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 и холодильных производств

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора технических наук

Москва–2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» Российской академии наук

Научный консультант: Доктор технических наук, профессор
Семенова Анастасия Артуровна

Официальные оппоненты: **Абдуллаева Асият Мухтаровна –**
доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств», кафедра ветеринарно-санитарной экспертизы и биологической безопасности, профессор
Ишевский Александр Леонидович –
доктор технических наук, профессор, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО», факультет биотехнологий, доцент
Рябцева Светлана Андреевна –
доктор технических наук, профессор,
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Кавказский федеральный университет», кафедра прикладной биотехнологии, профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов».

Защита состоится « »_____2022 г. в часов на заседании диссертационного совета Д 006.021.02 при ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В. М. Горбатова» РАН по адресу: 109316, Москва, ул. Талалихина, д. 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте *www.vniimp.ru* ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН.

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат технических наук,
старший научный сотрудник Захаров А.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Современные пищевые системы, рассматриваемые от «поля» до «потребителя», представляют собой среду для возникновения и передачи 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 инфекций 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. На детей до 5 лет приходится 40 % бремени пищевых инфекций, эти болезни уносят жизни 125 тыс. детей в год.

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 антибиотикам и прочим антимикробным средствам, с дополнительными факторами патогенности, чем в настоящее время объясняется всё 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.

Неэффективность существующих гигиенических подходов определяется растущим распространением штаммов, резистентных к применяемым дезинфектантам. Контаминация пищевой продукции через поверхности объектов производственной среды в процессе производства вызывает постоянную обеспокоенность. Циркуляция микроорганизмов порчи значительно сокращает сроки годности продукции, приводит к утрате произведенных продуктов и наносит прямой экономический урон предприятиям.

Колоссальную опасность для пищевых производств представляют биопленкообразующие микроорганизмы-патогены, так как биопленки (БП) определяют устойчивость возбудителей инфекций к факторам внешней среды. БП составлены сообществами различных бактерий, высокоустойчивыми к действию физических и химических дезинфектантов, они с трудом поддаются уничтожению с использованием стандартных методов дезинфекции. По зарубежным оценкам перекрестное заражение в результате развития БП является риском, вызывающим 25 % вспышек пищевых отравлений. Как источник антибиотикорезистентных клонов бактерий, БП усугубляют тяжесть пищевых отравлений. В распространении пищевых инфекций роль биопленочного роста на объектах производственной среды пищевых предприятий остается мало изученной.

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.

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, поиск принципиально новых методов в борьбе с устойчивыми патогенными и условно-патогенными бактериями, в том числе в составе БП, на основе получения новых фундаментальных знаний об их перемещении и распространении в производственной среде актуальным и своевременным исследованием для обеспечения микробиологической безопасности пищевой 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 биоразнобразие патогенных микроорганизмов представлены 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 связанные 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 являлось 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 БП 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 БП, сформированных пищевыми изолятами патогенов и сапрофитов, к воздействию дезинфектантов, физических методов и полимерных комплексов;
- разработать схему реинжиниринга 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 БП. Впервые проведены комплексные исследования биопленочной и свободно циркулирующей

микрофлоры пищевых производств, в результате которых установлена способность к образованию БП у циркулирующих в производственной среде микроорганизмов.

Впервые получен и обобщен опыт исследования БП на пищевых предприятиях Российской Федерации. Изучена морфология и выявлена высокая гетерогенность по таксономическому разнообразию и по степени зрелости. Подтвержден микроколониальный рост бактерий в БП, описано нахождение бактерий в общей капсуле-матриксе. Сделаны важные наблюдения фундаментального свойства о бактериях в БП: 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 БП из смеси планктонных форм с органическим материалом как первая фаза их формирования. Показана необходимость дифференцирования наблюдаемых БП от органических загрязнений (мяса, крови и т.п.).

Впервые предложены подходы к оценке антимикробных свойств различных химических веществ и материалов относительно БП 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 БП.

Методология и методы исследования. В основу поэтапного плана аналитической и экспериментальной работы положена рабочая гипотеза о 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 БП, исследованы закономерности выявлений патогенных микроорганизмов в сезонной динамике.

Получена новая информация об уровне биопленкообразования, видовом составе БП 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 исследований оформлены 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 поликатионных полимеров апробирован комплексный подход к оценке антимикробной активности с использованием микробиологических методов, 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» РАН, 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 «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» РАН, 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 БП;
- 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 реинжиниринга 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, посвященной 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); XII Международной научно-практической конференции «Безопасность и качество товаров» (Саратов, 2018); Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, 2018); 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); 60th International Meat Industry Conference MEATCON 2019, (Kopaonik, Serbia, 2019); конференции с международным участием «Молекулярная диагностика и биобезопасность (Москва, 2020); Международной конференции «Качество и безопасность продуктов питания» (Food quality and food safety) (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); 61th International Meat Industry Conference MEATCON 2021, (Zlatibor, Serbia, 2021); V Международной конференции по сверхбыстрой оптике UltrafastLight (Москва, 2021).

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 и 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 по 2021 годы 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 подходов и проведение экспериментов, обработка полученных данных и их анализ, практическая реализация результатов исследований, в том числе разработка различных видов документации и ее

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 - Кузнецовой О.А., Лисицыну А.Б., Семеновой А.А.; всем сотрудникам лаборатории «Гигиена производства и микробиологии» и коллегам - 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-ру Бранко В. (Белградский институт гигиены и технологии мяса).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность работы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, сформулированы положения, выносимые на защиту.

Глава 1. Проблематика микробиологической безопасности мясной продукции. Анализ составляющих показателей.

Обобщены научные исследования отечественных и зарубежных ученых по теме работы: рассмотрены вопросы распространения приоритетных пищевых патогенов; проведён анализ дезинфицирующих средств, используемых на предприятиях; рассмотрены аспекты формирования БП патогенными микроорганизмами; систематизированы сведения о строении и свойствах БП, а также методах борьбы; продемонстрировано, что растущая резистентность микроорганизмов, в том числе в составе БП диктует необходимость разработки новых подходов при проведении санитарно-гигиенических мероприятий на предприятиях.

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

Изложена методология выполнения работы и ее организация, включая последовательную реализацию всех ее этапов. Основные теоретические и экспериментальные исследования проведены в лаборатории «Гигиена производства и микробиология» ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, Физическом институте им. П.Н. Лебедева, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (Институт микробиологии им. С.Н. Виноградского; Институт биоинженерии им. К.Г. Скрябина). Представлены общая структура работы (рис. 1), методология проведения расширенного микробиологического профилирования предприятий и методологические инструменты для выполнения этапов анализа представлены (рис. 2).

