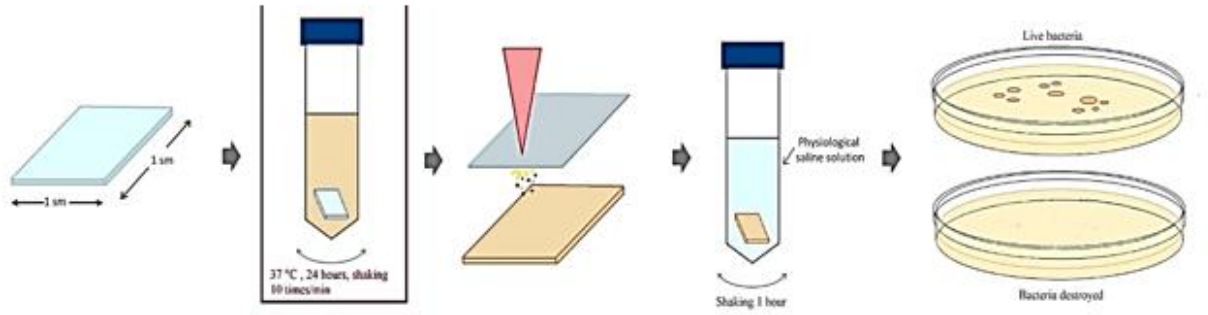
превосходят обычные антибиотики и дезинфектанты по механизму действия [Fernando, S., 2018]

Возможность обработки труднодоступных мест является одним из преимуществ для дальнейшего использования на пищевых предприятиях. Такими возможностями обладают полимерные комплексы, которые могут быть использованы в качестве покрытий. Такими же свойствами обладает и другой перспективный физический метод -метод спектрально-селективной ИК-лазерной инактивации В последние годы появились научные сообщения, что воздействие лазерных импульсов на патогенные микроорганизмы показывают высокую эффективность. В отличие от других существующих методов дезинфекции (УФ, гамма, микроволновое облучение) он не имеет побочных эффектов. Механизм, лежащий в основе этого процесса, известен как импульсное стимулированное комбинационное рассеяние света и включает индуцированное лазером возбуждение низкочастотных акустических колебаний. Для бактерий релаксация происходит за счет сверхзакручивания спиральной ДНК, которая убивает бактерии. Инфракрасное излучение может денатурировать функциональные белки в бактериальных клетках, разрушая водородные связи, ответственные за стабилизацию вторичных и третичных структур [Hamanaka, D., 2006].

6.2.1 Сравнительное исследование антибактериальных и антибиопленочных свойств НЧ серебра, золота и меди, полученных методом лазерного переноса

На образцах стали, пластика, тефлона и керамической плитки, были сформированы БП *Staphylococcus aureus*. Напыление НЧ серебра, меди и золота на сформированные бактериальные БП осуществляли с помощью волоконного наносекундного лазера HTF MARK (Булат) на ионах Yb3+ (длина

волны: 1064 нм, длительность импульса на полувысоте: 120 нс, максимальная энергия в импульсе: 1мДж, частота повторения импульсов до 80 кГц).



I II III IV V

Рисунок 69 - Схема (этапы) проведения эксперимента по лазерному переносу НЧ металлов на бактериальные БП.

I - подготовка подложек; II - формирование бактериальной БП; III - лазерный перенос НЧ металлов на подложки с БП; IV - смыв с подложек бактериальной культуры для проведения серийных разведений; V - подсчёт бактериальных колоний для определения КОЕ/мл. Работы выполнялись в Физическом институте им П.Н. Лебедева РАН

Проведенные исследования показали высокую эффективность использования метода лазерного переноса НЧ металлов серебра и меди на поверхности бактериальных БП, сформированных на различных поверхностях микроорганизмами *Staphylococcus aureus*. В результате воздействия НЧ серебра и меди практически полностью подавлялся их рост. Подавление роста микроорганизма только на два порядка на пластике №2 было, очевидно, связано с сложным рельефом объекта. НЧ золота не обладали антибактериальными свойствами.

Таблица 46 - Антибактериальное воздействие НЧ металлов на БП, сформированные на различных поверхностях.

Материал		Наночастицы металлов			Контроль *Staphylococcus aureus КОЕ/мл*
		Ag	*Cu*	*Au*	
	Металлическая сетка	1	0	0	$9X10^3$
	Пластик 1	0	0	$1X10^5$	$2X10^5$
	Пластик 2	$1X10^3$	9	$1X10^6$	$4X10^5$
	Тефлон	4	0	$4X10^4$	$3X10^4$
	Керамическая плитка	0	4	$3X10^5$	$5X10^5$

Для установления зависимости антибактериальных свойств НЧ металлов от толщины металлической пленки, используемой для их получения, были проведены исследования воздействия НЧ металлов, полученных из металлических пленок различной толщины на БП *Staphylococcus aureus, Salmonella spp., Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli и Listeria monocytogenes* (Табл. 47, 48).

Проведенные исследования показали, что толщина металлической пленки, с которой получали НЧ незначительно влияла на их антибактериальные свойства. Как и в предыдущем опыте, НЧ серебра и меди проявили высокую токсичность по отношении к пищевым патогенам. В то же время НЧ золота были абсолютно инертны.

Метод аппликационного лазерного переноса НЧ металлов серебра и меди на поверхности БП - является эффективным методом инактивации БП, сформированных патогенными микроорганизмами. В результате воздействия полностью уничтожались БП независимо от степени их зрелости .

Таблица 47 – Антибактериальное воздействие переносимых серебра из пленок металлов серебра различной толщины на биопленки микроорганизмов выраженное в КОЕ/мл.

Штаммы микроорганизмов	25 нм	40 нм	70 нм	100 нм	Контроль
Ps. aeruginosa	0	0	0	0	10^8
St. aureus	0	0	0	0	10^8
Escherichia coli	0	0	0	0	10^8
Listeria monocytogenes	0	0	0	0	10^7
Salmonella spp	0	0	0	0	10^8

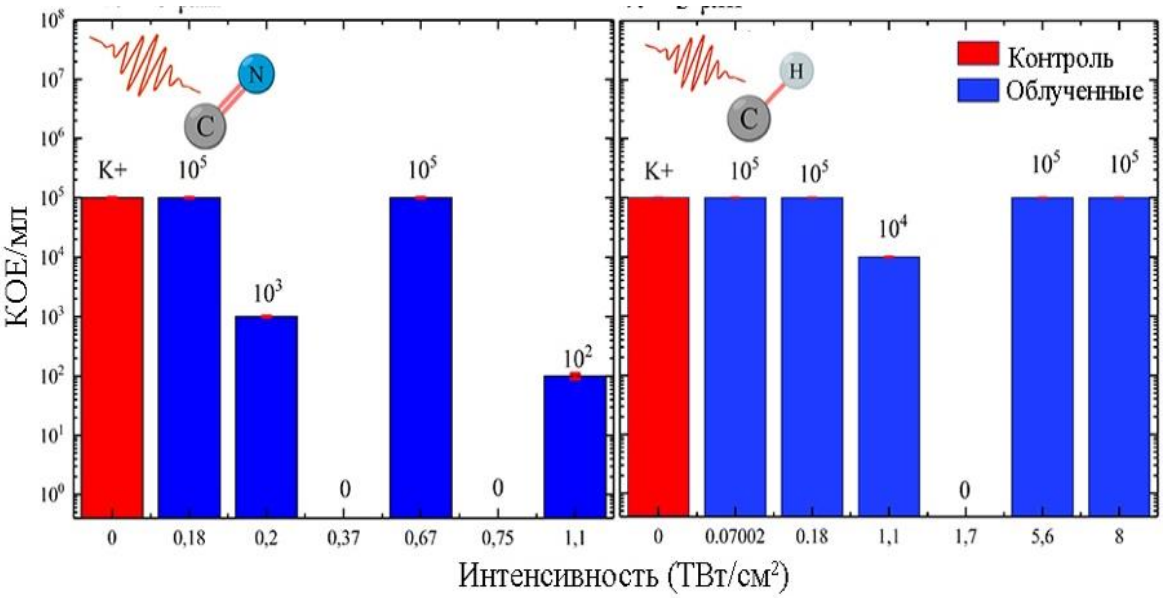
Таблица 48 – Антибактериальное воздействие переносимых наночастиц из пленок металлов золота различной толщины на биопленки микроорганизмов выраженное в КОЕ/мл.

Штаммы микроорганизмов	25 нм	40 нм	70 нм	100 нм	Контроль
Ps. aeruginosa	10^7	10^7	10^8	10^7	10^8
St. aureus	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7
Escherichia coli	10^7	10^7	10^8	10^7	10^8
Listeria monocytogenes	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7
Salmonella spp	10^6	10^7	10^8	10^7	10^8

6.2.2 Исследование антибактериального воздействие селективного ИК-лазера

Для проведения исследований, штамм *Pseudomonas aeruginosa*, выделенный с объектов мясоперерабатывающего предприятия (бульонная культура в объеме 1 мл) осаждали на дно пробирки с помощью центрифугирования, убирали супернатант и добавляли фильтрованную, стерильную дистиллированную воду. Далее пробирку интенсивно встряхивали и методом серийных разведений разводили до $1x10^5$ КОЕ/мл.

Полученную культуру наносили на подложки, подсушивали на воздухе и воздействовали ИК-лазером[11]. После подложку переносили в стерильные пробирки с физиологическим раствором и стандартными микробиологическими методами определяли КОЕ/мл. Результаты



проведенных опытов приведены на рис. 70.

Рисунок 70 - Выживаемость P. aeruginosa под воздействием ИК-лазера в области 3 (справа) и 6 (слева) мкм. K+ — контрольный образец

Пороговое значение интенсивности излучения, при котором становилось очевидным уменьшение количества КОЕ, было оценено как 0.3±0.1 ТВт/см2 при длине волны 6 мкм.(рис.70 слева).

Напротив, для образцов P. aeruginosa, облученных фемтосекундным лазерным излучением на длине волны 3 мкм, изменения количества КОЕ были довольно незначительными до 1.4±0.3 ТВт/см2 (рис. 70, справа).

---

[11] Материал, изложенный в данном разделе, опубликованы в статье:Combatting bacterial biofilms and bacterial plankton for medicine and food industryvia laser nanotechnology / A. A. Ionin, S. A. Gonchukov, S. I. Kudryashov [et al.] // Advanced Laser Technologies ALT`21: Book of abstracts the 28th International Conference, Moscow, 06–10 октября 2021 года. – Moscow, 2021; Spectrally-selective mid-IR laser-induced inactivation of pathogenic bacteria / V. Kompanets, S. Shelygina, E. Tolordava [et al.] // Biomedical Optics Express. – 2021. – V. 12. – № 10. – P 6317-25. – DOI 10.1364/BOE.434969. Q1, IF 3.732 (поWoS).

Эффективность воздействия ИК излучения в диапазоне 6 мкм связана с селективным воздействием на амидные группы нуклеиновых кислот, что предположительно разрушает системы водородных связей и изменяет вторичную и третичную структуры полипептидов.

6. 3 Исследование антибактериальных и антибиопленочных свойств поликатионных полимеров

Поликатионные полимеры способны взаимодействовать с патогенными клетками, вызывая их гибель; формируют гидрофобные области, что обеспечивает связывание с поверхностями и приводит к формированию прочной пленки.

Химические формулы использованных полимеров приведены в главе объекты исследований. Полимеры были использованы для приготовления полимерных растворов (рецептур) с концентрацией полимера 2 вес.%. Растворы полиэлектролитов представляли собой прозрачные растворы, бесцветные или с желтоватым оттенком.

На первом этапе было изучено влияние 7 полимерных комплексов на бактерии, находившиеся в планктонном состоянии. Результаты исследования антимикробной активности полимеров в отношении штаммов *L. monocytogenes* и *P. aeruginosa*, выделенных из объектов производственной среды, представлены на рис. 71 и 72.

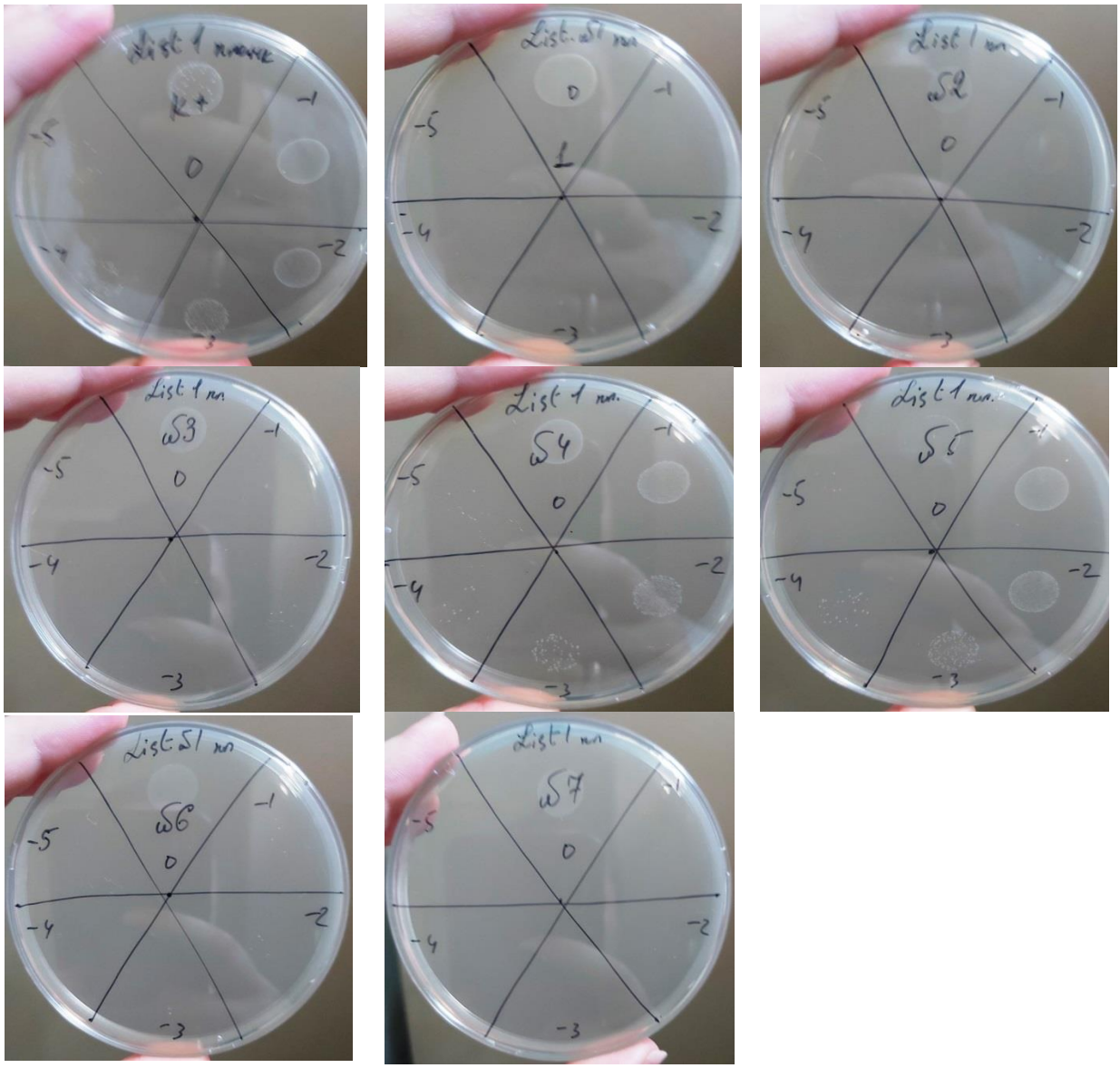


Рисунок 71 - Рост *L. monocytogenes* после воздействия полимеров (№1-№7). Время инкубации - 24 часа

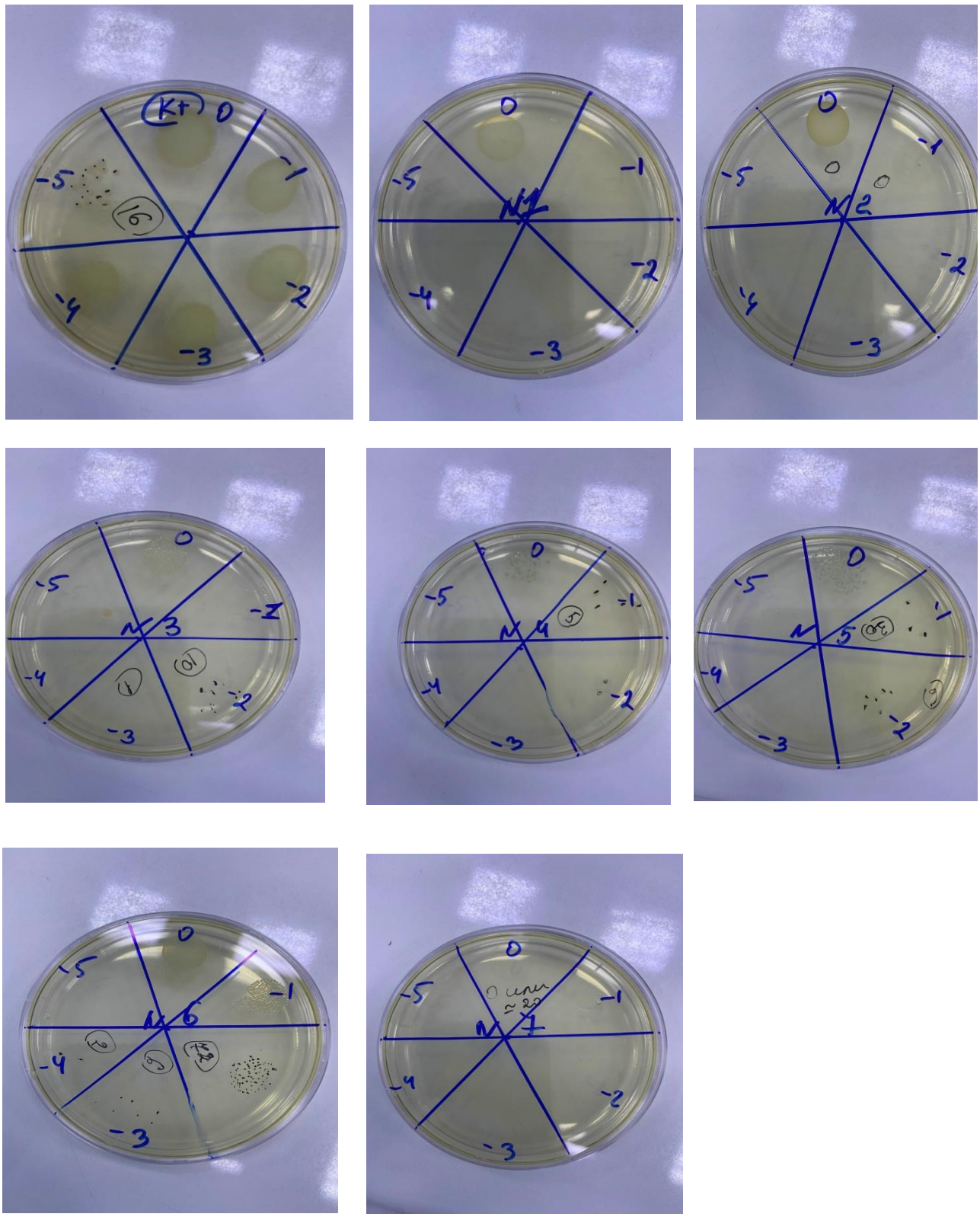


Рисунок 72 - Рост *P. aeruginosa* 147 после воздействия полимеров (№1-№7). Время инкубации - 24 часа.