Рисунок 1 – Организационно-иерархическая структура диссертационной работы

Рисунок 2 – Методология идентификации микробиоты производств

Объектами исследований на различных этапах работы являлись:

- говядина, свинина, полуфабрикаты из свинины, полуфабрикаты из говядины, мясные продукты, в том числе из мяса птицы; модельные образцы фарша из говядины, свинины и мяса птицы; штаммы *L. monocytogenes* 1/2a (ATCC BAA 679), 1/2b (ATCC BAA 839) и 4b (ATCC 13932), *Campylobacter* spp., включая C. *jejuni* subsp. *jejuni* ATCC 8841, *C. coli* ATCC 33559, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *enteritidis* ATCC 11272, *Bacillus*

cereus ATCC 11778, *Citrobacter freundii* ATCC 43864, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus mirabilis* ATCC 35659 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и др. из Американской коллекции типовых культур (Манассас, штат Вирджиния, США);

- 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 на различных этапах технологического процесса от приемки сырья до выпуска готовой продукции и различавшиеся по типу (основное технологическое оборудование, вспомогательное оборудование, инвентарь, конструкции);

- штаммы *Campylobacter* spp., *L. monocytogenes, L. welshimeri, Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp. и др., выделенные с абиотических и биотических объектов мясоперерабатывающих и птицеперерабатывающих предприятий;

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

- поликатионные полимеры: № 1 – полиэтиленимин, № 2 – линейный сополимер эпихлоргидрина и диметиламина (каустамин), № 3– полидиаллилдиметиламмоний хлорид, № 4 – полистиролсульфокислота, № 5 – полиакриловая кислота, № 6 – карбоксиметилцеллюлоза, натриевая соль, № 7 – разветвленный сополимер эпихлоргидрина и диметиламина;

- наночастицы металлов, полученные методом лазерной абляции (золота (Au), серебра (Ag), меди (Cu)).

Методы исследования. При выполнении работы применялись общепринятые стандартные и оригинальные методики исследований.

Оценку инклюзивности и эксклюзивности метода петлевой изотермической амплификации (LAMP) проводили с использованием образцов мясных продуктов, искусственно контаминированных штаммами целевых микроорганизмов (*L. monocytogenes, Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.) и нативных образцов мясных продуктов. ПЦР (полимеразная цепная реакция) осуществлялась с помощью коммерческого набора на основе LAMP (3M Molecular Detection Assay Salmonella; 3M) в соответствии с инструкцией. Исследования проводили в сравнении с методами по ГОСТ 32031-2011 (*Listeria monocytogenes),* ГОСТ 31659-2012 (бактерий рода *Salmonella*), ГОСТ ISO 10272-1-2013 (*Campylobacter* spp). Определение чувствительности – использовали два уровня инокуляции матрицы: высокий уровень инокуляции (100 КОЕ/25 г) и низкий уровень инокуляции (10 КОЕ/25 г). Определение КМАФАнМ – по ГОСТ 104444.15-94. Для идентификации состава мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (МАФАнМ) отбирали колонии с различными культурально-морфологическими признаками. Идентификацию выделенных бактериальных культур проводили сначала путем изучения морфологии колоний и бактериальных клеток; видовую идентификацию отобранных микроорганизмов проводили масс-спектрометрическим методом MALDI-Tof-Ms путем прямого бактериального профилирования с помощью время пролетного масс-спектрометра MALDI BiotyperMicroflex, с получением карты белковых масс. Определение микробного сообщества нативных БП осуществляли после разрушения экзополисахаридного матрикса БП с применением мультиферментного средства (BFR-enzymofilm) для освобождения бактериальных клеток. Затем пробу тщательно перемешивали и производили рассев на дифференциально-диагностические питательные среды с последующей идентификацией

выделенных микроорганизмов методом MALDI-Tof-Ms, определения патогенных микроорганизмов методом ПЦР, а также определения таксономического состава методом высокопроизводительного секвенирования генов 16S рРНК.

Определение таксономического состава микробных сообществ – с помощью метода высокопроизводительного секвенирования фрагментов генов 16S рРНК, полученных с помощью ПЦР с «универсальными» праймерами из метагеномной ДНК; экстракцию метагеномной. Секвенирование осуществляли на приборе MiSeq фирмы Иллюмина (Illumina). Полученные данные обрабатывали с помощью методов биоинформатики. Микроскопические исследования ультраструктурной организации БП проводили с использованием просвечивающей (трансмиссионной) электронной микроскопии (ТЭМ). Ультратонкие срезы получали на микротоме LKB-III (LKB, Швеция). Полученные препараты анализировали с помощью электронного микроскопа JEM 100CXП (JEOL, Япония). Качественную оценку способности микроорганизмов формировать БП *in vitro*, визуализацию воздействия полимеров и материалов с НЧ – с использованием флуоресцентной микроскопии. Образцы после инкубации красили флуоресцентными красками Live/Dead Biofilm Viability Kit (Thermo Fisher, USA). Световую микроскопию с флуоресцентным объективом проводили на Nikon Eclipse Ni. Анализ геномов мультирезистентных штаммов патогенных микроорганизмов – помощью методов высокопроизводительного секвенирования. На первом этапе осуществляли выделение ДНК и ее секвенирование. Для секвенирования геномов штаммов *Salmonella* spp. использовали технологии Illumina (Illumina) и мономолекулярного нанопорового секвенирования (Oxford Nanopore). Идентификацию генов и теоретическое предсказание их функций проводили с использованием сервера RAST. Анализ генетического разнообразия *Listeria* spp., циркулирующих в производственной среде проводили с использованием мультилокусного секвенирования, включавшего анализ 7 генов домашнего хозяйства и 4 генов вирулентности. Полногеномное секвенирование изолятов выполняли на платформе MiSeq Illumina. Определение способности к биопленкообразованию – тестирование выделенных микроорганизмов на способность к формированию бактериальных БП проводили по общепринятой методике в 96-ти луночных микротитровальных планшетах. Культивировали бактерии в лунках планшета с последующей окраской адгезировавшихся и сформировавших БП бактерий. Превышение оптической плотности кристаллвиолета над контролем свидетельствовало об образовании бактериями БП.

Определение антибактериальных свойств полимеров на планктонных культурах и биопленках микроорганизмов – микробиологическими методами: серийных разведений; «стекающей капли». Исследование устойчивости к дезинфектантам модельных БП осуществляли следующим образом: инокуляты клеток (*E. coli, S. aureus* и бинарной культуры) наносили на стекловолоконные фильтры для выращивания БП, термостатировали при 28 °С в течение 9-ти суток. На 2-е и 9-е сутки фильтры с БП обрабатывали рассчитанными дозами дезинфицирующих средств.

Глава 3. Апробация молекулярных методов определения патогенов, циркулирующих в производственной среде

На первом этапе работы решалась задача по оценке эффективности метода ПЦР на основе петлевой изотермической амплификации (LAMP) для быстрого обнаружения *Listeria monocytogenes, Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. в пищевых продуктах и объектах производственной среды в сравнении со стандартными классическими методами.

Специфичность метода оценивали по показателям инклюзивности и эксклюзивности. На инклюзивность было протестировано 20 бактериальных штаммов (C. *jejuni* subsp. *jejuni* и *C. coli*, 18 изолятов *Campylobacter* spp.). При исследовании методом

LAMP положительные результаты были получены только с образцами, содержащими *Campylobacter* spp., тогда как в экспериментах с десятью нецелевыми штаммами микроорганизмов (*Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli и др.*) амплификации обнаружено не было.

Чувствительность метода при оценке различных концентраций (10 КОЕ/25 г и 100 КОЕ/25 г) целевого микроорганизма *C. jejuni* составила 100 %, при этом все образцы были подтверждены традиционными микробиологическими методами.

Аналогичные исследования были проведены для *L. monocytogenes* и *Salmonella* spp. 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 *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp. и *Salmonella* spp.