После подсчета количества КОЕ на чашках Петри был произведен пересчет выросших клеток на 1 мл (табл. 49).

Таблица 49 - Подавление бактериального роста полимерами.

	Количество бактериальных клеток, КОЕ/мл, выросших в среде с добавлением образцов полимеров							
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	К+
L.monocytogenes	0	0	0	$3,0x10^6$	$1,0x10^6$	0	0	$5,0x10^7$
P.aeruginosa	0	0	$3,3x10^4$	$1,7x10^3$	$2,0x10^4$	$2,3x10^5$	0	$8,0x10^7$

Полимеры по-разному проявляли свое действие на *L. monocytogenes и P. aeruginosa*. Выраженную антимикробную активность по отношению к двум микроорганизмам показали образцы полимеров №1, №2 и №7 (катионные полимеры). Было установлено, что пять (№1, №2, №3, №6 и №7) из семи полимеров проявляли антимикробное действие на *L. monocytogenes.*

Поскольку полимеры обладали положительным зарядом, то их антибактериальное воздействие на *P. aeruginosa* было более выраженным.

Максимальную антимикробную активность по отношению к *P. aeruginosa* проявили образцы полимеров №1, №2 и №7. У остальных образцов антимикробная активность в отношении этого микроорганизма была менее выраженной. Снижение количества клеток *P. aeruginosa* происходило на 2-3 порядка по сравнению с контролем, что в свою очередь свидетельствовало об угнетении роста исследуемой культуры, и, следовательно, проявлению антимикробного действия. Анионные полимеры (№4-6) обладали менее выраженным бактриальным воздействием, что может быть связано с тем, что микроорганизмы обладают в большинстве случаев ярко выраженным отрицательным поверхностным зарядом (например, *P. aeruginosa*).

На следующем этапе работы была изучена возможность использования полимеров с антибактериальными свойствами в качестве покрытия, предотвращающего биопленкообразование. На опытные подложки (стекло) наносили плотный слой полимеров. Далее наносили культру *L. monocytogenes* и после инкубации культуры в течение 18 часов, делали смывы для

определения количества выросших клеток. Однако роста *L. monocytogenes* в смывах с поверхности предметных стекол не наблюдалось (табл. 50).

Таблица 50- Подавление полимерами формирования бактериальной пленки *L. monocytogenes*

	Количество бактериальных клеток, КОЕ/мл, выросших при воздействии образцов полимеров							
	№1	№2	№3	№4	№5	№6	№7	К+
L.monocytogenes	0	0	0	0	0	0	0	$4x10^7$

Результаты эксперимента свидетельствовали о том, что бактериальные клетки не смогли прикрепиться к поверхности стекла, а, значит, бактериальная пленка не сформировались. В ранее проведенных опытах было показано, что адгезия и формирование пленки *L. monocytogenes* начинается уже через 4 часа.

При визуализации живых и мертвых клеток на поверхности исследуемых образцов были получены результаты, которые продемонстрированы на рис. 73. В качестве контрольного образца (К) в опыте использовали чистое стекло без полимера.

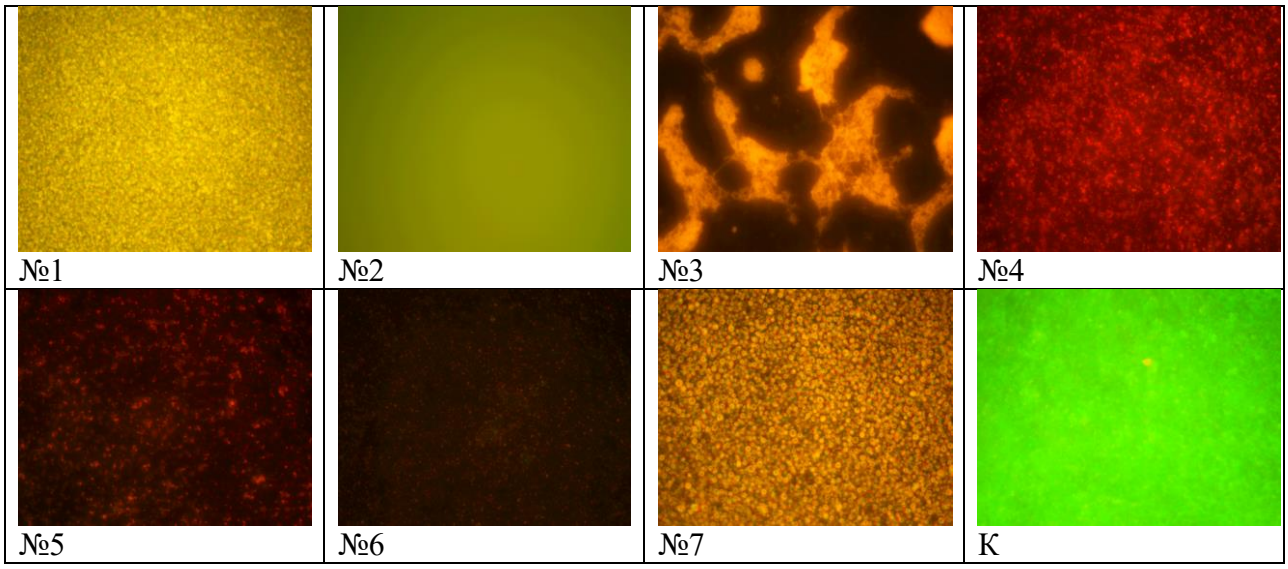


Рисунок 73 – Визуализация воздействия образцов полимеров (№1-7) на *L. monocytogenes*. Флуоресцентная микроскопия с использованием набора красителей Live/Dead.

Проведенные микроскопические исследования показали, что, в отличие от контрольного образца, на поверхности опытных подложек (стекол) не были

обнаружены живые клетки бактерий. Флуоресценция клеток от красного до оранжево-желтого цвета свидетельствовала о том, что бактериальные клетки после контакта с поверхностью погибали. На образце №2 не визуализировалась характерная морфология бактериальных клеток. Это могло быть связано с тем, что на обработанной поверхности микробы не прикрепились. Полученные результаты позволили заключить, что полимерные комплексы обладают антибактериальными свойствами и могут быть использованы как защитные покрытия.

6.4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ГЛАВЕ 6

Применение наиболее часто используемых на пищевых производствах дезинфектанов в обычных концентрациях неэффективно против биопленочного сообщества. Против моновидовых (но не поливидовых) БП был эффективен только ДИМАКС хлор (при 30-минутной обработке) в 4-кратной концентрации. Обнаружено явление быстрого восстановленеия жизнеспособности клеток в составе биопленок, обработанных препаратом ДИМАКС хлорхлор, что обусловливает необходимость улучшения процедур дезинфекции на МПЗ (использование новых антисептиков, расширение мест обработки), а также методик оценки эффективности дезинфекции (увеличение времени после обработки для отбора образцов на анализ).

Метод аппликационного лазерного переноса НЧ металлов серебра и меди на поверхности БП - является эффективным методом инактивации бактериальных пленок, сформированных патогенными микроорганизмами. В результате воздействия полностью уничтожается бактериальная БП независимо от степени зрелости и не зависимо от поверхности, на которой биопленка была сформирована.

Были показано, что ИК-лазерной воздействие обладает выраженной инактивацией микроорганизмов, что предположительно связано с разрушением системы водородных связей и соответствующим изменением вторичной и третичной структуры полипептидов.

Был сделан вывод о том, что полимерные комплексы обладают антибактериальными свойствами, как в отношении планктонных форм так и биопленок, при чем катионные полимеры обладали более выраженными свойствами и могут быть использованы как защитные покрытия.

ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА СХЕМЫ РЕИНЖИНИРИНГА ПРОЦЕДУР ОБЕСПЕЧЕНИЯ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

В результате проведенной работы показана и научно обоснована необходимость изменения подходов к обеспечению гигиены микробиологической безопасности на предприятиях мясной и птицеперерабатывающей промышленности. В этой связи, была сформулирована, концептуально обоснована и разработана схема реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности пищевых предприятий.

До недавнего времени термин «реинжиниринг» применялся только в социальной и управленческой сферах. ГОСТ Р 57700.3-2017 «Численное моделирование динамических рабочих процессов в социотехнических системах. Термины и определения» дает следующее определение:

«реинжиниринг процесса (business process reengineering): Фундаментальное переосмысление и радикальное перепроектирование модели процесса, затем самого процесса с последующим внесением изменений в бизнес-процесс для достижения существенных улучшений в ключевых показателях деятельности организации».

Применение этого термина процессам обеспечения микробиологической безопасности в настоящее время представляется чрезвычайно своевременным, поскольку традиционно существовавшая практика применения гигиенических процедур на пищевых предприятиях требует, в свете полученных новых знаний о микробных сообщества, радикального переосмысления и перепроектирования. Исходя из этого, в настоящей работе был предложен новый термин:

реинжиниринг процедур обеспечения микробиологическиой безопасности пищевого производства (предприятия) - Фундаментальное переосмысление и радикальное перепроектирование санитарно-гигиенических процедур на пищевом предприятии на основе расширенного

микробиологического профилирования производственной среды с последующим внесением изменений в программы мойки и дезинфекции для достижения нового уровня микробиологической безопасности выпускаемой продукции.

Как следует из предложенного определения, в концептуальной основе предложенного реинжиниринга лежит методология проведения расширенного микробиологического профилирования пищевого предприятия для детализации циркулирующих микроорганизмов, в том числе в составе БП. Структурно схема реинжиниринга представлена на рис…..

Выполнение реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности подразумевает практическую реализацию следующих шагов:

Шаг 1. Определяют наличие проблем на предприятии и анализируют целесообразность проведения реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности.

Идентификация проблем микробиологического характера на предприятии и анализ целесообразность проведения реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности являются ключевым моментом для инициализации комплекса работ. О наличии проблем микробиологического характера судят по:

- частым случаям возврата продукции из торговой сети в результате порчи и/или несоответствия микробиологических показателей, в том числе выявления патогенных микроорганизмов;

- обнаружение в ходе производственного контроля несоответствий продукции по органолептическим и/или микробиологическим показателям.

Шаг 2. Проводят подбор команды специалистов и составление плана-графика работ.

В команду привлекают специалистов предприятия из числа работников лаборатории (микробиологов), ветеринарно-санитарных врачей, технологов, а

также сторонних специалистов, владеющих методами микробного профилирования.

Шаг 3. Формируют перечень объектов производственной среды для проведения микробного профилирования.

В перечень объектов включают:

- биотические объекты – сырье, полуфабрикаты, готовую продукцию, отобранные на разных стадиях производственного процесса;

- абиотические объекты, исходя из их зональности по отношению к биотическим объектам.

В перечень абиотических объектов в обязательном порядке включают объекты-потенциальные источники контаминации в процессе производства пищевой продукции.

Шаг 4. Проводят исследования свободно циркулирующей и биопленочной микрофлоры.

Для этого отбирают смывы с поверхности абиотических объектов. Отбор проб с абиотических объектов проводят непосредственно после мойки и дезинфекции, а также в процессе работы с учетом зональности

Отбор проб с биотических объектов делают без обеззараживания поверхности.

Шаг 5. Проводят анализ идентифицированных микроорганизмов и сопоставляют состав микрофлоры сырья, продукта и абиотических объектов производственной среды.

При анализе полученных результатов делают вывод о достаточности/недостаточности применяемого на предприятии комплекса санитарно-гигиенических процедур.

Шаг 6. Выбирают направление перепроектирования процедур обеспечения микробиологической безопасности

Основными направлениями перепроектирования процедур обеспечения микробиологической безопасности могут быть:

- ужесточение входного контроля сырья;

- замена неэффективных дезсредств и/или установление порядка их ротации;

- изменение графиков мойки и дезинфекции

-введение в практику применения физических методов обеззараживания;

- использование антибактериальных материалов и покрытий;

Шаг 7. Планируют переходные процессы.

Составляют план-график переходных процессов, который должен включать этапы выполнения реинжиниринга, контрольные отборы проб по завершению отдельных этапов и/или всех предусмотренных этапов. Назначают ответственных лиц.

Шаг 8. Реализация реинжиниринга

Разработанные процедуры считаются успешно реализованными, когда существовавшие проблемы микробиологической безопасности исключены на длительный срок.

Приведенная схема реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности была успешно реализована в 2021 году на 2х предприятиях (Москва, Московская область) в рамках выполнения хоздоговорных работ. В ходе выполнения этих работ были установлены источники биопленочной контаминации, обеззараживание которых не были предусмотрено программами мойки и дезинфекции, действовавших на предприятиях.(Приложение Ж)

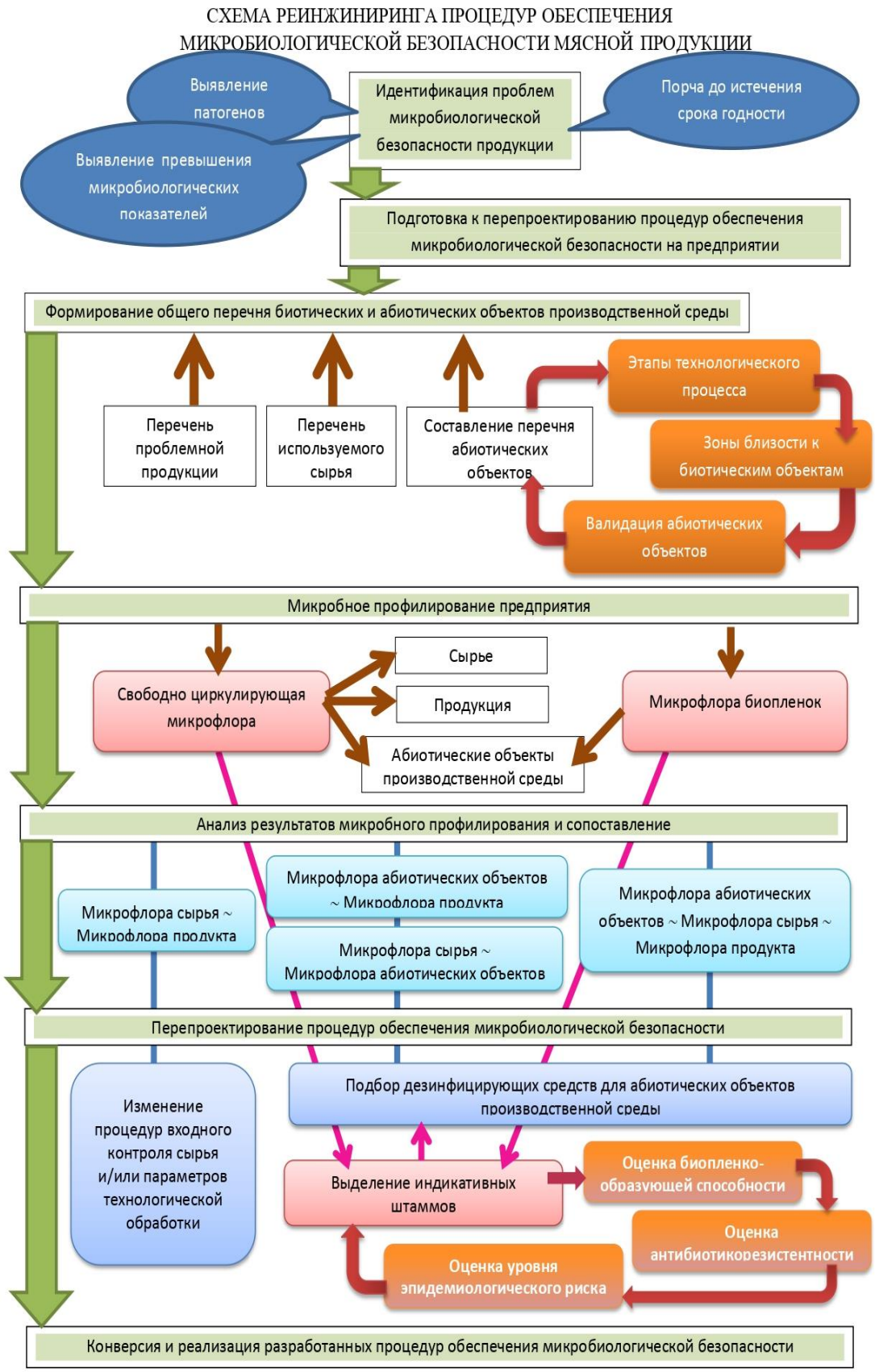


Рисунок 74. - Структурная схема реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности

Схема реинжиниринга легла в основу МР «Методических рекомендаций по повышению пищевой безопасности» Приложение 3. Данный документ был разработан в рамках выполнения Гранта № 075-15-2020-775 и содержит следующие разделы: введение, область применения, термины и определения, характеристика основных возбудителей пищевых инфекций; организация производственного контроля микробиологических показателей безопасности, принципы повышения пищевой безопасности, схема реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности пищевой продукции, рекомендуемые методы исследований, заключение, список рекомедуемой литературы.