Внедрение в практику микробиологических исследований данного метода 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.); 4-я зона – поверхности, не контактирующие с пищевыми продуктами, за пределами зон обработки пищевого продукта (раздевалки, подъездные пути, погрузка, участки хранения готовой продукции, участки технического обслуживания). На каждом этапе технологического процесса определяли абиотические объекты разной зональности, с поверхности которых были сделаны смывы для микробного профилирования свободно циркулирующей микрофлоры.

В течение двух лет изучалось микробное сообщество предприятий мясной и птицеперерабатывающей промышленности. В общей сложности 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, составляла от 15 до 25 % *Salmonella* spp. – от 10 до 30 %, *Pseudomonas* spp. и *Aeromonas* spp. – от 27 до 66 %.

Результаты определения микробиома абиотических объектов разной зональности одного из мясоперерабатывающих предприятий представлены в табл. 1. Значительные разбросы по степени контаминации наблюдались как для технологического, так вспомогательного оборудования и конструкций, при чем вне зависимости от начала, середины или окончания технологического процесса. Для вспомогательного оборудования уровень КМАФАнМ варьировался от $2{,}0 \times 10^2$ до $7{,}8 \times 10^6$ КОЕ/см^2, 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 log10 КОЕ/см^2 на вспомогательном оборудовании наблюдались как в грязной (участок подготовки мясного сырья), так и в чистой зонах (сосисочный цех).

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 при проведении мойки и дезинфекции на предприятиях наибольшее внимание уделяют абиотическим поверхностям, контактирующим с пищевыми продуктами (зона 1). Однако поверхности, не контактирующие с пищевыми продуктами, но находящиеся в непосредственной близости от пищевых продуктов (зона 2), содержали 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, перемещавшейся по всем помещениям в цепи производственного процесса 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).

На предприятиях прослеживались одинаковые тенденции по выявлению патогенных микроорганизмов. Так, количество обнаружений *Listeria monocytogenes* было выше, чем *Salmonella* spp., что свидетельствовало о постоянной циркуляции психротрофных микроорганизмов на абиотических поверхностях производственной среды. Обнаружение патогенных микроорганизмов практически всегда сопровождалось присутствием микроорганизмов, обладающих активной способностью к биопленкообразованию. Так, например, обнаруживались *Kocuria rhizophila* (микроорганизм считается активным образователем экзополисахаридного матрикса – основного компонента структуры БП) и микроорганизмы порчи, способные к биопленкообразованию, такие как *Pseudomonas* spp. (рис. 3).

Таблица 1 – Результаты выявления патогенных и сапротрофных микроорганизмов на абиотических объектах разной зональности (мясоперерабатывающий завод)

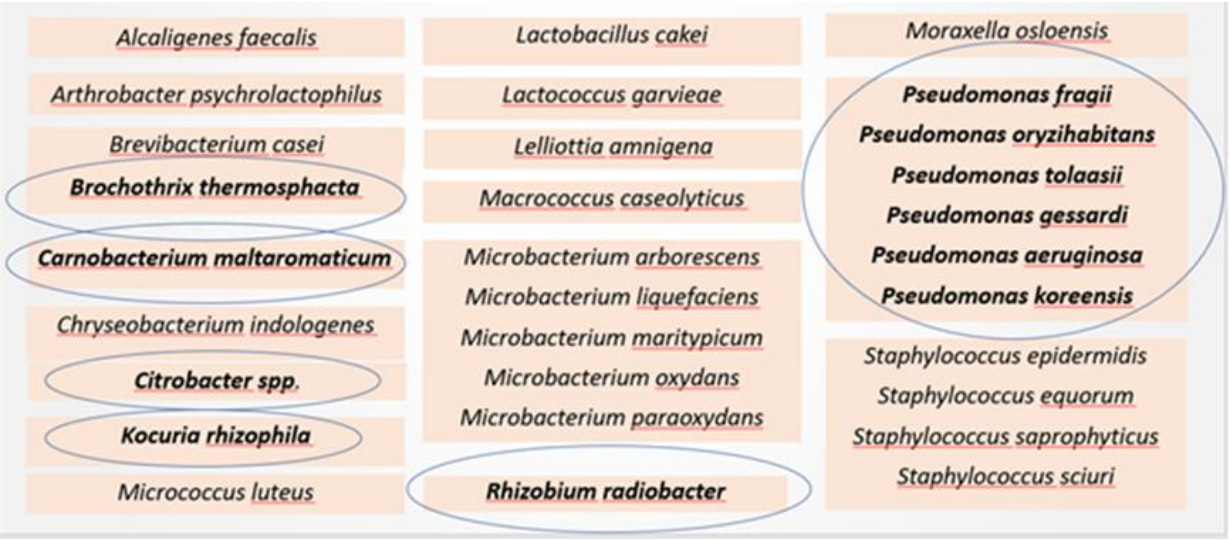
Тип объекта	Патогенные микроорганизмы		Биопленко-образование in vitro	МАФАнМ		Микроаэрофильные микроорганизмы
	рода *Salmonella*	*L. monocytogenes*		КОЕ/см^2	Наименование	
ВО (вспомогательное оборудование)	н/о	н/о	-	$8,0x10^5$	*Alcaligenes faecalis*	*Lactobacillus cakei*
					Brochothrix thermosphacta	-
					Arthrobacter psychrolactophilus	-
					Citrobacter spp.	-
ВО. Стеллаж из нержавеющей стали для размещения и размораживания мясного сырья	н/о	Обн.	+ *L. monocytogenes* (L 25)	$3,9x10^6$	*Kocuria rhizophila*	*Kocuria rhizophila*
					Staphylococcus saprophyticus	*Staphylococcus saprophyticus*
					Staphylococcus equorum	*Kocuria rhizophila*
					Micrococcus caseolyticus	-
ВО. Гидравлическая тележка для транспортирования упакованных мясных блоков и поддонов	Обн.	Обн.	+ *L. monocytogenes* (L 29); + *Salmonella spp.*	$7,8x10^6$	*Staphylococcus equorum*	*Kocuria rhizophila*
					Kocuria rhizophila	*Staphylococcus equorum*
					Staphylococcus equorum	-
ВО	н/о	н/о	-	$3,8x10^5$	*Staphylococcus equorum*	*Micrococcus caseolyticus*
					Staphylococcus sciuri	*Lelliottia amnigena*
					Moraxella osloensis	*Lactococcus garvieae*
					Chryseobacter lumindologenes	-
					Kocuriarhizophila	-
Конструкция. *Стена, окрашенная масляной краской. Расстояние от пола 1,55-1,60 м*	н/о	Обн.	+ *L. monocytogenes* (L 30)	$2,0x10^2$	*Kocuria rhizophila*	Нет роста
ТО (Технологическое оборудование)	н/о	н/о	-	$7,8x10^6$	*Microbacteriumoxydans*	*Microbacterium liquefaciens*
ТО. Машина для измельчения замороженных блоков. Приемный стол	Обн.	Обн.	+*L. monocytogenes*(L 42); + *Salmonella spp.*	$4,7x10^4$	*Carnobacterium maltaromaticum*	*Carnobacterium maltaromaticum*
					Brochothrix thermosphacta	-
					Pseudomonas tolaasii	-
ТО. *Фаршемешалка. Станина из нержавеющей стали*	н/о	Обн.	+*L. monocytogenes* (L 43)	$2.9x10^2$	*Rhodotorula minuta*	*Brevibacterium casei*
ТО	н/о	н/о	-	$1,0x10^3$	*Micrococcus luteus*	*Pseudomonas fragii*
ТО	н/о	н/о	-	$4,0x10^6$	*Rhizobiumr adiobacter*	*Macrococcus caseolyticus*
ТО	н/о	н/о	-	$2,3x10^3$	*Microbacterium oxydans*	*Carnobacterium maltaromaticum*
					Staphylococcus epidermidis	
ТО	н/о	н/о	-	$2,1x10^3$	*Staphylococcus epidermidis*	Нет роста
ТО. *Льдогенератор. Корпус из нержавеющей стали*	н/о	н/о	-	$<1,0x10^1$	Нет роста	Нет роста
ВО	н/о	н/о	-	$5,0x10^4$	*Pseudomonas oryzihabitans*	*Macrococcus caseolyticus*
				$2,1x10^2$	*Microbacterium paraoxydans*	

Участок подготовки мясного сырья

Сосисочный цех. Машинное отделение

н/о – не обнаружено; обн. – обнаружено

- зона 1 - зона 2 - зона 3



.

Рисунок 3 – Наиболее типичные представители микробиоты абиотических объектов производственной среды предприятий мясной промышленности (выделены микроорганизмы порчи и патогены, вызывающие озабоченность в отношении безопасности продукции)

Как видно из рис. 3, микрофлора абиотических поверхностей предприятий мясной промышленности представлена различными таксономическими группами микроорганизмов. Выявленные на предприятиях сапротрофные микроорганизмы, как правило, были схожи и относились к следующим родам - *Staphylococcus, Micrococcus, Propionibacterium*, являющиеся 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, Pseudomonas spp.*, в том числе обладающим способностью к биопленкообразованию. Было отмечено, что предприятия различались по количеству случаев обнаружений данных микроорганизмов, однако имели и сходные особенности. Так, среди микроорганизмов рода *Pseudomonas* чаще всего встречались виды, относящиеся к группе *Pseudomonas fluorescens,* обладающие протеолитической активностью. Кроме того, 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.

Считается, что 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* (рис. 4). Также метагеномный анализ показал высокую таксономическую сходность микроорганизмов, доминирующих в разных образцах. Наибольшим таксономическим разнообразием обладали образцы, отобранные с поверхности вспомогательного оборудования, что также подтверждало сделанные выше выводы о роли вспомогательного оборудования в распространении микроорганизмов в производственной среде.

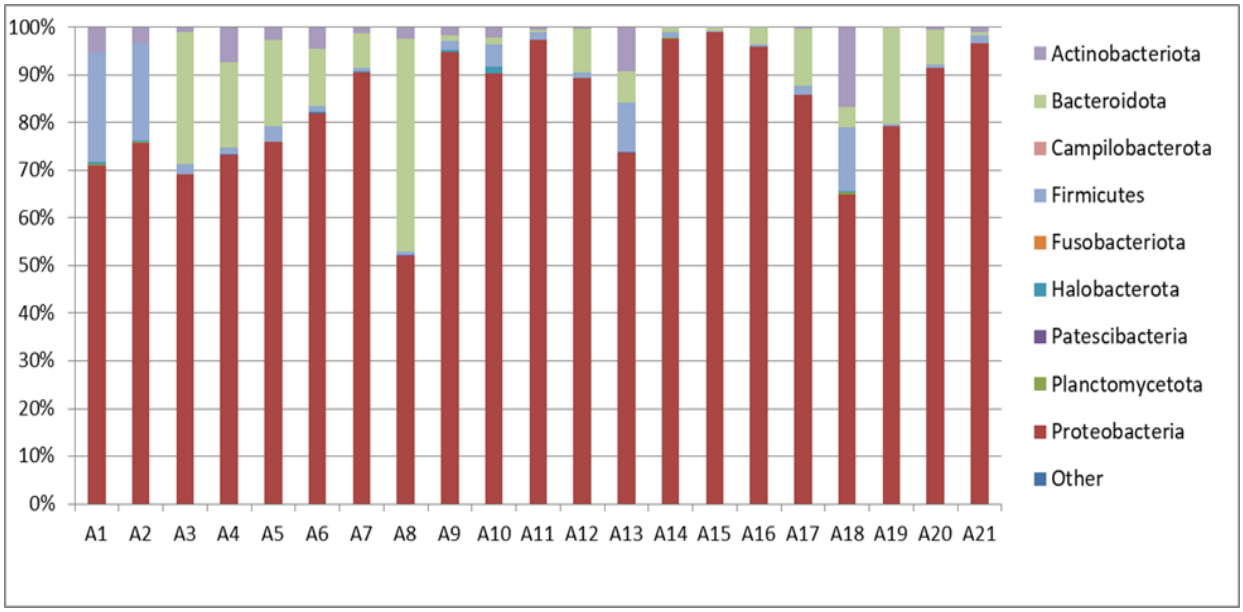


Рисунок 4 – Таксономический состав микробных сообществ образцов, отобранных на предприятиях (А8, А4, А 13, А 18 - образцы смывов, отобранные с поверхности вспомогательного оборудования)

Результаты выявления патогенных и сапротрофных микроорганизмов на абиотических объектах разной зональности птицеперабатывающего предприятия (табл. 2) показали аналогичную картину в сравнении с предприятиями мясной промышленности. Поверхности технологического оборудования (2 зона), инвентарь и вспомагательное оборудование являлись источником распространения патогенов. Практически всегда сопутствующая микрофлора характеризовалась присутствием микроорганизмов-биопленкообразователей – в основном представителей рода *Pseudomonas, L. monocytogenes*, которые, как правило, выявлялись на поверхностях технологического оборудования в труднодоступных местах (стыки, швы и т.д.), в том числе на металлических цепях конвейерных систем, осуществлявших перемещение продукции по производству. Микроорганизмы рода *Salmonella* встречались на объектах значительно реже, что могло быть связано с традиционно более пристальным и детальным контролем за данным патогеном на предпритятиях птицеперерабатывающей промышленности.

Методом времяпролетной масс-спектрометрии MALDI-Tof-MS было идентифицировано более 58 различных видов микроорагнизмов, которые были представлены 26 родами (рис. 5), из которых 7 родов относились к грамположительным (*Enterococcus, Exiquobacterium, Lactococcus, Macrococcus, Micrococcus, Staphylococcus, Vagococcus*), 1 род – к грамвариабельным (*Erysipelothrix*), а остальные 18 родов – к грамотрицательным микроорганизмам.

Среди грамотрицательных бактерий род *Pseudomonas* был представлен наибольшим количеством видов (более 20).