Документ предназначен, главным образом, для предприятий мясной и птицеперерабатывающей промышленности. Принципы, схемы и рекомендации, изложенные в документыв могут быть использованы для подготовки и обучения специалистов пищевых предприятий различного профиля.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

- Апробированы молекулярные методы для определения патогенов (*Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.), циркулирующих в производственной среде пищевых предприятий. Разработано 7 методических рекомендаций для определения патогенов. Внедрение методов более чем на 15 предприятиях.
- Установлен микробный профиль 10 пищевых предприятий, который состоял на 48 % из бактерий семейства Pseudomonadaceae рода Pseudomonas (27 видов), 15,3% бактерии семейства Enterobacteriaceae (9 родов), 8% бактерии семейства Carnobacteriaceae рода Carnobacterium, 3,8 % бактерий семейства Aeromonadaceae рода Aeromonas и еще 13 семейств микроорганизмов. Выделены неконтролируемые и трудно культивируемые патогены: *Stenotrophomonas maltophila, Pantoea agglomerans, Neisseria zoodegmatis, Rothia nasimurium, Moraxella* spp., *Acinetobacter* spp. Определена закономерность выявления патогенных микроорганизмов с поверхности вспомогательного оборудования и конструкций в производственной среде. В зависимости от типа оборудования и предприятий доля положительных проб от общего количества отобранных, по выявлению *L. monocytogenes* составляет от 15 до 25% *Salmonella* spp – от 10 до 30%, *Pseudomonas* spp и *Aeromonas* spp – от 27 до 66%. Установлено наличие взаимосвязи между присутствием на одном и том же объекте производственной среды, как патогенных микроорганизмов, так и микроорганизмов, обладающих способностью образовывать биопленки. Показано, что большая часть изолятов–сапротрофов представлены микроорганизмами порчи, обладающих способностью к биопленкообразованию.
- Охарактеризована структура и свойства биопленок пищевого производства. Установлено, что они имеют полимерный матрикс различного химического состава, везикулы, фибриллы, персистеры и толератные клетки,

а также обладают гетерогенностью и микроколониальным ростом. Определена высокая таксономическая сходность доминирующих микроорганизмов в биопленках с разных объектов одного и того же мясоперерабатывающего предприятия. Установлен таксономический состав биопленок, который был представлен бактериями (археи не выявлены), относящихся более чем к 11 филумам, из которых доминировали Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmientes, Proteobacteria. Эти филумы были представлены бактериями, вызывающие порчу мясных, рыбных и молочных продуктов и образующие биопленки (Pseudomonas, Flavobacterium, Arcobacter, Vagococcus, Chryseobacterium, Carnobacterium и др.), а также оппортунистические патогены человека и животных (Arcobacter, Corinobacteria, и др.). В составе нативных биопленок были выявлены возбудители пищевых токсикоинфекций. Показана, зависимость таксономического состава биопленок на пищевом предприятии от вида перерабатываемого сырья. Установлено наличие биопленок на объектах, не описанных в литературных источниках: на потолках, на колесах тележек, а также на объектах, размещенных в производственных цехах с температурой 0°С.

- Установлено, что среди выявленных на пищевых предприятиях *L. monocytogenes* преобладали сиквенстипы СС9 и СС121, а также присутствовали *L. monocytogenes* сиквенстипов СС8 и 321, способные вызывать инвазивный листериоз. Установлено совпадение профиля интерналинов производственного изолята ST8 и клинического изолята ST 2096 (СС8), что свидетельствует о присутствии персистирующих форм листерий на пищевом производстве.
- Установлена способность выделенных с пищевых предприятий штаммов патогенов и сапрофитов образовывать биопленки. Определено, что интенсивность образования биопленок патогенными бактериями, в частности *L.monocytogenes* и *Salmonella* spp., при температуре + 4 °С зависит от времени инкубации.

- Установлено, что микроорганизмы рода *Pseudomonas* spp, обладают способностью формировать стабильную биопленку при температуре 10° С. Установлено, что при совместном культивировании *Pseudomonas* и *Salmonella* spp. образование биопленок значительно усиливалось через 48 часов.
- Установлена мультирезистентность патогенных микроорганизмов, в частности *Salmonella* spp. Установлено, что штаммы *Salmonella Infantis и Salmonella Typhimurium*, обладаюшие фенотипической устойчивостью к 8 видам антибиотиков, имели гены резистентности локализованные внутри плазмид, а также закрепленные на хромосомном уровне.
- Разработаны Методические рекомендации: МР 784-00419779-2021 «Методика создания моделей моно- и мультивидовых биопленок грамотрицательных и грамположительных бактерий»; Методические рекомендации МР 4.2.0161-19 «Методы индикации биологических пленок микроорганизмов на абиотических объектах»
- Применение наиболее часто используемых на пищевых производствах дезинфектанов в обычных концентрациях неэффективно против биопленочного сообщества. Против моновидовых (но не поливидовых) БП был эффективен только хлорсодержащий препарат в 4-кратной концентрации. Обнаружено явление быстрого восстановления жизнеспособности клеток в составе биопленок, что обусловливает необходимость улучшения процедур дезинфекции
- Получены новые данные по выживаемости микроорганизмов под воздействием физических методов .Показана эффективность метода лазерного переноса наночастиц и метода спектрально-селективной ИК-лазерной инактивации. Определены параметры инактивации микроорганизмов и биопленок данных методов. Метод лазерного переноса наночастиц показал высокую эффективность для серебра и меди при воздействии на бактериальные биопленки на поверхностях различных материалов

производственного оборудования, и неэффективность химически-инертного золота. Проведен комплекс исследований по изучению антимикробных свойств поликатионных полимеров. Выявлена более высокая антимикробная активность полимеров в отношении грамотрицательных микроорганизмов как на планктонных формах микроорганизмов (*L. monocytogenes и P. aerogenosa*), так и на сформированных и формирующихся биопленки указанных микроорганизмов

- Разработана схема реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности мясной продукции.

Перечень сокращений и условных обозначений

БП – биологическая пленка, биопленка (и),

ВОЗ - Всемирная Организация Здравоохранения;

ВПМ - внеклеточный полимерный материал

Г(-) – грамотрицательные

Г(+) – грамположительные

ДВ – действующее (ие) вещесто (а)

ДНК - дезоксирибонуклеиновая (ые) кислота (ы)

ДНК-аза - дезоксирибонуклеаза

ДС – дезинфицирующее (ие) средство (а)

ЖКТ - желудочно-кишечный тракт

ИПЭК- интерполиэлектролитные комплексы

КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов

КОЕ – колониеобразующие единицы

МАФАнМ – мезофильные аэробные и факультативно анаэробные микроорганизмы

МГА – модифицированная газовая среда

МПЗ – мясоперерабатывающий завод

НУК - надуксусная кислота

НЧ – наночастица (ы)

ОКИ-острые кишечные инфекции

ОТЕ (OTU) – оперативные таксономические единицы

П/ф - полуфабрикат

ПП – первичная переработка

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ТЭМ - трансмиссионная (просвечивающая) электронная микроскопия

ЭПМ - экзоклеточный полисахаридный матрикс

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abdulmawjood, A. Application of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for molecular identification of Trueperella pyogenes isolated from various origins / A. Abdulmawjood, J. Wickhorst, O. Hashim, O. Sammra, A. Hassan, M. Alssahen, C. Lämmler, E. Prenger-Berninghoff, G. Kleina // Molecular and Cellular Probes – 2016. – vol. 30. no. 4. – p. 205-210. DOI:10.1016/j. mcp.2016.05.003
2. Ahmed J. Application of high-pressure processing and polylactide/cinnamon oil packaging on chicken sample for inactivation and inhibition of Listeria monocytogenes and Salmonella Typhimurium, and post-processing film properties. / J. Ahmed, M. Mulla, Y. A. Arfat // Food control. – 2017. – V. 78. – P. 160-168. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.02.023
3. Ahmed, R. Evaluation of three Arcobacter selective agars for selective enumeration of Arcobacter butzleri in beef / R. Ahmed, S. Balamurugan, // Food Research International – 2013. – vol. 52 is. 2 –p. 522–525. DOI:10.1016/j.foodres.2013.02.029
4. Akinbobola, A.B. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in *in vitro* biofilms to high-level peracetic acid disinfection / A.B. Akinbobola, L. Sherrya, W.G. Mckay, G. Ramage, C. Williams // Journal of Hospital Infection. – 2017. – vol. 97 (2). – p. 162–168. DOI: 10.1016/j.jhin.2017.06.024.
5. Allerberger, F. 2010. Llisteriosis: A Resurgent Foodborne Infection / F. Allerberger, M. Wagner // Clinical Microbiology and Infection. – 2010. – vol. 16. no. 1. – p. 16-23. DOI: 10.1111/j.1469- 0691.2009.03109.x
6. Allos, B. M. *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends / B.M. Allos, // Clinical Infectious Diseases –2001. – vol. 32, no. 8. – p. 1201-1206. DOI: 10.1086/319760
7. Al-Shabib, N.A. Rutin inhibits mono and multi-species biofilm formation by foodborne drug resistant *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* / N. A. Al-Shabib, F. M. Husain, I. Ahmad, M. S. Khan, R. A. Khan, J. M. Khan, //

Food control. – 2017. - vol. 79. – P. 325-332. DOI:10.1016/j.foodcont.2017.03.004

8. Altekruse, S.F. *Campylobacter jejuni* - an emerging foodborne pathogen / S.F., Altekruse, M.J. Blaser, N.J. Stern, P.I. Fields, D. Swerdlow, // Emerging Infectious Diseases. – 1999 – vol. 5, no. 1. – p. 28-35. DOI: 10.3201/eid0501.990104.
9. Angst, E. The fouling of ships bottoms by bacteria. Report, bureau construction and repair / E. Angst. – Washington, DC: United State Navy Department, – 1923–.
10. Auguet, O. Implications of downstream nitrate dosage in anaerobic sewers to control sulfide and methane emissions / O. Auguet, M. Pijuan, H. Guasch-Balcells, C.M. Borrego, O. Gutierrez, // Water Research. – 2015. – vol. 68 – p. 522–532. DOI: 10.1016/j.watres.2014.09.034
11. Aziz, R.K. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology/ R.K. Aziz, D. Bartels, A.A. Best, M. DeJongh, T. Disz, R.A. Edwards, K. Formsma, S. Gerdes, E.M. Glass, M. Kubal, F. Meyer, G.J Olsen, R. Olson, A.L. Osterman, R.A. Overbeek, L.K. McNeil, D. Paarmann, T. Paczian, B. Parrello, G.D. Pusch, C. Reich, R. Stevens, O. Vassieva, V. Vonstein, A. Wilke, O. Zagnitko, // BMC Genomics. – 2008. – 9:75. DOI: 10.1186/1471-2164-9-75
12. Balhaddad, A.A. Toward dental caries: Exploring nanoparticle-based platforms and calcium phosphate compounds for dental restorative materials / A. A. Balhaddad, A.A. Kansara, D. Hidan, M.D. Weir, H.H.K. Xu, M.A.S. Melo, // Bioactive Materials. – 2018. – 4(1):43-55. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2018.12.002
13. Balogu, T.V. Persistence and Biofilm Assessment of Campylobacter jujuni in Poultry Abattoir / T.V. Balogu, V.O. Nwaugo, R.A. Onyeagba // Nigerian Food Journal. – 2014. – vol. 32. is. 1. –p. 54-61. DOI: 10.1016/S0189-7241(15)30096-5

14. Baquero, F. Antibiotic-selective environments / F. Baquero, M. Negro, M. Morosini, J. Blazquez, // Clinical Infectious Diseases – 1998. – vol. 27. – p. 5-11. DOI: 10.1016/S0964-8305(03)00039-8.
15. Barth, E. Interplay of cellular cAMP levels, σS activity and oxidative stress resistance in Escherichia coli / E. Barth, K.V. Gora, K.M. Gebendorfer, F. Settele, U. Jakob, J. Winter // Microbiology – 2009. – vol. 155. – p. 1680-1689. DOI: 10.1099/mic.0.026021-0.
16. Basson, A. Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of Flavobacteriumjohnsoniae-like isolates / A. Basson, L.A. Flemming, H.Y. Chenia, // Microbial Ecology – 2008. – vol. 55 is. 1 –p. 1–14. DOI: 10.1007/s00248-007-9245-y
17. Bataeva, D. S. The survival of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 at different temperature influences in meat systems / D.S. Bataeva, O.V. Sokolova, // Vsyo o myase. – 2018. – vol. 60 – p. 44-45. DOI: 10.21323/2071-2499-2018-5-44-45
18. Baylis, C.L. Comparison of three enrichment media for the isolation of *Campylobacter* spp. from foods / C.L. Baylis, S. MacPhee, K.W. Martin, T.J. Humphrey, R.P. Betts, // Journal of Applied Microbiology. – 2000. – 89(5). – p. 884-891. DOI: DOI: 10.1046/j.1365-2672.2000.01203.x
19. Bekker, A. Lipid breakdown and sensory analysis of milk inoculated with Chryseobacteriumjoostei or Pseudomonas fluorescens / A. Bekker, P. Jooste, L. Steyn, C. Bothma, A. Hugo, C. Hugo, // International Dairy Journal – 2016. – vol. 52 –p. 101–106. DOI **:** 10.1016/j.idairyj.2015.09.003
20. Bergh, Van den. Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of *Escherichia coli* persistence / V. den Bergh, J.E. Michiels, T. Wenseleers, E.M. Windels P.V. Boer, D. Kestemont, // Nature Microbiology. – 2016. – 7;1(5):1{7. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2016.20
21. Berrang, M. E. Presence and level of *Campylobacter spp*. on broiler carcasses throughout the processing plant / M.E. Berrang, J.A. Dickens, // Journal of

Applied Poultry Research. – 2000. – vol. 9, no. 1. – p. 43-47. DOI: 10.1093/japr/9.1.43

22. Bessems, E. Bacterial disinfectant resistance – a challenge for the food industry / E. Bessems, P. M. J. Terpstra // Hygiene and Disinfection – 2003. – vol. 51. – p. 283-290. DOI: 10.1016/S0964-8305(03)00039-8.
23. Bogdanovičová, K. The bacteriological quality of goat and ovine milk / K. Bogdanovičová, A. Skočková, Z. Šťástková, I. Koláčková, R. Karpíšková, // Potravinarstvo. – 2015. – vol. 9, no. 1. – p. 72-76. DOI: 10.5219/438
24. Bogino, P.C. The role ofbacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations / P.C. Bogino, Mde L. Oliva Mde, F.G. Sorroche, W. Giordano, // International Journal ofMolecular Science. – 2013. – vol. 14. – p. 15838–15859. DOI: 10.3390/ijms140815838
25. Bonsaglia, E.C.R. Production of biofilm by *Listeria monocytogenes* in different materials and temperatures / E.C.R. Bonsaglia, N.C.C. Silva, A.J. Fernades, J.P.J. Araujo, M.H. Tsunemi, V.L.M. Rall, // Food control. – 2014. – vol. 1. №35. – p.386–391. DOI:10.1016/j.foodcont.2013.07.023
26. Borch E. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. / E. Borch, M-L. Kant-Muermans, Y. Blixt // International Journal of Food Microbiology. – 1996. – V. 33. – №1. – P. 103-120
27. Borges, K. A. Detection and quantification of *Campylobacter spp*. in Brazilian poultry processing plants / K.A. Borges, I.C. Cisco, T.Q. Furian, D.C. Tedesco, L.B. Rodrigues, V.P. Nascimento, L.R. dos Santos, // The Journal of Infections in Developing Countries. – 2020. – vol. 14. – p. 109-113. DOI: 10.3855/jidc.11973
28. Boudarel, H. Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms: analysis and critical review / H. Boudarel, J.-D. Mathias, B. Blaysat, M. Grédiac, // NPJ biofilms and microbiomes. – 2018. – vol. 4. №17. – p.1–15. DOI:10.1038/s41522-018-0062-5

29. Brackman, G. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents / G. Brackman, T. Coenye, // Current Pharmaceutical Design. – 2015. – vol. 21. – P. 5-11. DOI: 10.2174/1381612820666140905114627
30. Bragg, R. Bacterial resistance to quaternary ammonium compounds (QAC) disinfectants / R. R. Bragg, A. Jansen, M. Coetzee, W.V. Der Westhuizen, C.E. Boucher // Advances in Experimental Medicine and Biology – 2014. – vol. 808. – p. 1-13. DOI: 10.1007/978-81-322-1774-9_1.
31. Brauge, T. Teichoic acid is the major polysaccharide present in the Listeria monocytogenes biofilm matrix / T. Brauge, G. Midelet-Bourdin, I. Sadovskaya, C. Faille, T. Benezech, E. Maes, Y. Guerardel, / /Fems microbiology letters. – 2015. – vol. 363. - №2. – P. 229. DOI:10.1093/femsle/fnv229
32. Bridier, A. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens / A. Bridier, P. Sanchez-Vizuete, M. Guilbaud, J.-C. Piard, M. Naïtali, R. Briandet, // Food Microbiology. – 2015. – vol. 45. – Part B. – P. 167-178. DOI: 10.1016/j.fm.2014.04.015
33. Brown, H.L. Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of Campylobacter jejuni / H.L. Brown, M. Reuter, L.J. Salt, K.L. Cross, R.P. Betts, A.H.M. van Vliet // Applied and Environmental Microbiology. – 2014. – vol. 80 no.22. –p.7053-7060. DOI: 10.1128/AEM.02614-14.
34. Bryers, J.D. Biofilms and the technological implications of microbial cell adhesion / J.D. Bryers // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 1994. – vol. 2 (1–3). – p. 9–23. DOI: 10.1016/0927–7765(94)80013–8.
35. Busalmen, J.P. Inlluence of pH and ionic strength on adhesion of a wild strain of *Pseudomonas spp*. to titanium / J.P. Busalmen, S.R. de Sanchez, // Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. – 2001. – vol. 26. – P. 303-308.
36. Tamazight, C. Seasonal ability of biofilm formation of Listeria monocytogenes strains isolated from slaughterhouses in Quebec / C.