Таблица 2 – 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	$4{,}0\times10^4$	*Chryseobacterium oncorhynchi* *Citrobacter gillenii* ***Pseudomonas marginalis***
Участок охлаждения парных тушек	ТО Ванна из нержавеющей стали	Обн.	н/о	$<1{,}0\times10^1$	*Staphylococcus hominis*
Участок охлаждения парных тушек	ВО Конвейер в туннеле охлаждения тушек (цепь металлическая)	н/о	н/о	$3{,}0\times10^4$	*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	$7{,}0\times10^3$	*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 переукладки тушек (станина из нержавеющей стали)	Обн.	Обн.	$5{,}0\times10^6$	*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	$9{,}0\times10^3$	*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	$3{,}0\times10^3$	*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

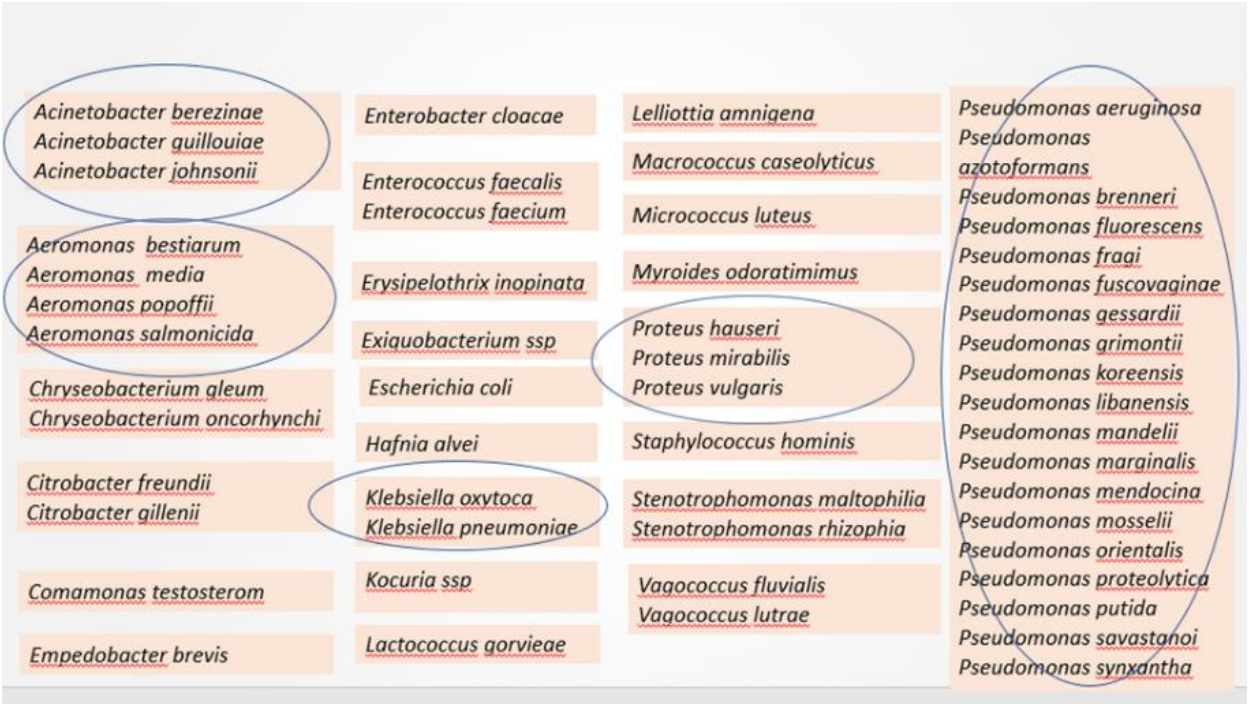


Рисунок 5 – Наиболее типичные представители микробиоты абиотических объектов производственной среды птицекомбинатов
(выделены микроорганизмы порчи и патогены, вызывающие озабоченность в отношении безопасности продукции)

Оценку разнообразия микроорганизмов производственной среды птицекомбината также проводили путем определения последовательностей вариабельного фрагмента гена 16S рРНК.

Проведенный таксономический анализ показал, что во всех рассмотренных образцах выделялись четыре ключевых группы бактерий, принадлежащих филумам *Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteriota и Bacteroidota.* Было показано, что на абиотических поверхностях производственной среды сформировались устойчивые консорциумы, в состав которых входят патогены и микроорганизмы, вызывающие порчу.

Для анализа целесообразности проведения реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности, на следующем этапе работы выполнены исследования сезонных изменений микробных сообществ производственной среды на предприятии по убою и переработке птицы с использованием комбинации методов. Были сделаны подробные описания и сравнительный анализ каждого исследованного объекта в течение всех сезонов по КМАФАнМ и составу выявленной микробиоты (табл. 3). 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.

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.

Таблица 3 - Сравнительный анализ состава микрофлоры объектов производственной среды по сезонам

№пп	Объекты	Результаты	
		КМАФАнМ	Микробиота
1	2	3	4
1	Ванна охлаждения 1	В течение года не превышал $2x10^3$ КОЕ/$см^2$,	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	Зима: наиболее высокие значения (низкий уровень санитарного состояния) - $2x10^7$КОЕ/$см^2$ Лето: снижение на 5 log КОЕ/$см^2$. Межсезонье: $9x10^3$ КОЕ/$см^2$.	Микрофлора зимой представлена 4 видами микроорганизмов (*Candida dubliniensis, Lactobacillus sakei, Pseudomonas brenneri, Pseudomonas synxantha*) из 3 родов. Методом секвенирования установлено наличие бактерий 4 филумов. В летний период количество выделенных видов микроорганизмов увеличивалось до 9 видов из 6 родов, представляющие 3 филума. В межсезонье было выделено из смывов 7 видов микроорганизмов из 3 родов, которые все были представителями одного филума *Proteobacteria.*
3	Стена 2/чистая зона	Зима и межсезонье: наиболее высокие значения - $5x10^4$ и $9,0x10^3$ КОЕ/$см^2$, соответственно. Лето: не выше $1,6x10^1$ 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	Зима и межсезонье: наиболее высокие значения - $1,0x10^7$ КОЕ/$см^2$. В остальные сезоны - ниже	Зима: обнаружено 5 видов из 4 родов, относящихся к 3 филумам микроорганизмов. 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 3

1	2	3	4
5	Колесо тележки	Зима: наиболее высокие значения - $3x10^7$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 преобладали грамотрицательные микроорганизмы: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, представили семейства *Enterobacteriaceae*, такие как *Citrobacter gillenii* и *Escherichia coli*. 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*Neisseria meningitides* (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	Межсезонье и лето: большого разброса не было - $3,0x10^4$ и $2,3x10^3$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*.
7	Стол	Лето: минимальное значение - $2,3x10^3$КОЕ/см^{2}Зима: максимальное - $4x10^5$КОЕ/см^2. Летом и в межсезонье существенных различий не наблюдалось	Зима: разнообразие микрофлоры не велико - представлено 6 видами из 4 родов грамотрицательных бактерий.3 из 6 видов бактерий - рода *Pseudomonas*, 1 вид *Escherichia coli*. 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 и* семейства *Enterobacteriaceae*.

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
8	Машина б/к бедра №1	Межсезонье: максимальное значение - $9x10^3$КОЕ/см^2. В остальные сезоны - не выше $6,5x10^2$ КОЕ/см^2(летний период).	Лето: максимальное разнообразие микроорганизмов- 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 №2	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. мезофильные и психрофильные бактерии. Среди них, н-р, род *Serratia* (условно-патогенный, возбудитель у животных и человека гнойно-воспалительных заболеваний) семейства *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas veronii* (патоген для человека, возбудитель различных заболеваний от раневых инфекций и диареи до сепсиса у пациентов с ослабленным иммунитетом). 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	Межсезонье: $4x10^4$ КОЕ/см^2. Зима: наблюдалась наибольшая контаминация - $6x10^5$ КОЕ/см^2 Лето: $1x10^2$ 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 *Pseudomonas* 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 3

1	2	3	4
11	Машина перенавески/ стойка	Межсезонье: $5x10^6$КОЕ/см^2. Зима: $9x10^4$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	Межсезонье: $7x10^6$КОЕ/см^2. Зима: $6,6x10^2$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*).

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 10^7 КОЕ/см^2. Было отмечено, что в зимний период контаминация объектов производственной среды была выше (максимальное значение $3{,}0 \times 10^7$ КОЕ/см^2), чем в другие сезоны и представлена в основном бактериями рода *Pseudomonas*. В межсезонье уровень контаминации объектов производственной среды был ниже (максимальное значение $7{,}0 \times 10^6$ КОЕ/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 $2{,}1 \times 10^4$ КОЕ/см^2, что было объяснено повышенным вниманием к санитарно-гигиеническим процедурам на предприятии в летний период.

Параллельно оценке сапротрофного микробного сообщества объекты исследовали на наличие патогенов (табл. 4).

Таблица 4– 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 spp	Стена 2/чистая зона Тара/чистая зона Стол	Лето	Чистая
Campylobacter spp	Стена 1/грязная зона	Лето	Грязная
	Машина перенавески/стойка Колесо тележки		Чистая

Как видно из табл. 4, абиотические объекты производственной среды являлись источником контаминации мяса птицы патогенными бактериями родов *Salmonella*, *Campylobacter* и вида *Listeria monocytogenes* в межсезонье и летний период. Наличие патогенов в чистой зоне увеличивало этот риск и свидетельствовало о недостаточной эффективности гигиенических мероприятий на предприятии. В холодный период (зима) патогенные микроорганизмы обнаружены не были. 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 детального понимания особенностей циркуляции были проведены исследования абиотических и биотических объектов производственной среды некоторыми патогенными микроорганизмами.

***Campylobacter* spp.** Из 233 образцов производственной среды и продукции предприятий мясной и птицеперерабатывающей промышленности был изолирован в общей сложности 61 штамм микроорганизмов этого рода (рис. 6). Наибольшая контаминация микроорганизмами рода *Campylobacter* наблюдалась на птицекомбинатах, в общей

сложности, на разных стадиях технологического процесса, 47 изолятов *Campylobacter* были выделены из 117 образцов (40,2 %). Из них 87,2 % были идентифицированы как *C. jejuni* (основная причина кампиобактериоза человека), а 12,8 % – как *C. coli.*

Напротив, на мясоперерарбатывающих предприятиях данный вид встречался редко. Однако присутствовал другой вид *Campylobacter coli* (в 95 %), который в настоящее время также рассматривается как возможный источник заболеваний.

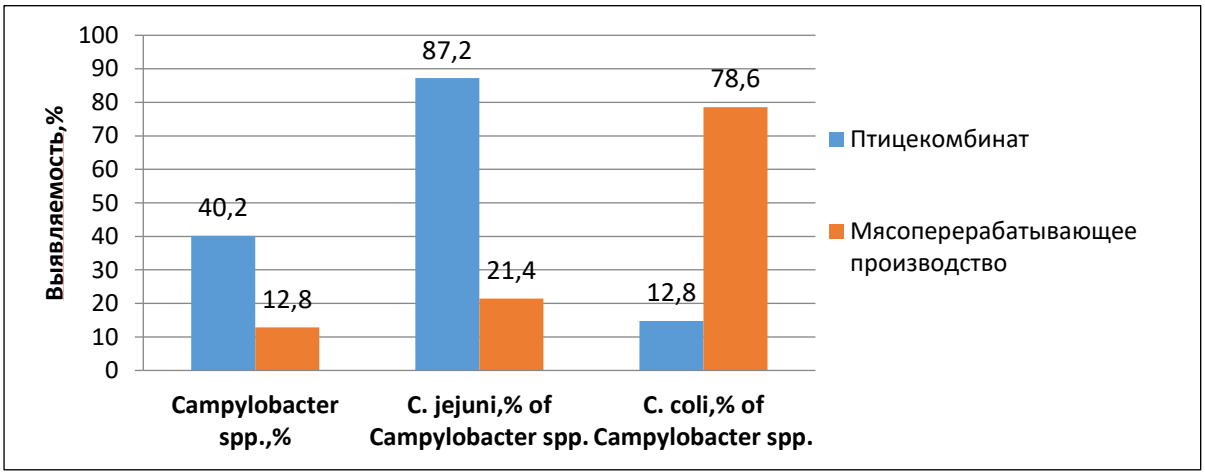
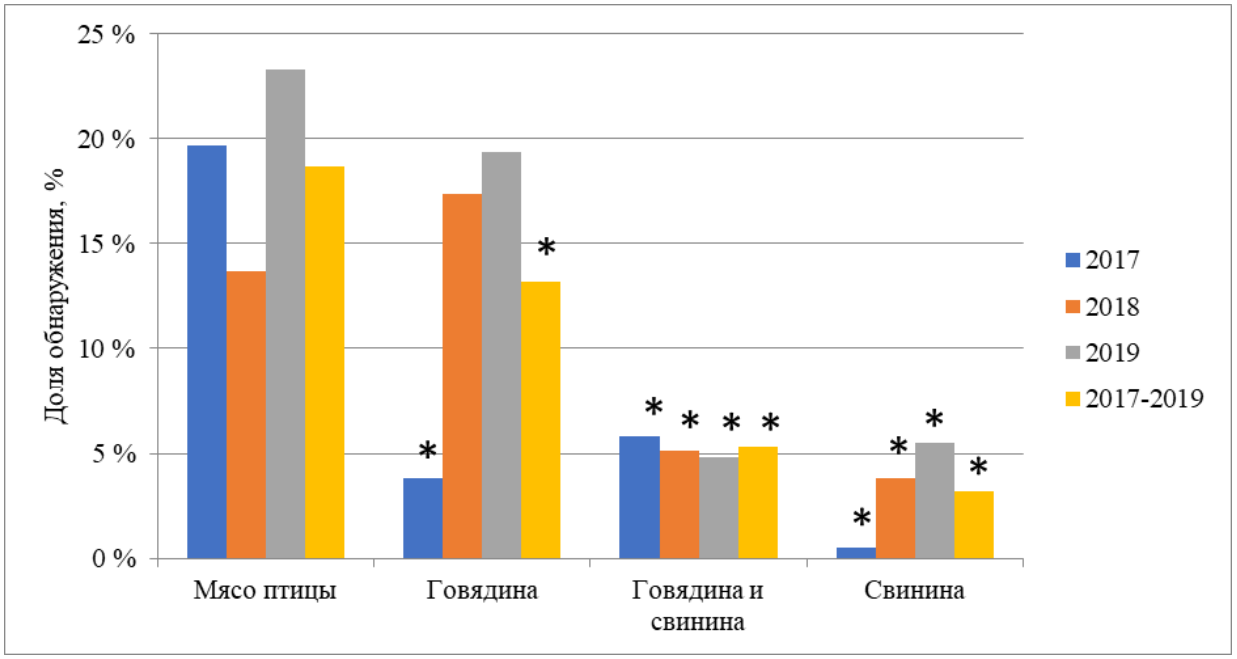


Рисунок 6 – Выявляемость микроорганизмов *Campylobacter* spp. на предприятиях

Listeria monocytogenes. Было проанализировано 2777 образцов продукции импортного и отечественного производства, в 8,8 % из которой было обнаружено наличие данного патогена (244 положительные пробы). Установлено, что частота обнаружения бактерий *L. monocytogenes* в мясной продукции за три года наблюдения (2017-2019 гг.) возрастала. Наибольшая выявляемость данного патогена была установлена для продукции из мяса птицы - 18,7 % (107 из 571 исследованных образцов). На втором месте по контаминации находилась продукция из говядины – 13,2 % (57 из 432 исследованных образцов) (рис. 7).