Tamazight, N. Kertsi, F. Sylvain, S. Charles, Q. Sylvain, F. Philippe, // Thesis of the conference Safe pork. – 2015. – p. 201.204

37. Campos, C.B. Prevalence and genotypes of extended spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from human stool and chicken meat in Hamburg, Germany / C.B. Campos, I. Fenner, N. Wiese, C. Lensing, M. Christner, H. Rohde, M. Aepfelbacher, T. Fenner, M. Hentschke, // International Journal of Medical Microbiology. – 2014. – vol. 304(5–6). – p.678-684. DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.04.012

38. Cantón, R. Prevalence and spread of extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe / R. Cantón, A. Novais, A. Valverde, E. Machado, L. Peixe, F. Baquero, T.M. Coque, // Clinical Microbiological Infections. – 2008. – vol. 14. – p. 144-153. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01850.x

39. Canton, R. Proteus penneri / R. Canton, M. P. Sánchez-Moreno, M. Morosini. // Enfermedades Infecciosas y MicrobiologíaClínica. – 2006. - N24(1). – p. 8-13. DOI: 10.1157/13094272

40. Carlie, S. Molecular basis of bacterial disinfectant resistance / S.M. Carlie, C.E. Boucher, R. Bragg // Drug Resistance Updates – 2020. – vol. 48. – p. 1-9. DOI: 10.1016/j.drup.2019.100672.

41. Castro, A.G.S.A. Viability of *Campylobacter* spp. in frozen and chilled broiler carcasses according to real-time PCR with propidium monoazide pretreatment / A.G.S.A. Castro, E.M.S. Dorneles, E.L.S. Santos, T.M. Alves, G.R. Silva, T.C. Figueiredo, D.C.S. Assis, A.P. Lage, S.V. Cançado, // Poultry Science. – 2018. – vol. 97 (5). – p. 1706-1711. DOI:10.3382/ps/pey020

42. Çaykara, T. Exploring the potential of polyethylene terephthalate in the design of antibacterial surfaces / T. Çaykara, M.G. Sande, N. Azoia, L.R. Rodrigues, C.J. Silva, // Medical Microbiology and Immunology. – 2020. – vol. 209. – p. 363–372. DOI: 10.1007/s00430-020-00660-8

43. Center for Disease Control and Prevention. Salmonella. [Электронный ресурс]. – 2022. – Режим доступа: https://www.cdc.gov/salmonella/

44. Chaoyu, T. Chlorine disinfectants promote microbial resistance in Pseudomonas sp. / T. Chaoyu, H. Hong, C. Gang, L. Zhengyan, L. Aifeng, Z. Jianye // Environmental Research – 2021. – vol. 199. DOI: 10.1016/j.envres.2021.111296.
45. Characklis, W.G. Biofilms and microbial fouling / W.G. Characklis, K.E. Cooksey // Advances in Applied Microbiology. – 1983. – vol. 29. – p. 93–137. DOI: 10.1016/S0065-2164(08)70355-1
46. Chen, J. Long-term evaluation of the effect of peracetic acid on a mixed aerobic culture: Organic matter degradation, nitrification, and microbial community structure / J. Chen, X. Liu, P.G. Spyros // Water Research – 2021. – vol. 190. DOI: 10.1016/j.watres.2020.116694.
47. Chien-Yi, Chang. Surface Sensing for Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* / C.Y. Chang, // Frontiers in Microbiology. – 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02671
48. Chuah, L.O. Genetic relatedness, antimicrobial resistance and biofilm formation of Salmonella isolated from naturally contaminated poultry and their processing environment in northern Malaysia / L.O. Chuah, A.K. Shamila Syuhada, I. Mohamad Suhaimi, T. Farah Hanim, G. Rusul // Food Research International. – 2018. – vol. 105. –p. 743-751. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.11.066
49. Costa-Orlandi. Fungal biofilms and polymicrobial diseases / C.B. Costa-Orlandi, J. C. O. Sardi, N.S. Pitangui, H. C. De Oliveira, L. Scorzoni, M.C. Galeane, // Journal of Fungi. – 2017. – vol. 3:22. DOI:10.3390/jof3020022
50. Costerton, J.W. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections / J.W. Costerton, P.S. Stewart, E.P. Greenberg // Science. – 1999. – vol. 284 (5418). – p. 1318–1322. DOI: 10.1126/science.284.5418.1318
51. Costerton, J.W. How bacteria stick / J.W. Costerton, G.G. Gee.sex, K.J. Cheng, // Scientific American. – 1978. – vol. 238. – p. 86-95. DOI: 10.1038/scientificamerican0178-86

52. Coughlan, L. M. New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry / L.M. Coughlan, P.D. Cotter, C. Hill, A. Alvarez-Ordóñez, // Frontiers in Microbiology – 2016. – vol. 7 –p. 1641. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01641
53. de Almeida, F.A.Virtual screening of plant compounds and nonsteroidal anti-inflammatory drugs for inhibition of quorum sensing and biofilm formation in Salmonella / F.A. de Almeida, E.L.G. Vargas, D.G. Carneiro, U.M. Pinto, M.C.D. Vanetti // Microbial Pathogenesis. – 2018. – vol. 121. – p. 369-388. DOI: 10.1016/j.micpath.2018.05.014
54. Delpiazzo, R. Accurate and fast identification of Campylobacter fetus in bulls by real-time PCR targeting a 16S rRNA gene sequence / R. Delpiazzo, M. Barcellos, S. Barros, L. Betancor, M. Fraga, J. Gil, G. Iraola, C. Morsella, F. Paolicchi, R. Pérez, F. Riet-Correa, M. Sanguinetti, A. Silva, C. da Silva Silveira, L. Calleros, // Veterinary and Animal Science – 2021. – vol. 11 DOI: 10.1016/j.vas.2020.100163
55. Demkina E.V. Effect of Inherent Immunity Factors on Development of Antibiotic Tolerance and Survival of Bacterial Populations Under Antibiotic Attack / E.V. Demkina, N.G. Loiko, A.L. Mulyukin, Y.A. Nikolaev, G.I. El'-Registan, T.A. Smirnova, A.M. Gaponov, V.M. Pisarev, A.V. Tutel'yan, // Microbiology (Mikrobiologiya). – 2015. – vol. 84. № 6. – p. 764-774
56. Dierikx, C. Extended-spectrum-β-lactamase- and AmpC-β-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers / C. Dierikx, J. van der Goot, T. Fabri, A. van Essen-Zandbergen, H. Smith, D. Mevius, // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2013. – vol. 68 (1). – p. 60-67. DOI: 10.1093/jac/dks349
57. Drosinos, E.H. Growth of Listeria monocytogenes in meat juice under a modified atmosphere at 4°C with or without members of a microbial association from chilled lamb under a modified atmosphere / E.H. Drosinos, R.G. Board // Letters in Applied Microbiology. – 1994. – vol. 19 no. 3. –p. 134-137. DOI: 10.1111/j.1472-765X.1994.tb00925.x

58. EFSA (European Food Safety Authority), 2010. Analysis of the baseline survey on the prevalence of Campylobacter in broiler batches and of Campylobacter and Salmonella on broiler carcasses in the EU, 2008. B. Analysis of factors associated with Campylobacter colonisation of broiler batches and with Campylobacter contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples // EFSA Journal. –2010. – vol. 8. – p. 1522. DOI: 10.2903/j.efsa.2010.1522
59. EFSA and ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA Journal, – 2017. – vol. 15. no 12. – P. 228. DOI: 10.2903/j.efsa.2017.5077
60. Elvers, K. T. Molecular tracking, through processing, of Campylobacter strains colonizing broiler flocks/ K.T. Elvers, V.K. Morris, D.G. Newell, V.M. Allen, // Applied and Environmental Microbiology. –2011. – vol. 77, no. 16. – p. 5722-5729. DOI: 10.1128/AEM.02419-10
61. Ennaji, H. Characterization and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry and red meat in Morocco / H. Ennaji, M. Timinouni, M. Ennaji, M. Hassar, N. Cohen // Infection and drug resistance. – 2008. – no. 1. – p. 45-50. DOI: 10.2147/IDR.S3632
62. Ercolini, D. Different molecular types of Pseudomonas fragi have the same overall behaviour as meat spoilers. / D. Ercolini, A. Casaburi, A. Nasi, I. Ferrocino, R. Di Monaco, P. Ferranti, G. Mauriello, F. Villani, // International Journal of Food Microbiology. – 2010. – vol. 142 is. 1–2 –p. 120–131. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.012
63. European Food Safety Authority. EFSA and ECDC / European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. European Union One Health 2018 Zoonoses Report // EFSA Journal – 2019 – vol. 17, no. 12 – 276 p. DOI: 10.2903/j.efsa.2019.5926

64. European Food Safety Authority. Salmonella cases no longer falling in the EU. [Электронный ресурс]. – 2017. – Режим доступа: https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/171212
65. European Food Safety Authority. Salmonella the most common cause of foodborne outbreaks in the European Union. [Электронный ресурс]. – 2019. – Режим доступа: https://www.efsa.europa.eu/en/news/salmonella-most-common-cause-foodborne-outbreaks-european-union
66. Facciolà, A. Campylobacter: from microbiology to prevention / A. Facciolà, R. Riso, E. Avventuroso, G. Visalli, S.A. Delia, P. J. Laganà // Journal of Preventive Medicine and Hygiene. – 2017. – vol. 58, no. 2. – p. 79–92.
67. Farber, J. M. *Listeria monocytogenes* a food borne pathogen / J.M. Farber, P.I. Peterkin // Microbiol. – 1991. – V 55. – p. 476-511. DOI: 10.1128/мр.55.3.476-511.1991
68. Ferreira, S. Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of Arcobacter butzleri isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse / S. Ferreira, M.J. Fraqueza, J.A. Queiroz, F.C. Domingues, M. Oleastro // International Journal of Food Microbiology. – 2015. – vol. 162. is. 1. –p. 82-88. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.003.
69. Fernando, S. Antimicrobial Nanoparticles: applications and mechanisms of action / S. Fernando, T. Gunasekara, J. Holton, // Sri Lankan Journal of Infectious Diseases. – 2018. – 8(1). – p.2–11. DOI: 10.4038/sljid.v8i1.8167
70. Flemming, H. The biofilm matrix / H. Flemming, J. Wingender, // Nature reviews. Microbiology. – 2010. – vol. 8. №9. – p.623–633. DOI:10.1038/nrmicro2415
71. Food Safety and Inspection Service U.S. Department of Agriculture. Illness and Pathogens. [Электронный ресурс]. – 2017. – Режим доступа: https://www.fsis.usda.gov/food-safety/foodborne-illness-and-disease/illnesses-and-pathogens/salmonella-questions-and-answers
72. Fosse, J. Prevalence and risk factors for bacterial food-borne zoonotic hazards in slaughter pigs: a review /J. Fosse, H. Seegers, C. Magras, // Zoonoses

Public Health. – 2009. – vol. 56. – p. 429-454. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01185.x

73. Frieri, M. Antibiotic resistance. Review / M. Frieri, K. Kumar, A. Boutin // Journal of Infection and Public Health. – 2017. – vol. 10 (4). – p. 369–378. DOI: 10.1016/j.jiph.2016.08.007.

74. Gandhi, M. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive / M. Gandhi, M. L. Chikindas // International Journal of Food Microbiology. – 2007. – V. 113. № 1. – p. 1-15. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.008

75. Garcia, M. C**.** Study of enterococci and micrococci isolated throughout manufacture and ripening of San Simon cheese. / M. C. Garcia, M. J. Rodriguez, A. Bernardo, M. E. Tornadijo, J. Carballo // Food Microbiol. – 2002. –V. 19. – P. 23-33. DOI:10.1006/fmic.2001.0457

76. Garrido-Maestu, A. Combination of Microfluidic Loop-Mediated Isothermal Amplification with Gold Nanoparticles for Rapid Detection of Salmonella spp. in Food Samples / A. Garrido-Maestu, J. Carvalho, S. AbaldeCela, E. Carbó-Argibay, L. Diéguez, M. Prado // Frontiers in Microbiology – 2014. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02159

77. Gerba, C.P. Quaternary ammonium biocides: efficacy in application / C.P. Gerba, // Applied and Environmental Microbiology – 2015. – vol. 81. – p. 464-469. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.025.

78. González-Rivas, F. Biofilms in the Spotlight: Detection, Quantification, and Removal Methods. / F. González-Rivas, C. Ripolles-Avila, F. Fontecha-Umaña, A. G. Ríos-Castillo, J. J. Rodríguez-Jerez // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety Free Access. – 2018. – №17. – P. 1261-1276.

79. Greenwood, D. Pathogenesis, Immunity, Laboratory Diagnosis and Control / D. Greenwood, R. C B Slack, M. R. Barer // Medical Microbiology A Guide to Microbial Infections. – 2012.

80. Gristina, A.G. Biofilms and chronic bacterial infections / A.G. Gristina // Clinical Microbiology Newsletter. – 1994. – vol. 16 (22). – p. 171–176. DOI: 10.1016/0196–4399(94)90037-X.

81. Gruntar, I. Campylobacter jejuni contamination of broiler carcasses: population dynamics and genetic profiles at slaughterhouse level / I. Gruntar, M. Biasizzo, D. Kušar, M. Pate, M. Ocepek, // Food Microbiology. –2015. – vol. 50, p. 97-101. DOI: 10.1016/j.fm.2015.03.007

82. Hain, T., Whole-genome sequence of Listeria welshimeri reveals common steps in genome reduction with Listeria innocua as compared to Listeria monocytogenes / T. Hain, C. Steinweg, C.T. Kuenne, A. Billion, R. Ghai, S.S. Chatterjee, E. Domann, U. Kärst, A. Goesmann, T. Bekel, D. Bartels, O. Kaiser, F. Meyer, A. Pühler, B. Weisshaar, J. Wehland, C. Liang, T. Dandekar, R. Lampidis, J. Kreft, W. Goebel, T. Chakraborty // Journal Bacteriology. – 2006 – V. 188(21). 7405-15. DOI: 10.1128/JB.00758-06

83. Hall-Stoodley L. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases/ L. Hall-Stoodley, J.W. Costerton, P. Stoodley, // Nature Reviews Microbiology. – 2004. –2:95-108. DOI: 10.1038/nrmicro821

84. Hall-Stoodley, L. Evolving concepts in biofilm infections / L. Hall-Stoodley, P. Stoodley // Cellular Microbiology. – 2009. – № 11(7). – P. 1034-1043.

85. Hamanaka D. Effect of the wavelength of infrared heaters on the inactivation of bacterial spores at various water activities / D. Hamanaka, T. Uchino, N. Furuse, W. Han, S. Tanaka, // International Journal of Food Microbiology. – 2006. – 108(2). – p. 281–285. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.019

86. Han, N. Biofilm formation by Vibrio parahaemolyticus on food and food contact surfaces increases with rise in temperature / N. Han, M.F.R. Mizan, I.K. Jahid, S.-D. Ha // Food control. – 2016. – vol. 70. –p. 161-166. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.05.054

87. Hauschild, T. Differentiation of *Staphylococcus sciuri* strains isolated from free-living rodents and insectivores / T. Hauschild , S. Schwarz // Journal of

veterinary medicine. B, infectious diseases and veterinary public health. – 2003. – V. 50. – P. 241-6 DOI: 10.1046/j.1439-0450.2003.00662.x

88. Havelaar, A.H. World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010 / A.H. Havelaar, M.D. Kirk, P.R. Torgerson, H.J. Gibb, T. Hald, R.J. Lake, N. Praet, D.C. Bellinger, N.R. de Silva, N. Gargouri, N. Speybroeck, A. Cawthorne, C. Mathers, C. Stein, F.J. Angulo, B. Devleesschauwer, // PLOS Medicine. – 2015. – vol. 12. DOI:10.1371/journal.pmed.1001923

89. Hayama, Y. Simulation model for Campylobacter cross-contamination during poultry processing at slaughterhouses / Y. Hayama, T. Yamamoto, F. Kasuga, T. Tsutsui, // Zoonoses Public Health. – 2011. – vol. 58, no. 6. – p. 399-406. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2010.01385.x

90. Herikstad, H. Salmonella surveillance: a global survey of public health serotyping / H., Herikstad, Y., Motarjemi, R.V. Tauxe, // Epidemiology and infection. – 2002. – 129(1):1-8. DOI: 10.1017/s0950268802006842

91. Hinton, Jr. A. Spread of *Campylobacter spp*. during poultry processing in different seasons / Jr. A. Hinton, J.A. Cason, M. Hume, K.D. Ingram, // International Journal of Poultry Science. – 2004. – vol. 3, no. 7. – p. 432-437. DOI: 10.3923/ijps.2004.432.437

92. Høiby, N. Antibiotic resistance of bacterial biofilms / N. Høiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, O. Ciofu // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2010. – vol. 35 (4). – p. 322–332. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2009.12.011.