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. Также, с каждым годом увеличивалось количество готовых к употреблению продуктов, заражённых бактериями *L. monocytogenes*. Отмечено, что технология мясных полуфабрикатов в значительной степени влияла на уровень контаминации *L. monocytogenes* этих продуктов, так как применяются различные технологические подходы, увеличивающие риск заражения готового продукта через рабочие поверхности и другие объекты 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 годы количество обнаружений в зимний, весенний и осенний месяцы в среднем варьировало в пределах 6,7-7,1 %.



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

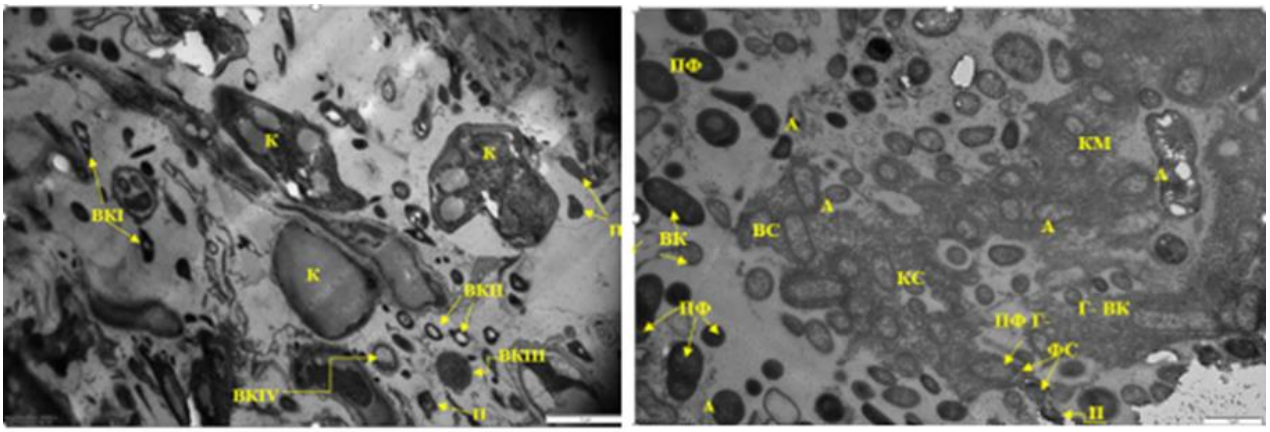
Рисунок 7 – Доли обнаружения контаминированных образцов продукции по видам мяса в период 2017-2019 гг.

При изучении геномных характеристик *Listeria monocytogenes,* выделенных с абиотических объектов двух мясоперерабатывающих предприятий, среди *L. monocytog*enes преобладали сиквенстипы CC9 и CC121, а также присутствовали *L. monocytogenes* сиквенстипов CC8 и 321, способные вызывать инвазивный листериоз. Установлено совпадение профиля интерналинов производственного изолята ST8 и клинического изолята ST 2096 (CC8), что свидетельствует о присутствии персистирующих форм листерий на пищевом производстве, опасных для человека. Геномные характеристики изолятов *L. welshimeri* подтвердили высокие адаптивные возможности.

На следующем этапе работы с целью изучения антибиотикоустойчивости штаммов, было проведено полногеномное секвенирование 3 штаммов сальмонелл. Два штамма принадлежали к *S. infantis*, а один штамм – к *S. typhimurium*. У данных штаммов фенотипически была подтверждена множественная лекарственная устойчивость (устойчивы к 6 или более антибиотикам). Было установлено, что штаммы *S. infantis* 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 *S. typhimurium* к следующим антибиотикам: стрептомицину, ампициллину, амикацину, тобрамицину, триметоприму, сульфаметоксазолу и тетрациклину. Для данного штамма 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 БП пищевых производств

Был исследован таксономический состав и структурная организация пищевых БП, отобранных в разных цехах мясоперерабатывающего 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, относящихся к 11 филумам, доминантными были представители *Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmientes, Proteobacteria*. Наибольшим разнообразием (согласно индексам видового разнообразия) отличались БП образца, отобранного с разделочного стола цеха обработки поступающего сырья (образец 1). 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 патогены человека и животных (р.р. *Arcobacter, Corinobacteria* и др.). Данные электронно-микроскопических исследований тонких срезов БП согласуются с результатами филогенетического анализа. Были выявлены: (1) разнообразие морфотипов клеток, характерное для смешанных БП (2) морфологическое сходство клеток в БП разных образцов и их микроколониальный рост; (3) возрастная гетерогенность клеток в пределах одной микроколонии с сосуществованием вегетативных и автолизированных клеток, покоящихся форм и персистеров; (4) гетерогенность химической природы полимерного матрикса по данным окрашивания рутением красным (рис. 8).

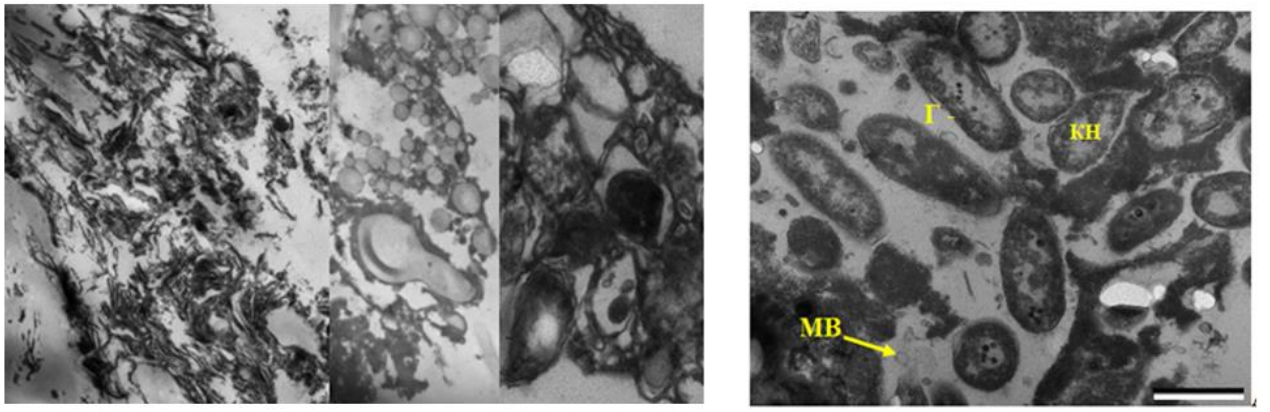


Образец 1 Образец 2

Рисунок 8 – Электронная микрофотография БП образцов 1, 2.

Обозначения: ВКI; ВКII; ВКIII, ВКIV – вегетативные клетки морфотипов I-IV, соответственно; П – персистеры; КМ – клетки мяса Г-ВК – вегетативные клетки грамотрицательных бактерий; ПФ – покоящиеся формы; ВС - волокнистые структуры матрикса; КС – капсульный слой; П – персистеры; ФС – фибриллярный слой; А – автолизированная клетка.