93. Holley R.A. Brochothrix. / R.A. Holley // Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition). – 2014. – P. 331-334.

94. Hood, S.K. Biofilms in food processing / S.K. Hood, E.A. Zottola // Food Control. – 1995. – vol. 6. is. 1. –p. 9-18. DOI: 10.1016/0956-7135(95)91449-U

95. Horrocks, S. M. Incidence and ecology of *Campylobacter jejuni* and *coli* in animals / S.M. Horrocks, R.C.Anderson, D.J. Nielsbet, S.C. Ricke //

Anaerobe. – 2009. – vol. 15, no. 1-2. – p. 18-25. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2008.09.001

96. Howard, A. Acinetobacter baumannii : an emerging opportunistic pathogen /A. Howard, M. O'Donoghue, A. Feeney, R. D. Sleator. // Virulence. – 2012. - N3(3). – p. 243-50. DOI: 10.4161/viru.19700

97. Huhu, W. Comparison of microbial transfer rates from *Salmonella* spp. biofilm growth on stainless steel to selected processed and raw meat / W. Huhu, Z. Xinxiao, Z. Qiuqin, Y. X. Keping, X. G. Zhou // Food control. – 2015. – vol. 50. – p. 574–580. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.09.049.

98. Hunt, S.M. Hypothesis for the role of nutrient starvation in biofilm detachment / S.M. Hunt, E.M. Werner, B. Huang, M.A. Hamilton, P.S. Stewart // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – vol. 70 (12). – p. 7418–7425. DOI: 10.1128/AEM.70.12.7418–7425.2004.

99. Ibarguren, C. Gelatine based films added with bacteriocins and a flavonoid ester active against food-borne pathogens / Carolina Ibarguren, Gustavo Céliz, Antonela S. Díaz, M. Alejandra Bertuzzi, Mirta Daz, M. Carina Audisio, // Innovative Food Science & Emerging Technologies. – 2015. – vol. 28. – P. 66-72. DOI:10.1016/j.ifset.2015.01.007

100. Iliadis, I., Daskalopoulou A., Simões M., Giaouris E. Integrated combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on biofilm formation by Salmonella enterica ser. Enteritidis and Typhimurium under low nutrient food-related conditions / I. Iliadis, A. Daskalopoulou, M. Simões, E. Giaouris // Food Research International. – 2018. – vol. 107. –p. 10-18. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.02.015

101. Indrawattana, N. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in raw meats marketed in Bangkok and characterization of the isolates by phenotypic and molecular methods / N. Indrawattana, , T. Nibaddhasobon, N. Sookrung, M. Chongsa-Nguan, A. Tungtrongchitr, S. Makino, W. Tungyong, W. Chaicumpa // Journal of Health Population and Nutrition. – 2011. – vol. 29. no. 1. – p. 26-38. DOI: 10.3329/jhpn.v29i1.7565

102. Isaac, P. Commensal coagulase-negative Staphylococcus from the udder of healthy cows inhibits biofilm formation of mastitis-related pathogens / P. Isaac, L. P. Bohl, M. L. Breser, M. S. Orellano, A. C. Marcela Alejandra Ferrero, C. Porporatto, // Veterinary microbiology. – 2017. -Vol. 207. – P. 259-266. DOI: 10.1016/j.vetmic.2017.05.025

103. Ismail, S.A.S. Presence and changes in populations of yeasts on raw and processed poultry products stored at refrigeration temperature / S. A. S Ismail, T. Deak, H. A. Abd El-Rahman, M. A. M. Yassien, L. R. Beuchat // International Journal of Food Microbiology. – 2000. – V. 62. – P.113121. DOI: 10.1016/s0168-1605(00)00414-1

104. Izac, J. R. Diversity of the Lyme Disease Spirochetes and its Influence on Immune Responses to Infection and Vaccination. / J. R. Izac, R.T. Marconi, // The Veterinary clinics of North America: Small animal practice. – 2019. – vol. 49, is 4. – p. 671-686. DOI: 10.1016/j.cvsm.2019.02.007

105. Jasson, V. Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth / V. Jasson, L. Sampers, N. Botteldoorn, F. López-Gálvez, L. Baert, S. Denayer, A. Rajkovic, I. Habib, L. De Zutter, J. Debevere, M. Uyttendaele, // International Journal of Food Microbiology. – 2009. – vol. 135. – p. 248-253. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.007

106. Jessen, B. Biofilm and disinfection in meat processing plants / B. Jessen, L. Lammert // International Biodeterioration and Biodegradation – 2003. – vol. 51. – p. 265-269. DOI: 10.1016/S0964-8305(03)00046-5.

107. Jorgensen, F. Influence of season and geography on *Campylobacter jejuni* and *C. coli* subtypes in housed broiler flocks reared in Great Britain / F. Jorgensen, J. Ellis-Iversen, S. Rushton, S.A. Bull, S.A. Harris, S.J. Bryan, A. Gonzalez, T.J. Humphrey, // Applied and Environmental Microbiology. – 2011. – vol. 77, no. 11. – p. 3741-3748. DOI: 10.1128/AEM.02444-10

108. Joshi, A.S. Interactions of Gold and Silver Nanoparticles with Bacterial Biofilms: Molecular Interactions behind Inhibition and Resistance / A.S.

Joshi, P. Singh, I. Mijakovic, // International Journal of Molecular Science. – 2020. – 21(20):7658. DOI: 10.3390/ijms21207658.

109. Kaakoush, N.O. Global epidemiology of Campylobacter infection / N.O. Kaakoush, N. Castaño-Rodríguez, H.M. Mitchell, S.M. Man, // Clinical Microbiology Review. – 2015. – vol. 28, no. 3. – p. 687-720. DOI: /10.1128/CMR.00006-15

110. Kassinger, S.J. Biofilm architecture: An emerging synthetic biology target / S.J. Kassinger, M.L. van Hoek, // Synthetic and Systems Biotechnology. – 2020. – vol. 5. №1. – p.1–10. DOI: 10.1016/j.synbio.2020.01.001

111. Kim J. M. Antibacterial activity of carvacrol, citral and geraniol against Salmonella typhimurium in culture medium and on fish cubes. / J. M. Kim, MR. Marshall, J. A. Cornell, J. F. Preston III, C.I. Wel // Journal of Food science. – 1995. – №60. – P. 1364-1368.

112. Kim, M. R. Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance / M. R. Kim, S. Weigand, Oh, J.K. Hatt, R. Krishnan, U. Tezel, S.G. Pavlostathis, K.T. Konstantinidis // Applied and Environmental Microbiology – 2018. – vol. – 84. – p. 2141-2150. DOI:10.1021/acs.est.8b05907.

113. Kim, S.H. Biofilm formation of Campylobacter strains isolated from raw chickens and its reduction with DNase I treatment / S.H. Kim, C. Park, E.J. Lee, W.S. Bang, Y.J. Kim, J.S. Kim // Food control. – 2017. – vol. 71. –p. 94-100. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.06.038

114. Kloos, W. E. Natural populations of the genus Staphylococcus. / W. E. Kloos // Annu. Rev. Microbiol. –1980. –V. 34. – p. 559-592.

115. Koch, J. Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006-2007 / J. Koch, R. Dworak, R. Prager, B. Becker, S. Brockmann, A. Wicke, H. Wichmann-Schauer, H. Hof, D. Werber, K. Stark // Foodborne pathogens and diseases. – 2010. – vol. 7. no. 12. – p. 1581-1584. DOI: 10.1089/fpd.2010.0631

116. Koo, H. Dynamic cell–matrix interactions modulate microbial biofilm and tissue 3d microenvironments / H. Koo, K.M. Yamada, // Current opinion in cell biology. – 2016. – vol. 1. №42. – p.102–112. DOI: 10.1016/j.ceb.2016.05.005
117. Kuenne, C., Comparative analysis of plasmids in the genus Listeria / C. Kuenne , S. Voget, J. Pischimarov, S. Oehm, A. Goesmann, R. Daniel, T. Hain, T. Chakraborty // PLoS One. – 2010. –V5(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0012511
118. Kwiatek, M. Isolation of bacteriophages and their application to control *Pseudomonas aeruginosa* in planktonic and biofilm models / M. Kwiatek, S. Parasion, P. Rutynaa, L. Mizaka, R. Grykoa, M. Niemcewicza, A. Olenderb, M. Łobocka, // Research in Microbiology. – 2017. – vol. 168. - №3. – P. 194-207. DOI: 10.1016/j.resmic.2016.10.009
119. Lafarga, T. Strategies to reduce microbial risk and improve quality of fresh and processed strawberries: a review / T. Lafarga, P. Colás-Medà, M. Abadias, Aguiló- I. Aguayo, G. Bobo, I. Viñas // Innovative Food Science and Emerging Technologies – 2019. – vol.52. – p. 197-212. DOI: 10.1016/j.ifset.2018.12.012.
120. Lai, C. C. Clinical and Microbiological Characteristics of Rhizobium radiobacter Infections / C.C. Lai, L.J. Teng, P.R. Hsueh, A. Yuan // Clinical Infectious Diseases. – 2004. – N38 (1). – p. 149–153. DOI: 10.1086/380463
121. Lauritsen, C.V. Microbiota encompassing putative spoilage bacteria in retail packaged broiler meat and commercial broiler abattoir / C.V. Lauritsen, J. Kjeldgaard, H. Ingmer, M. Bisgaard, H. Christensen, // International Journal of Food Microbiology. – 2019. – vol. 300 –p. 14–21. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.04.003
122. Law, J. W. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations / J. W. Law, Ab. N. S.Mutalib, K. G. Chan, L. H. Lee // Frontiers in Microbiology – 2015. – vol. 5. – P. 770. DOI:10.3389/fmicb.2014.00770

123. Lebeaux D., Chauhan L., Rendueles O., Beloin C. From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections // Pathogens. - 2013. - V. 2. - P.288- 256
124. Lebeaux, D. Management of biofilm-associated infections: what can we expect from recent research on biofilm lifestyles? / D. Lebeaux, J.-M. Ghigo // Med Sci (Paris). – 2012. – vol. 28 no. 8-9. –p. 727-739. DOI: 10.1051/medsci/2012288015.
125. Lebeaux, D., Ghigo J.-M., Beloin C. Biofilm-Related Infections: Bridging the Gap between Clinical Management and Fundamental Aspects of Recalcitrance toward Antibiotics / D. Lebeaux, J.-M. Ghigo // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2014. – vol. 78 no. 3. –p. 510–543. DOI: 10.1128/MMBR.00013-14.
126. Lee, S. K. Distribution and molecular characterization of Campylobacter species at different processing stages in two poultry processing plants. / S.K. Lee, H. J. Park, J.H. Lee, J.S. Lim, K.H. Seo, E.J. Heo, Y.J. Kim, S.H. Wee, J. Moon, // Foodborne Pathogens and Disease. – 2017. – vol. 14, no. 3. – p. 141-143. DOI: 10.1089/fpd.2016.2218
127. Levenson, D., Candida zeylanoides: another opportunistic yeast. / D. Levenson, M. A. Pfaller, M. A. Smith, R. Hollis, T. Gerarden, C. B. Tucci, H. D. Isenberg // Journal of clinical microbiology. – 1991. – V. 29(8). – P. 1689-1692. DOI 10.1128/jcm.29.8.1689-1692.1991
128. Levin-Reisman I. Antibiotic tolerance facilitates the evolution of resistance / I. Levin-Reisman, I. Ronin, O. Gefen, I. Braniss, N. Shoresh, N.Q. Balaban // Science. – 2017. – 24;355(6327):826{30. DOI: 10.1126/science.aaj2191
129. Li, J. Effects of meat juice on biofilm formation of Campylobacter and Salmonella / J. Li, J. Feng, L. Ma, C. de la Fuente Nunez, G. Gölz, X. Lu // International Journal of Food Microbiology. – 2017. – vol. 253. –p. 20-28. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.04.013.
130. Lin, S. Pathogenic features and characteristics of food borne pathogens biofilm: Biomass, viability and matrix / S. Lin, L. Yang, G. Chen, B. Li, Z.

Xu // Microbial Pathogenesis. – 2017. – vol. 111. – p. 285–291. DOI: 10.1016/j.micpath.

131. Linton, D. Rapid identification by PCR of the genus Campylobacter and of five Campylobacter species enteropathogenic for man and animals / D. Linton, R.J. Owen, J. Stanley // Research in Microbiology. – 1996. – vol. 147 is. 9 –p. 707-718. DOI: 10.1016/s0923-2508(97)85118-2.

132. Little, C.L. Campylobacter and Salmonella in raw red meats in the United Kingdom: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern / C.L. Little, J.F. Richardson, R.J. Owen, E. de Pinna, E.J. Threlfall // Food microbiology. – 2008. – vol. 25. – P. 538-543. DOI:10.1016/j.fm.2008.01.001

133. Liu, N.T. Ralstonia insidiosa serves as bridges in biofilm formation by foodborne pathogens Listeria monocytogenes, Salmonella enterica, and Enterohemorrhagic Escherichia coli / N.T. Liu, G.R. Bauchan, C.B. Francoeur, D.R. Shelton, Y.M. Lo, X. Nou // Food Control. – 2016. – vol. 65. –p. 14-20. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.01.004

134. Lv, L. Exposure to mutagenic disinfection byproducts leads to increase of antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa / L. Lv, T. Jiang, S. Zhang, X. Yu // Environmental Science and Technology – 2014. – vol. 48. – p. 8188-8195. DOI: 10.1021/es501646n.

135. Lynch, K.M. Physiology of acetic acid bacteria and their role in vinegar and fermented beverages / K.M. Lynch, E. Zannini, S. Wilkinson, L. Daenen, E.K. Arendt // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety – 2019. – vol. 18. – p. 587-625. DOI: 10.1111/1541-4337.12440.

136. Machado, E. Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β-lactamases among Enterobacteriaceae isolates recovered from chickens and swine in Portugal / E. Machado, T.M. Coque, R. Cantón, J.C. Sousa, L. Peixe, // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2008. – vol. 62 (2). – p. 296-302. DOI: 10.1093/jac/dkn179

137. Malley, T. J. V. The Seek and Destroy Process: *Listeria monocytogenes* Process Controls in the Ready-to-Eat (RTE) Meat and Poultry Industry.

inpreparation. / T. J. V. Malley, J. Butts, M. Wiedmann // National library of medicine – 2014. – p. 436-445. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-13-507

138. Mallick, S. Biodegradation of acenaphthene by Sphingobacterium sp. strain RTSB involving trans-3-carboxy-2-hydroxybenzylidenepyruvic acid as a metabolite / S. Mallick, // Chemosphere – 2019 – vol. 219 –p. 748–755. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.12.046

139. Marshag, P.A. Response of microbial adhesives and biofilm matrix polymers to chemical treatments as determined by interference reflection microscopy and light section microscopy / P.A. Marshag, G.I. Loeb, M.M. Cowan, M. Fletcher // Applied and environmental microbiology. – 1989. – vol. 55. – p. 2827–2831. DOI: 10.1128/aem.55.11.2827-2831.1989

140. McDougald, D. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal / D.McDougald, S. Rice, N. Barraud, // Nature Reviews Microbiology. – 2011. – 10:39–50. Doi: 10.1038/nrmicro2695

141. Meireles, A. Alternative disinfection methods to chlorine for use in the fresh-cut industry / A. Meireles, E. Giaouris , M. Simões // Food Research International – 2016. – vol. 82. – p. 71-85. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.01.021.

142. Merino, L. Biofilm formation by Salmonella sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategie / L. Merino, F. Procura, F.M. Trejo, D.J. Bueno, M. A. Golowczyc // Food Research International. – 2019. – vol. 119. –p. 530-540. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.11.024

143. Muhammad, M.H. Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches / M.H. Muhammad, A.L. Idris, X. Fan, Y. Guo, Y. Yu, X. Jin, J. Qiu, X. Guan, T. Huang, // Frontiers in Microbiology. – 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00928

144. Murakami, K. Explorative gene analysis of antibiotic tolerance-related genes in adherent and biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa* / K. Murakami, T. Ono, Y. Noma, I. Minase, T. Amoh, Y. Irie, K. Hirota, Y. Miyak // Journal of

Infection and Chemotherapy. – 2017. – vol. 23 (5). – p. 271–277. DOI: 10.1016/j.jiac.2017.01.004.

145. Nair, A. Biofilm formation abd genetic diversity of Salmonella isolates recovered from clinical, food, poultry and environmental sources / A. Nair, D.B. Ranwool, S. DOIjad, K. Poharkar, V. Mohan, S.B. Barbuddhe, R. Kolhe, N.V. Kurkure, A. Kumar, S.V.S. Malik, T. Balasaravanan // Infection, Genetics and Evolution. – 2015. – vol. 36. –p. 424-433. DOI: 10.1016/j.meegid.2015.08.012

146. Nastasijevic, I. Tracking of Listeria monocytogenes in meat establishment using Whole Genome Sequencing as a food safety management tool: A proof of concept / I. Nastasijevic, D. Milanov, B. Velebit, V. Djordjevic, B. Lakicevic // International Journal of Food Microbiology. – 2017. – vol. 257. –p. 157-164. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.015.

147. Nowak, A. The effects of thyme (Thymus vulgaris) and rosemary (Rosmarinus officinalis) essential oils on Brochothrix thermosphacta and on the shelf life of beef packaged in high-oxygen modified atmosphere. /Agnieszka Nowak, Danuta Kalemba, Lucjan Krala, Malgorzata Piotrowska, Agata Czyzowska // Food Microbiology. – 2012. – vol. 32. - №1. – P. 212-216. DOI: 10.1016/j.fm.2012.05.001.

148. Ölmez, H. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact LWT / H. Ölmez, U. Kretzschmar // Food Sci. Technol. – 2009. – vol. 42. – p. 686-693. DOI: 10.1016/j.lwt.2008.08.001.

149. Overbeek R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST) / R. Overbeek, R. Olson, G.D. Pusch, G.J. Olsen, J.J. Davis, T. Disz, R.A. Edwards, S. Gerdes, B. Parrello, M. Shukla, V. Vonstein, A.R. Wattam, F. Xia, R. Stevens, // Nucleic Acids Research. – 2014. – vol. 42. DOI: 10.1093/nar/gkt1226

150. Patange, A. Controlling Brochothrix thermosphacta as a spoilage risk using in-package atmospheric cold plasma / A. Patange, D. Boehm, C. Bueno-

Ferrer, P.J. Cullen, P. Bourke, // Food Microbiology. – 2017. – in press. DOI: 10.1016/j.fm.2017.04.002.

151. Patrulea, V. An Update on Antimicrobial Peptides (AMPs) and Their Delivery Strategies for Wound Infections / V. Patrulea, G. Borchard, O. Jordan, // Pharmaceutics. – 2020. – 12(9):840. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090840.

152. Pereira, A.L. Diarrhea-associated biofilm formed by enteroaggregative Escherichia coli and aggregative Citrobacter freundii: a consortium mediated by putative F pili / A.L. Pereira, T.N. Silva, A.C. Gomes, A.C. Araújo, L.G. Giugliano // BMC Microbiology – 2010. – vol. 23. –p. 10-57. DOI: 10.1186/1471-2180-10-57

153. Perez-Arnedo, I. Prevalence of *Campylobacter spp*. in poultry in three spanish farms, a slaughterhouse and a further processing plant. / I. Perez-Arnedo, E. Gonzalez-Fandos, // Foods. – 2019. – vol. 8, no. 3 – p. 111. DOI: 10.3390/foods8030111

154. Petrova, O.E. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion / O.E. Petrova, K. Sauer // Current Opinion in Microbiology. – 2016. – vol. 30. – p. 67–78. DOI: 10.1016/j.mib.2016.01.004.

155. Pina M. Fratamico, Bassam A. Annous and Nereus W. Gunther. Biofilms in the Food and Beverage Industries / M. P. Fratamico, A. B. Annous, N. W. Gunther, // A volume in Woodhead Publishing Series in Food Science. – 2009. – 600 p.

156. Pinheiro, J. MouR controls the expression of the Listeria monocytogenes Agr system and mediates virulence / J. Pinheiro, J. Lisboa, R. Pombinho, F. Carvalho, A. Carreaux, C. Brito, A. Pöntinen, H. Korkeala, N.M.S Dos Santos, J.H. Morais-Cabral, S. Sousa, D. Cabanes. // Nucleic Acids Res. – 2018. – V. 46(18). –p. 9338-9352. DOI: 10.1093/nar/gky624

157. Prachantasena, S. Distribution and genetic profiles of Campylobacter in commercial broiler production from breeder to slaughter in Thailand/ S. Prachantasena, P. Charununtakorn, S. Muangnoicharoen, L. Hankla, N. Techawal, P. Chaveerach, P. Tuitemwong, N. Chokesajjawatee, N. Williams,

T. Humphrey, T. Luangtongkum, // PLOS One. – 2016. – vol. 11. – p. 1-16. DOI: 10.1371/journal.pone.0149585

158. Puga, C.H., San Jose C., Orgaz B. Biofilm development at low temperatures enhances Listeria monocytogenes resistance to chitosan / C.H. Puga, C. San Jose, B. Orgaz // Food control. – 2016. – vol. 65. –p. 143-151. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.01.012

159. Raghupathi, P. K. Synergistic interactions within a multispecies biofilm enhance individual species protection against grazing by a pelagic protozoan / P.K. Raghupathi, W. Liu, K. Sabbe, K. Houf, M. Burmolle, S.J. Sorensen, // Frontiers in Microbiology. – 2017. – 8:2649. DOI:10.3389/fmicb.2017.02649

160. Rajaee M. Identification of serotypes and virulence markers (stx) of Escherichia coli isolated from patients with diarrhea in Shiraz, Iran. / M. Rajaee, A. Emamib, A. Bazargania, N. Pirbonyehb, A. Moattari // Gene Reports. – 2017. – V. 6. – P. 49-53.

161. Rajagopal, R. Evaluation of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay, 3MTM Molecular Detection Assay 2 – Campylobacter, for the detection of Campylobacter from poultry matrices / R. Rajagopal, C.A. Barnes, J.M. David, J. Goseland, J. Goseland //British Poultry Science – 2021– vol. 62 is.3, –p. 404-413, DOI: 10.1080/00071668.2021.1879992

162. Randall L. P. Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and carbapenem-resistant Escherichia coli. / L. P. Randall, M. P Lodge, N. C. Elviss, F. L. Lemma, K. L. Hopkins, C. J. Teale, N. Woodford // International Journal of Food Microbiology. – 2017. – V. 241. – №16. – P. 283-290.

163. Rico, D. Extending and measuring the quality of fresh-cut fruit and vegetables / D. Rico, A.B. Martin-Diana, J.M. Barat, C. Barry-Ryan // Trends in Food Science and Technology. – 2007. – vol. 18 (7). – p. 373-386. DOI: 10.1016/j.tifs.2007.03.011

164. Riedel, C. U. AgrD-dependent quorum sensing affects biofilm formation, invasion, virulence and global gene expression profiles in Listeria monocytogenes. / C. U. Riedel, I. R. Monk, P.G. Casey, M. S. Waidmann, C. G. Gahan,C. Hill // Molecular Microbiology. –2009. – V. 71(5). DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06589.x
165. Rocha, A.J. Pseudomonas Aeruginosa: Virulence Factors and Antibiotic Resistance Genes / A.J. Rocha, M.R. de Oliveira Barsottini, R.R. Rocha et al. //Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2019. - N62. – ст.19180503. DOI: 10.1590/1678-4324-2019180503
166. Roling, W. Characterization of Tetragenococcushalophila populations in Indonesian soy mash (Kecap) fermentation / W. Roling, H.W. Van Verseveld, // Applied and Environmental Microbiology – 1996. – vol. 62 no. 4 –p. 1203–1207. DOI: 10.1128/aem.62.4.1203-1207.1996
167. Rossi, G.I. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation / G.I. Rossi, R.C.C. Dantas, M.L. Ferreira, D.W.D.F. Batistão, P. P. Gontijo-Filho, R. M. Ribas // Brazilian Journal of Microbiology. – 2017. – vol. 48 (2). – p. 211–217. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.11.004.
168. Roy, R. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action / R. Roy, M. Tiwari, G. Donelli, V. Tiwari, // Virulenc. – 2018. – vol. 9 – P. 522–554. DOI: 10.1080/21505594.2017.1313372
169. Russell, A. Do biocides select for antibiotic resistance? / A. Russell, // Journal of Pharmacy Pharmacology – 2000. – vol. 52. – p. 227-233. DOI: 10.1016/S0964-8305(03)00039-8.
170. Sánchez, L. *Campylobacter jejuni* survival in a poultry processing plant environment / L. Sánchez, B. Melero, I. Jaime, M. L. Hänninen, M. Rossi, Rovira, // Journal Food Microbiology. – 2017. – vol. 65 – p. 185-192. DOI: 10.1016/j.fm.2017.02.009

171. Sarah, R. Beveridge Membrane Vesicles: an Overlooked Component of the Matrices of Biofilms / R. Sarah, T.J. Schooling, // Journal of Bacteriology. – 2006. – vol. 188, No. 16. – p. 5945–5957 DOI: 10.1128/JB.00257-06
172. Sasaki, Y. Campylobacter cross-contamination of chicken products at an abattoir / Y. Sasaki, N. Maruyama, B. Zou, M. Haruna, M. Kusukawa, M. Murakami, T. Asai, Y. Tsujiyama, Y. Yamada, // Zoonoses Public Health. – 2012. – vol. 60. – p. 134-140. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2012.01509.x
173. Saxena, P. Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms / P. Saxena, Y. Joshi, K. Rawat, R. Bisht, // Indian Journal of Microbiology. – 2018. DOI: 10.1007/s12088-018-0757-6
174. Shan, X. Rapid Detection of Food-borne *Listeria monocytogenes* by Real-time Quantitative Loop-mediated Isothermal Amplification / X. Shan, Y. Zhang, Z.Zhang, M. Chen, , Y. Su, , Y. Yuan, M. Jahangir Alam, H. Yan, L. Shi // Food science and biotechnology. – 2012. – vol. 21. no. 1. – p. 101-106. DOI:10.1007/s10068-012-0012-6
175. Shepherd, J. Best served small: nano battles in the war against wound biofilm infections / J. Shepherd, // Emerging Topics in Life Science. – 2020. – ETLS20200155. DOI: 10.1042/ETLS20200155.
176. Shi, W. Fatal attraction. / W. Shi, D. R. Zusman // Nature. – 1993. – V. 366. – p. 414–415. DOI 10.1038/366414a0
177. Shkodenko, L. Metal Oxide Nanoparticles Against Bacterial Biofilms: Perspectives and Limitations. Microorganisms / L. Shkodenko, I. Kassirov, E. Koshel, // Microorganisms. – 2020. – 7;8(10):1545. DOI: 10.3390/microorganisms8101545.
178. Silva Fernandes, M. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm with Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium and control through sanitation procedures / M. Silva Fernandes, D.Y. Kabuki, A.Y. Kuaye, // International Journal of Food Microbiology. – 2015. – vol. 200. – p. 5–12. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.003

179. Silva, V. O. Biofilm formation on biotic and abiotic surfaces in the presence of antimicrobials by *Escherichia coli* isolates from cases of bovine mastitis / V.O. Silva, L.O. Soares, A. Silva Junior, H.C. Mantovani, Y.F. Chang, M.A. Moreira, // Applied and Environmental Microbiology. – 2014. – vol. 80. – p. 6136–6145. DOI: 10.1128/AEM.01953-14
180. Singh P. Multiplex real-time PCR assays for detection of eight Shiga toxin-producing Escherichia coli in food samples by melting curve analysis / P. Singh, A. Mustapha // International Journal of Food Microbiology. – 2015. – V. 215. – №23. – P.101-108. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.022
181. Skovgaard N. Detection of Listeria spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin / N. Skovgaard, C.A. Morgen, // International Journal of Food Microbiology. – 1988. – Vol. 6. Issue 3. – P. 229-242. DOI: 10.1016 / 0168-1605 (88) 90015-3.
182. Sofos, J.N. Biofilms: Our Constant Enemies / J.N. Sofos // Food safety magazine – 2009.
183. Solano, C. Biofilm dispersion and quorum sensing / C. Solano, M. Echeverz, I. Lasa // Current Opinion in Microbiology. – 2014. – vol. 18. – p. 96-104. DOI: 10.1016/j.mib.2014.02.008
184. Somers, E.B. Effect of trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157: H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* / E.B. Somers, L.S. Jean, A.C.L. Wong // International Journal of Food Microbiology. – 1994. – vol. 22 (4). – p. 269–276. DOI: 10.1016/0168–1605(94)90178–3.
185. Swaminathan, B. The epidemiology of human listeriosis / B Swaminathan, P. Gerner-Smidt, // Microbes and Infection. – 2007. – vol. 9 (10). – p. 1236–1243. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.011
186. Tasara, T. Cold stress tolerance of *Listeria monocytogenes*: a review of molecular adaptive mechanisms and food safety implications / T. Tasara, R. Stephan, // Journal of food protection. – 2006. – vol. 69. №6. – p.1473–1484. DOI: 10.4315/0362-028x-69.6.1473

187. Teteneva, N.A. Multiple Drug-Induced Stress Responses Inhibit Formation of *Escherichia coli* Biofilms / N.A. Teteneva, S.V. Mart'yanov, María Esteban-López, Jörg Kahnt, Timo Glatter, A.I. Netrusov, V.K. Plakunov, Victor Sourjik, // Apllied and Environmental Microbiology. – 2020. – vol 86, no 21. DOI: 10.1128/AEM.01113-20
188. Tezel, U. Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology / U. Tezel, S.G. Pavlostathis, // Current Opinion in Biotechnology – 2015. – vol. 33. – p. 296-304. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.025.
189. Tholozan, J.L. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells / J.L Tholozan, J.M. Cappelier, J.P. Tissier, G. Delattre, M. Federighi, // Applied and Environmental Microbiology. – vol. 65 (3). – p. 1110-1116. DOI: 10.1128/AEM.65.3.1110-1116.1999
190. Tofant, A. The hydrogen peroxide, as a potentially useful slurry disinfectant / A. Tofant, M. Vucemilo, Z. Pavicic, D. Milic // Livestock Science – 2006. – vol. 102. – p. 243-247. DOI: 10.1016/j.livsci.2006.03.022.
191. Tom C.J. Using ecological diversity measures with bacterial communities / C.J.T. Hill, A.K. Walsh, A.J. Harris, F.B. Moffett, // FEMS Microbiology Ecology**.** **–** 2003 **–** vol. 43 is. 1 **–** p**.** 1–11. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2003.tb01040.x
192. Tomaras, A.P. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system / A.P. Tomaras, C.W. Dorsey, R.E. Edelmann, L.A. Actis // Microbiology. – 2003. – vol. 149 (12). – p. 3473–3484. DOI: 10.1099/mic.0.26541–0.
193. Turki, Y. Biofilms in bioremediation and wastewater treatment: characterization of bacterial community structure and diversity during seasons in municipal wastewater treatment process / Y. Turki, I. Mehri, R. Lajnef, A. Ben Rejab, A. Khessairi, H. Cherif, H. Ouzari, A. Hassen, // Environmental

Science and Pollution Research. – 2017. – vol. 24 is.4 –p. 3519–3530. DOI: 10.1007/s11356-016-8090-2

194. U.S. Food and Drug administration. Control of Listeria monocytogenes in Ready-To-Eat Foods: Guidance for Industry Draft Guidance [Электронный ресурс]. – 2017 – Режим доступа: https://www.fda.gov/files/food/published/Draft-Guidance-for-Industry--Control-of-Listeria-monocytogenes-in-Ready-To-Eat-Foods-%28PDF%29.pdf

195. Van Loosdrecht M.C.H. Bacterial Adhesion / M.C.H. Van Loosdrecht // Wageningen. – 1988. – p. 200.

196. Vandekinderen, I. Optimization and evaluation of a decontamination step with peroxyacetic acid for fresh-cut produce / I. Vandekinderen, F. Devlieghere, B. De Meulenaer, P. Ragaert, J. Van Camp // Food Microbiology – 2009. – vol.26. – p. 882-888. DOI: 10.1016/j.fm.2009.06.004.

197. Vitse, J. The Contribution of Membrane Vesicles to Bacterial Pathogenicity in Cystic Fibrosis Infections and Healthcare Associated Pneumonia / J. Vitse, B. Devreese, // Frontiers in Microbiology. – 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00630

198. Wang, H. Biofilm formation by meat-borne *Pseudomonas fluorescens* on stainless steel and its resistance to disinfectants / H. Wang, L. Cai, Y. Li, X. Xu, G. Zhou // Food Control. – 2018a. – vol. 91. – p. 397–403. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.04.035.

199. Wang, H. Characterization of attachment and biofilm formation by meat-borne Enterobacteriaceae strains associated with spoilage / H. Wang, J. Qi, Y. Dong, Y. Li, X. Xu, G. Zhou // LWT. – 2017. – vol. 86. –p. 399-407. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.08.025

200. Wang, H. Comparison of microbial transfer rates from Salmonella spp. biofilm growth on stainless steel to selected processed and raw meat / H. Wang, X. Zhang, Q. Zhang, K.Y. Xinglian, X.G. Zhou // Food control. – 2015. – vol. 50. –P. 574-580. DOI: 10.1016/j.foodcont.2014.09.049

201. Wang, H. Prevalence, genetic characterization and biofilm formation in vitro of staphylococcus aureus isolated from raw chicken meat at retail level in Nanjing, China. / H. Wang, H. Wang, L. Liang, X. Xu, G. Zhou // Food control. – 2018b. – vol. 86. –p. 11-18. DOI: 10.1016/j.foodcont.2017.10.028
202. Wang, R. Biofilms and Meat Safety:A Mini-Review / R. Wang // J. of Food Prot. – 2019. – № 82 – P. 120-127.
203. Wani, S.A. Putative virulence genes and biofilm production among typical enteroaggregative Escherichia coli isolates from diarrhoeic children in Kashmir and Andhra Pradesh / S.A. Wani, I. Hussain, M.A. Rather, Z.A. Kabli, K. Nagamani, Y. Nishikawa, S.D. Qureshi, I. Khan // Indian Journal of Microbiology. – 2012. – vol. 52. –p. 587-592. DOI: 10.1007/s12088-012-0284-9
204. Warriner, K. What is the hysteria with Listeria? / K. Warriner, A. Namvar // Trends in Food Science & Technology. – 2009. – vol. 6. no. 20. – p. 245-254. DOI: 10.1016/j.tifs.2009.03.008
205. WHO. A report about Campylobacter [Электронный ресурс]. – 2020. – Режим доступа: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter
206. WHO. Foodsafety. – 2020. [Электронный ресурс]. Режим доступа: www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety.
207. Wideman, N. Evaluating best practices for Campylobacter and Salmonella reduction in poultry processing plants / N. Wideman, M. Bailey, S. Bilgili, H.Thippareddi, L. Wang, C. Bratcher, M. Sanchez, / Poultry Science. – 2015. – vol. 95, no. 2. – p. 306-315. DOI: 10.3382/ps/pev328
208. Willey, J. Prescott's Microbiology Hardcover / J. Willey, L. Sherwood, C. J. Woolverton // McGraw Hill – 2016. – P. 2272.
209. Wirtanen, G. Removal of foodborne biofilms - comparison of surface and suspension tests. Part I. / G. Wirtanen, T. MattIIa-Sandhohn // Lebensmittel-Wissenschaft Technologie. – 1992. – vol. 25. –p. 43-49.

210. Woyke, T. Complete genome sequence of the gliding freshwater bacterium Fluviicola taffensis type strain (RW262). / T. Woyke, O. Chertkov, A. Lapidus, M. Nolan, S. Lucas, T.G. Del Rio, H. Tice, J.F. Cheng, R. Tapia, C. Han, L. Goodwin, S. Pitluck, K. Liolios, I. Pagani, N. Ivanova, M. Huntemann, K. Mavromatis, N. Mikhailova, A. Pati, A. Chen, K. Palaniappan, M. Land, L. Hauser, E.M. Brambilla, M. Rohde, R. Mwirichia, J. Sikorski, B.J. Tindall, M. Göker, J. Bristow, J.A. Eisen, V. Markowitz, P. Hugenholtz, H.P. Klenk, N.C. Kyrpides, // Standards in Genomic Sciences. – 2011. – vol. 5 is.1 –p. 21-29. DOI: 10.4056/sigs.2124912.

211. Xianqin, Yang. Frances Tran Biofilm formation and susceptibility to biocides of recurring and transient Escherichia coli isolated from meat fabrication equipment / Yang Xianqin, Wang Hui, He Annie// Food control. – 2018. – vol. 90. –p. 205-211. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.02.050

212. Xinyi, P. Stress response and survival of Salmonella Enteritidis in single and dual species biofilms with Pseudomonas fluorescens following repeated exposure to quaternary ammonium compounds / P. Xinyi, C.Lin, Y. Hyun-Gyun // International Journal of Food Microbiology – 2020. – vol. 325. – p. 651-660. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108643.

213. Youngmee, J. Antimicrobial resistance: a threat to global health / J. Youngmee, C. Johan, R. Eric, M. Kunda, H.T.T. Giang, D. Paula, S. Wanchai, Y. Taeho // The Lancet Infectious Diseases – 2018. –vol. 18. – p. 939-940. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30471-7.

214. Yuan, L. Mixed-species biofilms in the food industry: Current knowledge and novel control strategies. / L. Yuan, M. F. Hansen, H. L. Røder et al. // F. Sc.and Nutrition. – 2019. – №1. – P. 1-17.

215. Yue, Huan. Label-free electrochemiluminescent biosensor for rapid and sensitive detection of *pseudomonas aeruginosa* using phage as highly specific recognition agent / H. Yue, Y. He, E. Fan, L. Wang, S. Lu, Z. Fu, // Biosensors and Bioelectronics. – 2017. – vol. 94. – P. 429-432. DOI: 10.1016/j.bios.2017.03.033

216. Yuk, H.G. Effectiveness of individual or combined sanitizer treatments for inactivating Salmonella spp. on smooth surface, stem scar, and wounds of tomatoes / H.G. Yuk, J.A. Bartz, K.R. Schneider // Journal of Food Science – 2005. – vol. 70. – p. 409-414. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb08326.x10.1111/j.1365-2621.2005.tb08326.x.
217. Yuk, H.G. The effectiveness of sanitizer treatments in inactivation of Salmonella spp. from bell pepper, cucumber, and strawberry / H.G. Yuk, J.A. Bartz, K.R. Schneider, // Journal of Food Science – 2006. – vol.71. – p. 95-99. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2006.tb15638.x.
218. Zafar, U. Proteus mirabilis as a pathogenic organism. / U. Zafar, M. K.Taj, I. Nawaz et al. // International Journal of Biosciences. – 2019. - N14(03). – p. 443-450. DOI: 10.12692/ijb/14.3.443-450
219. Zhang, Q. Antibiotic resistome alteration by different disinfection strategies in a full-scale drinking water treatment plant deciphered by metagenomic assembly / H. Zhang, F. Chang, P. Shi, L. Ye, Q. Zhou, Y. Pan, M. Li // Environmental Science and Technology – 2019. – vol. 53. – p. 2141-2150. DOI: 10.1021/acs.est.8b05907.
220. Zhang, Y. Subinhibitory concentrations of disinfectants promote the horizontal transfer of multidrug resistance genes within and across genera / Y. Zhang, A. Z. Gu, M. He, D. Li, J. Chen // Environmental Science and Technology – 2017. – vol. 51. – p. 570-580. DOI: 10.1021/acs.est.6b03132.
221. Zhao, C. Prevalence of *Campylobacter spp*., *Escherichia coli* and *Salmonella* serovars in retail chicken, turkey, pork and beef from the greater Washington D. C. Area / C. Zhao, G.E. Beilei, De Villena J, R. Sudler, E. Yeh, S. Zhao, D.G. White, D. Meng. J Wagner, // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – vol. 67, no. 12. – p. 5431-5435. DOI: 10.1128/AEM.67.12.5431-5436.2001
222. Zhou, L. Regulatory mechanisms and promising applications of quorum sensing-inhibiting agents in control of bacterial biofilm formation / L. Zhou,

Y. Zhang, Y. Ge, X. Zhu, J. Pan, // Frontiers in Microbiology. – 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.58964

223. Zhurina, M.V. Composition and functions of the extracellular polymer matrix of bacterial biofilms / M.V. Zhurina, A.V. Gannesen, E. L. Zdorovenko, V.K. Plakunov, // Microbiology. – 2014. – vol. 83. № 6. – p. 713-722. DOI:10.1134/S002626171406023X

224. Ziprin, R.L. Failure of viable nonculturable *Campylobacter jejuni* to colonize the cecum of newly hatched Leghorn chicks / R.L. Ziprin, R.E. Droleskey, M.E. Hume, R.B. Harvey, // Avian Diseases. – 2003. – 47 (3). – p. 753-758 DOI: DOI:10.1637/7015

225. Zoellner, C. Peracetic acid in disinfection of fruits and vegetables / C. Zoellner, A. Aguayo-Acosta, M.W. Siddiqui, J.E. Dávila-Aviña // Postharvest disinfection of fruits and vegetables – 2018. – p. 53-66. DOI: 10.1016/B978-0-12-812698-1.00002-9.

226. Zottola, E.A. Microbial biofilms in the food processing industry— Should they be a concern? / E.A. Zottola, K.C. Sasahara // International Journal of Food Microbiology. – 1994. – vol. 23. is. 2. –p. 125-148. DOI: 10.1016/0168-1605(94)90047-7

227. Банников, В.Н. Современное развитие дезинфектологии в птицеводстве на примере препарата «ВИРОЦИД». [Эллектроный ресурс] / В.Н. Банников. – 2017. – Режим домтупа: https://docplayer.com/34313278-Sovremennoe-razvitie-dezinfektologii-v-pticevodstve-na-primere-preparata-virocid.html

228. Батаева Д.С. Анализ зависимости результатов микробиологических исследований от методов отбора проб мяса и мясных продуктов / Д.С. Батаева, А.А. Махова, // Все о мясе. – 2017. – №2. – С. 43-45.

229. Батаева Д.С. Оценка микробиологической стабильности мясных крупнокусковых полуфабрикатов в процессе хранения / Д.С. Батаева, Е.В. Зайко, Ю.К. Юшина, // Все о мясе. – 2019. – №5. – С. 24-27. DOI: 10.21323/2071-2499-2019-5-24-27.

230. Бахир, В.М. Эффективность и безопасность химических средств для дезинфекции, предстерилизационной очистки и стерилизации / В.М. Бахир, В.И. Вторенко, Б.И. Леонов // Дезинфекционное дело. – 2003. – № 1. – с. 29-36.
231. Безопасность продуктов питания. Информационный бюллетень ВОЗ [Электронный ресурс] – 2015. Режим доступа: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/ru/
232. Бессарабов, Б. Ф. Инфекционные болезни животных / Б. Ф. Бессарабов, А. А. Вашутин, Е. С. Воронин; Под ред. А. А. Сидорчука. – М.: Колос. – 2007. – 671 с.
233. Боровков, М. Ф. Ветеринарно-санитарная экспертиза с основами технологии и стандартизации продуктов животноводства: учебник / М. Ф. Боровков, В. П. Фролов, С. А. Серко; под редакцией М. Ф. Боровкова. – 4-е изд., стер. – Санкт-Петербург: Лань, 2013. – 480 с.
234. Бунецкая, О. Очистка и дезинфекция оборудования на мясоперерабатывающих предприятиях / О. Бунецкая // Мясные технологии – 2011. - № 9(105). – С. 32-33.
235. ВОЗ публикует список бактерий, для борьбы с которыми срочно требуется создание новых антибиотиков. Выпуск новостей. – 2017. – [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/ru/
236. Воронина О. Л. Анализ спорадических случаев инвазивного листериоза в мегаполисе / О. Л. Воронина, И. С. Тартаковский, Н. Д. Ющук, Н. Н. Рыжова, Е. И. Аксёнова, М. С. Кунда, А. В. Кутузова, А. Г. Мелкумян, Т. И. Карпова, О. А. Груздева, Е. А. Климова, Г. Н. Кареткина, О. Ю. Чемерис, Т. А. Тарасова, Ю. Е. Дронина, О. Е. Орлова, Е. Н. Бурмистрова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2020. – 97(6). DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-6-3

237. Воронина О. Л. Закономерности селекции полигостальных убиквитарных микроорганизмов на примере представителей трех таксонов / О. Л. Воронина, М. С. Кунда, Н. Н. Рыжова, Е. И. Аксенова, А. Н. Семенов, М. А. Курнаева // Молекулярная биология. – 2015. – 49(3). – p. 430-441. DOI: 10.7868/S0026898415030179
238. Воронина, О.Л., Кунда, М.С., Рыжова, Н.Н., Кутузова, А.В., Аксенова, Е.И., Карпова, Т.И. и др. Листериоз. Генотипирование как ключ к выявлению возможного источника заражения. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019; 21(4):261-273. DOI: 10.36488/cmac.2019.4.261-273
239. Ганнесен, А. В. Регуляция процесса формирования биопленок *Pseudomonas chlororaphis* в системе invitro / А.В. Ганнесен, М.В. Журина, М.А. Веселова, И.А. Хмель, В.К. Плакунов, // Микробиология. – 2015. – Т. 84. № 3. – с. 281-290. DOI: 10.1134/S0026261715030042
240. Гершун, В.И. Листериоз сельскохозяйственных животных / В.И. Гершун. – Алма-Ата: Кайнер, 1981. – 96 с.
241. Глушанова, Н.А. Бактериальные биоплёнки в инфекционной патологии человека / Н.А. Глушанова, А.И. Блинов, Н.Б. Алексеева // Медицина в Кузбассе. – 2015. – Спецвыпуск 2. – С. 30–35.
242. Годова, Г. В., Формирование биопленок *Listeria monocytogenes* при взаимодействии с клетками овощных культур / Г. В. Годова, В. И. Пушкарева, Е. А. Калашникова, А. А. Овод, Л. В. Диденко, А. Н. Князев, С. А. Ермолаева // Известие ТСХА. – 2013. – выпуск 5.
243. Емшанов, О.В. Разработки для детекции и деструкции биологических плёнок бактерий на абиотических поверхностях/ О.В. Емшанов, // Научно-практическая конференция-выставка FOOD SAFETY 2020. Москва. – 2020. https://foodsmi.com/a1147/
244. Ефимочкина Н.Р. Эмерджентные бактериальные автогены в пищевой микробиологии // М.: Издательство РАМН, – 2008. – С. 256.

245. Ефимочкина, Н.Р. Изучение характера контаминации и уровней содержания бактерий рода Campylobacter в отдельных видах пищевой продукции / Н.Р. Ефимочкина, И.Б. Быкова, В.В. Стеценко, Л.П. Минаева, Т.В. Пичугина, Ю.М. Маркова, Ю.В. Короткевич, С.С. Козак, С.А. Шевелева, // Вопросы питания. – 2016. – Том 85. - №5. – С. 52-59.
246. Журина, М. В. Роль внеклеточного полимерного матрикса в защитном эффекте при действии антибиотика азитромицина на *Chromobacterium violaceum* / М.В. Журина, Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов, // Микробиология. – 2019. Т. 88. № 4. – с. 497-500. DOI: 10.1134/S0026365619040153
247. Захарова, Н.Г. Краткий курс по микробиологии, вирусологии и иммунологии / Н. Г. Захарова, В.И. Вершинина, О.Н. Ильинская. – Казань: – 2015. – 779 с.
248. Информационный бюллетень ВОЗ. Безопасность продуктов питания [Электронный ресурс]. – 2015. – Режим доступа: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs399/ru/ 19
249. Кампилобактериоз. Информационный бюллетень ВОЗ. - №255. – 2011. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/ru/
250. Костенко, Ю. Г. «Руководство по санитарно-микробиологическим основам и предупреждению рисков при производстве и хранении мясной продукции» // Москва: ТЕХНОСФЕРА, 2015.
251. Костенко, Ю.Г. Инструкция по санитарной обработке оборудования на предприятиях пищевой промышленности / Ю.Г. Костенко, В.О. Рыбалтовский. – М.: ВНИИ мясной промышленности им. В.М. Горбатова, 2003. – с. 128-133.
252. Кравченюк, Х.Ю. Формирование биоплёнки *E. coli* на поверхности нержавеющей стали AISI 321, в зависимости от шероховатости поверхности / Х.Ю. Кравченюк, М. Д. Кухтин, В. В. Лазарюк // Вестник

Херсонского национального технического университета. – 2016. – № 1 (56). – С. 95–100.

253. Красильников, А.А. Листериоз. Актуальные вопросы профилактики на предприятиях пищевой промышленности [Электронный ресурс] / А.А. Красильников, В.П. Филонов, А.С. Долгин. – 2015. Режим доступа: http://produkt.by/story/listerioz-aktualnye-voprosy-profilaktiki-na-predpriyatiyah-pishchevoy-promyshlennosti

254. Логанин П. Листерия на птицеперерабатывающем предприятии / П. Логанин, // Сфера, ПТИЦЕПРОМ. – 2017. – №2 (36). – С. 56-59.

255. Макаров, В.В. Список МЭБ и трансграничные инфекции животных: монография / В. В. Макаров, В. А. Грубый, К. Н. Груздев, О. И. Сухарев. – Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ», 2012. – 162 с.

256. Мальцев, С.В. Что такое биопленка? / С.В. Мальцев, Г.Ш. Мансурова // Практическая медицина. – 2011. – № 5(53). –С. 7-10.

257. Малеев, Б. В. Внедрение аэрозольного комплекса «Защита» на предприятия агропромышленного комплекса России для профилактики инфекционных заболеваний сельскохозяйственных животных и птицы. [Электронный ресурс] / Б. В. Малеев. – 2008. Режим доступа: https://raex-a.ru ›inno_files›4187_1_29756_doc

258. Марданова, А.М. Биопленки: основные методы исследования: учебно-методическое пособие. / А.М. Марданова, Д.А. Кабанов, Н.Л. Рудакова, М.Р. Шарипова // Казань: К(П)ФУ. –2016. – –С.42.

259. Мелисбек Б. Санитарно-микробиологические показатели мяса при традиционных способах хранения / Б. Мелисбек, М.Б. Айматов, Л.Т. Майгулова, М. Омурзакова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2016. – №1 (57).

260. Николаев, Ю.А. Биопленка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? / Ю.А. Николаев, В.К. Плакунов // Микробиология. – 2007. – том 76. №2. –С. 149—163.

261. Окулич, В.К. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии: монография / В.К. Окулич, А.А Кабанова, Ф.В. Плотников. - Витебск: ВГМУ, 2017 - 300 с
262. Плакунов В. К. Новый подход к выявлениюзащитной роли *Esherichia coli* в отношении грамположительных бактерий при действии антибиотиков на бинарные биопленки / В.К. Плакунов, Ю.А. Николаев, А.В. Ганнесен, Д.С. Чемаева, М.В. Журина, // Микробиология. – 2019а. – Т. 88. № 3. – с. 288-296. DOI:10.1134/S0026365619030091
263. Плакунов В.К. Устойчивость нефтеокисляющего микроорганизма *Dietzia sp*. к гиперосмотическому шоку в реконструированных биопленках / В.К. Плакунов, М.В. Журина, С.С. Беляев, // Микробиология. – 2008. – Т. 77. № 5. – с. 581-589.
264. Плакунов, В. К. Антибиопленочные агенты: неоднозначность терминологии и стратегия поиска / В.К. Плакунов, М.В. Журина, А.В. Ганнесен, С.В. Мартьянов, Ю.А. Николаев, // Микробиология. –2019б. – том 88 № 6 – С. 705-709. DOI: 10.1134/S0026365619060144
265. Плакунов, В. К. Биокоррозия синтетических пластмасс: механизмы деградации и способы защиты/ В.К. Плакунов, А.В. Ганнесен, С.В. Мартьянов, М.В. Журина, // Микробиология. – 2020. – том 89 № 6. – С. 631-645. DOI: 10.31857/S0026365620060142
266. Плакунов, В.К. Управление формированием микробных биопленок: анти- и пробиопленочные агенты (обзор) / В.К. Плакунов, С.В. Мартьянов, Н.А. Тетенева, М.В. Журина, // Микробиология. – 2017. – том 86 № 4. – С. 402-420. DOI: 10.7868/S0026365617040127
267. Подволоцкая, А.Б. Современные аспекты санитарной обработки и дезинфекции производственной среды мясоперерабатывающих предприятий / А.Б. Подволоцкая, Е.С. Фищенко, О.М. Сон, М.А. Наумчик, Л.А. Балабанова, // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2016. - №12. – С. 28-30

268. Подколзин А.Т. Сезонность и возрастная структура заболеваемости острыми кишечными инфекциями на территории РФ / А.Т. Подколзин, Е.Б. Фенске, Н.Ю. Абрамычева, Г.А. Шипулин, Е.А. Дорошина, // Молекулярная диагностика инфекционных болезней. – 2015. – Т.III, Раздел 16. – С. 275-278.
269. Поломошнова, И.А. Эффективность различных дезинфектантов при дезинфекции птичника // Ветеренарная патология – 2015. – № 3. – С. 69-74.
270. Пономарева, А.Л. Исследование интенсивности образования биопленок Listeria monocytogenes при различных температурах / А.Л. Пономарева // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2016. – 2(65). –С. 38-39. DOI: 10.18411/hmes.d-2016-074
271. Стратегия повышения качества пищевой продукции в Российской Федерации до 2030 года от 29 июня 2016 г. №1364-р.
272. Синельникова М.А. Индикация *Listeria monocytogenes* в мясе и мясных продуктах на территории сельскохозяйственной провинции / М.А. Синельникова, Л.С. Бузолева, Н.Ю. Беспечук, Г.Г. Колтун // Гигиена и санитария – 2017. – 96(6). – С. 590-593. DOI: 10.1882/0016-9900-2017-96-6-590-593.
273. Стрелкова, Е. А. Стимуляция антибиотиками процесса формирования бактериальных биопленок./ Е.А. Стрелкова, М.В. Журина, В.К. Плакунов, С.С. Беляев, // Микробиология. – 2012. – том 81, № 2 – С.282-285. DOI: 10.1134/S0026261712020142
274. Стрелкова, Е.А. Роль внеклеточного полимерного матрикса в устойчивости бактериальных биопленок к экстремальным факторам среды./ Е.А. Стрелкова, Н.В. Позднякова, М.В. Журина, В.К. Плакунов, С.С. Беляев, // Микробиология. – 2013. – том 82 № 2. – С.131-138. DOI: 10.1134/S002626171302015X
275. Терещенко, В.С. Определение эффективности подавления кларитромицином и его генериками способности к

биопленкообразованию у Pseudumonas aeruginosa /В.С. Терещенко, А.В. Жестков, А.В. Лямин, // Бюллетень Оренбургского научного центра УРО РАН. – 2014. - №3. – С. 16.

276. Тутельян А.В. Образование биологических пленок микроорганизмов на пищевых производствах / А.В. Тутельян, Ю.К. Юшина, О.В. Соколова, Д.С. Батаева, А.Д. Фесюн, А.В. Датий, // Вопросы питания. – 2019. – Т. 88, № 3. – С. 32-43. DOI: 10.24411/0042-8833-2019-10027.

277. Хмель, И.А. QUORUM SENSING и коммуникация бактерий / И.А. Хмель, А.С. Белик, Ю.В. Зайцева, Н.Н. Данилова // Вестник Московского университета. Серия 16. – 2008. – №1. С. 28-35.

278. Хмель, И.А. Биоплёнки бактерий и связанные с ними трудности медицинской практики. Электронный ресурс. – Режим доступа: [https://img.ras.ru/files/center/biofilms.doc].

279. Хрянин, А.А. Современные представления о биопленках микроорганизмов / А.А. Хрянин, Г.Ю. Кнорринг, // Фарматека. – 2020. – №6. DOI: 10.18565/pharmateca.2020.6.34-42

280. Чеботарь, И.В. Новый метод количественного учета кокков в надклеточных образованиях – кластерах и биопленке / И.В. Чеботарь; Е.А. Таланин, Е.Д. Кончакова, // Современные технологии в медицине. – 2010. – №3. – с.14 – 16.

281. Шевелева, С.А., Ефимочкина Н.Р., Козак С.С., Минаева Л.П., Быкова И.Б., Пичугина Т.В., Маркова Ю.М., Короткевич Ю.В. Влияние традиционных технологий охлаждения на профиль патогенных микробных контаминантов мяса птицы отечественного производства / С.А. Шевелева, Н.Р. Ефимочкина, С.С. Козак, Л.П. Минаева, И.Б. Быкова, Т.В. Пичугина, Ю.М. Маркова, Ю.В. Короткевич // Вопросы питания. – 2016. – т. 85. № 2. –С. 38-39.

282. Юшина, Ю.К. Микробные контаминанты мяса: что нового? / Ю.К. Юшина, Д.С. Батаева, О.В. Соколова // Все о мясе – 2017. — № 4. – С 37.

283. Янковский, К. С. Санитарно-микробиологическая оценка листерий как показателя безопасности мясных продуктов: дисс. кандидата вет. наук : 16.00.08 / Константин Сергеевич Янковский. – М., 2000. – 186 с.

Приложение

Приложение А

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
"Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Обнаружение патогенных микроорганизмов (*Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes*) методом молекулярного анализа

Методические рекомендации
МР №- 01-00419779 -18

Москва
2018

1. Разработаны: Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (Ю.К. Юшина, Е.В. Зайко, Д.С. Батаева, М.А. Грудистова, А.А. Махова).

2. Утверждены и введены в действие Директором Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН
О. А. Кузнецовой 11 сентября 2018 г.

3. Введены впервые.

УТВЕРЖДАЮ
Врио Директора Федерального
государственного бюджетного
научного учреждения
« Федеральный научный центр
пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН

Кузнецова О.А.

1. Назначение и область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации распространяются на мясо (все виды убойных животных), полуфабрикаты, субпродукты, колбасные изделия, продукты из мяса, объекты окружающей производственной среды и устанавливают порядок обнаружения патогенных микроорганизмов рода Salmonella spp. и L.monocytogenes молекулярным методом качественного обнаружения на основе технологии петлевой изотермической амплификации ДНК (LAMP) и биолюминесцентной детекции.

1.2. Документ носит рекомендательный характер.

2.Нормативные ссылки

В настоящих рекомендациях использованы нормативные ссылки на следующие документы:
ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования
ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности
ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание
ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

Приложение Б

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
"Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Обнаружение *Campylobacter* spp. методом молекулярного анализа

Методические рекомендации
МР №- 781-00419779 -20

Москва
2020

1. Разработаны: Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (Ю.К. Юшина, Е.В. Зайко, Д.С. Батаева, М.А. Грудистова, А.А. Махова).

2. Утверждены и введены в действие Директором Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН
О. А. Кузнецовой 21 сентября 2020 г.

3. Введены впервые.

МР № - 781-00419779 -20

УТВЕРЖДАЮ
Директор Федерального
государственного бюджетного
научного учреждения
« Федеральный научный центр
пищевых систем
им. В.М. Горбатова»РАН
Кузнецова О.А.
«21» сентября 2020 г.

1. Назначение и область применения

1.1. Настоящие методические рекомендации распространяются на мясо (все виды убойных животных), полуфабрикаты, субпродукты, колбасные изделия, продукты из мяса, мясо птицы, смывы с тушек и частей тушек птицы, объекты окружающей производственной среды и устанавливают порядок обнаружения патогенных микроорганизмов рода Campylobacter spp. (Campylobacter jejuni, Campylobacter lari и Campylobacter coli) молекулярным методом качественного обнаружения на основе технологии петлевой изотермической амплификации ДНК (LAMP).

1.2. Документ носит рекомендательный характер.

2. Нормативные ссылки

В настоящих рекомендациях использованы нормативные ссылки на следующие документы:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ OIML R 76-1 Государственная система обеспечения единства измерений. Весы неавтоматического действия. Часть 1. Метрологические и технические требования. Испытания

ГОСТ ISO 16140 Микробиология продуктов питания и кормов для животных. Протокол валидации альтернативных методов

ГОСТ ISO 7218 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Общие требования и рекомендации по микробиологическим исследованиям

Приложение В

МЕЖГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ

ГОСТ 32031–
(проект, окончательная редакция)

ПРОДУКТЫ ПИЩЕВЫЕ

Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* и других видов *Listeria* (*Listeria* spp.)

Минск

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации

Предисловие

Евразийский совет по стандартизации, метрологии и сертификации (ЕАСС) представляет собой региональное объединение национальных органов по стандартизации государств, входящих в Содружество Независимых Государств. В дальнейшем возможно вступление в ЕАСС национальных органов по стандартизации других государств

Цели, основные принципы и общие правила проведения работ по межгосударственной стандартизации установлены ГОСТ 1.0 «Межгосударственная система стандартизации. Основные положения» и ГОСТ 1.2 «Межгосударственная система стандартизации. Стандарты межгосударственные, правила и рекомендации по межгосударственной стандартизации. Правила разработки, принятия, обновления и отмены»

Сведения о стандарте

1 РАЗРАБОТАН Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН (ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН)

2 ВНЕСЕН Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (Росстандартом)

3 ПРИНЯТ Евразийским советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол № от)

За принятие проголосовали:

Краткое наименование страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Код страны по МК (ИСО 3166) 004–97	Сокращенное наименование национального органа по стандартизации

4 ВЗАМЕН ГОСТ 32031-2012

ГОСТ 32031–
(проект, RU, окончательная редакция)

Разработчики стандарта:

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

Директор	О.А. Кузнецова
Заместитель директора по научной работе	А.А. Семенова
Руководитель отдела «Технического регулирования и систем управления качеством»	Ю.А. Кузлякина
Руководитель лаборатории	Ю.К. Юшина
Ведущий научный сотрудник	Д.С. Батаева
Научный сотрудник	М.А. Грудистова
Младший научный сотрудник	Е.В. Зайко

Приложение Г

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
"Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

МЕТОДИКА СОЗДАНИЯ МОДЕЛЕЙ МОНО- И МУЛЬТИВИДОВЫХ БИОПЛЕНОК ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ И ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Методические рекомендации
МР 784-00419779-2021

Москва
2021

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ПИЩЕВЫХ СИСТЕМ им. В.М. Горбатова» РАН

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
_____ О.А. Кузнецова
«23» декабря 2021 г.

МЕТОДИКА СОЗДАНИЯ МОДЕЛЕЙ МОНО- И МУЛЬТИВИДОВЫХ БИОПЛЕНОК ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ И ГРАМПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ

Методические рекомендации

МР 784-00419779-2021

(вводятся впервые)

Дата введения в действие «23» декабря 2021 г.

РАЗРАБОТАНО

ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
Заведующий лабораторией выживаемости микроорганизмов
_____ Николаев Ю.А.

РАЗРАБОТАНО

ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем и м. В.М. Горбатова» РАН
Заместитель директора по научной работе
_____ А.А. Семенова

Заведующий лабораторией гигиены производства и микробиологии
_____ Ю.К. Юшина

Научный сотрудник лаборатории гигиены производства и микробиологии
_____ М.А. Грудистова

Государственное санитарно-эпидемиологическое нормирование Российской Федерации

4.2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ. БИОЛОГИЧЕСКИЕ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ

Методы индикации биологических плёнок микроорганизмов на абиотических объектах

Методические рекомендации
МР 4.2.0161—19

Издание официальное

Москва • 2020

ББК 51.20
М41

М41 **Методы** индикации биологических плёнок микроорганизмов на абиотических объектах: Методические рекомендации.—М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020.—20 с.

ISBN 978–5–7508–1727–6

1. Разработаны Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Е. П. Игонина, Ю. Е. Абрамов), ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (В. Г. Акимкин, А. В. Тутельян, Н. Г. Седых), ФБУН НИИДезинфектологии Роспотребнадзора (Н. В. Шестопалов, Л. С. Федорова), ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН (О. А. Кузнецова, Ю. К. Юшина, Д. С. Батаева, Е. В. Зайко), ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (А. Л. Гинзбург, Ю. М. Романова, Н. В. Алексеева, Н. И. Филиппова).

2. Утверждены руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 23 декабря 2019 г.

3. Введены впервые.

ББК 51.20

Компьютерная верстка Е. В. Ломановой

Подписано в печать 12.03.2020

Формат 60x84/16 Печ. л. 1,25

Тираж 100 экз. Заказ 10

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
ФБУЗ ФЦГиЭ Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19А

Реализация печатных изданий, тел./факс: 8 (495) 633-86-59

© Роспотребнадзор, 2020

Продолжение Е

СОГЛАСОВАНО
Зам. директор по экономическим связям и маркетингу
ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН

_____Горбатов С.А.

«25» ноября 2019 г.

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «БФР лабс»

_____Емшанов О. В.

«25» ноября 2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ №18-11/П
по применению средства дезинфицирующего «БФР БИОЦИД ЭНЗИМ»для санитарной обработки оборудования и помещений
на предприятиях мясной промышленности

2019 г.

ИНСТРУКЦИЯ №18-11/П

по применению средства дезинфицирующего «БФР БИОЦИД ЭНЗИМ» для санитарнойобработки технологического оборудования и производственных помещений на предприятиях мясной промышленности, в том числе в мясных цехах.

Инструкция разработана Федеральным государственным бюджетным научным учреждением «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, ООО «БФР лабс».

Авторы:

от ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН лаборатории «Гигиенапроизводства и микробиология»:

Юшина Ю.К. – зав. лаборатории, к.т.н.; Минаев М.Ю. – в.н.с., к.т.н.; Батаева Д.С. – в.н.с., к.т.н.;

от ООО «БФР лабс»:

Емшанов О.В. – генеральный директор.

Инструкция предназначена для работников мясной отрасли при осуществлении процессов санитарной обработки оборудования, инвентаря, тары и поверхностей производственных помещений на предприятиях мясной промышленности.

Инструкция определяет методы и режимы применения дезинфицирующего средства «БФР БИОЦИД ЭНЗИМ», требования техники безопасности, технологический порядок обработки, методы контроля качества средства и рабочих растворов, полноты смывания остаточных количеств средства с поверхностей обрабатываемого оборудования.

Настоящая Инструкция является дополнением к действующей «Инструкции по санитарной обработке технологического оборудования и производственных помещенийна предприятиях мясной промышленности» (М.,2003 г.).

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Дезинфицирующее средство «БФР БИОЦИД ЭНЗИМ» представляет собой прозрачную жидкость голубого цвета. Хорошо растворяется в воде в любых пропорциях. Значения pH концентрата средства составляет 9 – 10 ед. В состав средства в качестве действующих веществ (ДВ) входит дидецилдиметламмониум хлорид (6,0%), N,N- бис(3аминопропил)додециламин (3,0%), бензалкониум хлорид (8,0%), смесь ферментов (амилаза, липаза, протеаза 3-5%), полиферментную субстанцию «Enzymix», содержащую смесь ферментов группы карбогидраз 3%-5%, антикоррозионные добавки, технологические и функциональные компоненты.

Срок годности средства – 5 лет. Водные растворы прозрачные, бесцветные, имеют характерный запах отдушки. Срок хранения рабочих растворов 30 суток при хранении в закрытых емкостях.

Приложение Ж

Министерство науки и высшего образования
Российской Федерации
**Федеральное государственное бюджетное
научное учреждение
«Федеральный научный центр
пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
(ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН)**

109316, г. Москва, ул. Талалихина, д. 26
Телефон: 8 (495) 676-95-11; факс: 8 (495) 676-95-51
E-mail: **info@fncps.ru**

04.05.22 № 296/дир
На №

Справка

Настоящая справка дана Юшиной Юлии Константиновне о том, что результаты ее диссертационной работы по теме «Научные основы реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности мясной продукции» были успешно использованы при выполнении работ по хозяйственным договорам № 034.21.118, 034.19.076, 034.21.111, 034.18.083, 034.19.071, 034.19.007, 034.19.112, 034.19.024, 034.19.014 с предприятиями отрасли на общую сумму 1 705 тысяч рублей., а также при разработке инструкций по моющим и дезинфицирующими средствам, в количестве 10 штук.

Директор О.А. Кузнецова

Приложение 3

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
"Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН

МЯСО И МЯСНЫЕ ПРОДУКТЫ

Методические рекомендации по повышению пищевой безопасности

МР №- 785-00419779-22

Москва
2022

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
"Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова" РАН

УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГБНУ «ФНЦ пищевых
систем им. В.М. Горбатова» РАН
_____ Кузнецова О.А.
12 апреля 2022 г.

Методические рекомендации по
повышению пищевой безопасности

МР №- 785-00419779-22

Дата введения в действие «01» сентября 2022 г.

РАЗРАБОТАНО

ФГБНУ «ФНЦ пищевых
систем им. В.М. Горбатова» РАН
Заместитель директора по научной
работе
_____ А.А. Семенова

РАЗРАБОТАНО

ФГБНУ «ФНЦ пищевых
систем им. В.М. Горбатова» РАН
Заведующий лабораторией «Гигиена
производства и микробиология»
_____ Ю.К. Юшина

ФГБНУ «ФНЦ пищевых
систем им. В.М. Горбатова» РАН
Ведущий научный сотрудник
лаборатории
«Гигиена производства и
микробиология»
_____ Д.С. Батаева

ФГБНУ «ФНЦ пищевых
систем им. В.М. Горбатова» РАН
Научный сотрудник лаборатории
«Гигиена производства и
микробиология»
_____ М.А. Грудистова