На следующем этапе работы 19 образцов БП с птицекомбината, отобранных в разные сезоны: низкотемпературный (зимний), жаркий (летний), переходный (осенний) были всесторонне изучены. В большинстве проб из общеизвестных (стены, трапы) и нетрадиционных (потолки, конвейер, подвижный транспорт) мест были обнаружены БП, или находившиеся в стадии формирования, или зрелые, состоявшие из бактерий и матрикса.



Образец А - Трап/потрошение

Образец Б - со стены тоннеля охлаждения

Рисунок 9 – Электронные микрофотографии образцов в разные сезоны. Грамотрицательные бактерии, компактизованные нуклеоидом (КН), мембранные везикулы (МВ)

Образец А, взятый с трапа цеха потрошения, не являлся БП, был представлен органическим материалом, гетерогенным по структуре, микробных клеток не выявлено на протяжении всего времени наблюдения. Образец Б, отобранный со стены тоннеля охлаждения в помещении с температурой ниже 2 ºС, представлял замороженную массу. В нем была обнаружена зрелая БП, слоистая, включавшая: области типичной БП с матриксом, характеризовавшуюся обилием грамотрицательных клеток одного морфотипа, очень старых с биокристаллизованным нуклеоидом. Очевидно, что БП была сформирована психрофильным микроорганизмом. С учетом вышеуказанных характеристик были выявлены сезонные различия в наличии БП на объектах предприятий: в некоторых местах БП не было в течение года, в других – они присутствовали всегда, 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.

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. Были проанализированы и обобщены сходства/различия видового состава микробиоты БП по сезонам (табл. 5).

Таблица 5 – Анализ состава микробиоты БП

Объект	Описание микробиоты БП
1	2
Трап /охлаж-дение	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 антибактериальным к антибактериальным препаратам).
Ступень / охлаждение	Подтверждено наличие *Salmonella* spp. Большая часть микрофлоры относится к психрофильным патогенным и условно-патогенным бактериям. Межсезонье: выделено 6 родов (6 видов) микроорганизмов. Зима: выделено 7 родов. Лето: выделено 5 родов. Половина видового состава принадлежала роду *Pseudomonas.* Отмечено наличие микроорганизмов рода *Lelliottia* и *Pseudomonas* во всех сезонах. Обнаружены редкие представители: *Raoultella terrigena* и *Klebsiella pneumonia*
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 отмечено во всех сезонах, а бактерий родов *Enterobacter и Kocuria*– в двух из трёх периодах.
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 которых 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).
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).

Окончание таблицы 5

1	2
Потолок / охлаждение	Межсезонье: в БП присутствовали как Г+ (*Candida zeylanoides, Kocuria polaris*), так и Г- (*Pseudomona slundensis, Pseudomonas koreensis*) микроорганизмы. Лето: БП состояла в основном из Г- (*Pseudomonas chlororaphis ssp chlororaphis, Pseudomonas lundensis*).
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, Lelliottiaa mnigena, Pseudomonas corrugate, Pseudomonas gessardii, Pseudomonas veronii, Raoultella ornithinolytica, Serratia fonticola, Yarrowia lipolytica, Yersinia intermedia*). Особых изменений в составе БП в разные сезоны не наблюдалось.
Потолок / потрошение	Межсезонье: присутствовали как Г+ (*Fictibacillus arsenicus, Kocuria rosea, Staphylococcuss aprophyticus*), так и Г- (*Pseudomonas lundensis*) микроорганизмы. Лето: не была подтверждена структура БП. Микробиота потолка не зависела от сезона.
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 *Serratia liquefaciens*. *Acinetobacter spp*. – способны выживать в течение длительного времени как на сухих поверхностях, так и в воде, образовывать БП.

Результаты секвенирования ампликонов 16SpРНК гена выявили 29 бактериальных филумов, которые участвовали в образовании БП на абиотических поверхностях в производственной среде (рис. 10).

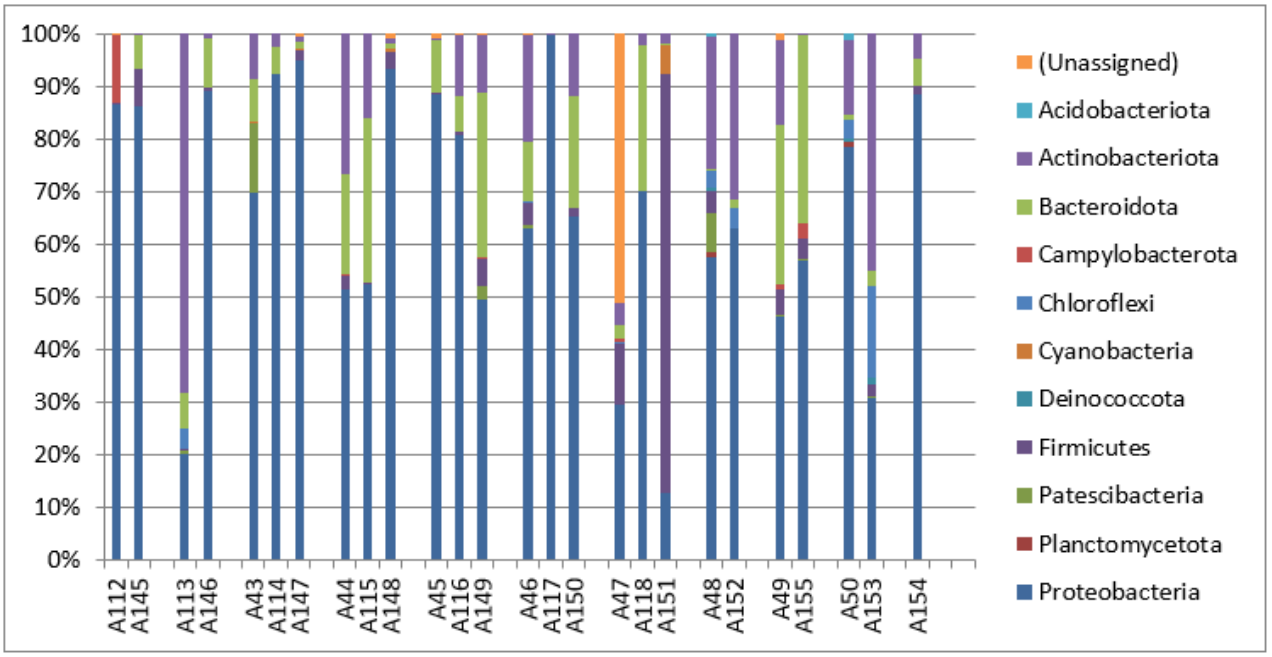


Рисунок 10 – Таксономический состав образцов микробных БП: А43-А50 – межсезонье. Обозначения: А112-А118 – зима, А145-А154 – лето.

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 БП в 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).

До настоящего время детекция (обнаружение) и идентификация бактерий в состоянии БП были затруднены, поскольку экзополисахаридный матрикс препятствовал механическому переносу бактерий на питательные среды для последующей идентификации. В связи с этим, была высока вероятность получения так называемых ложноотрицательных результатов микробиологических посевов. В результате выполнения предыдущих этапов работы был разработан проект методологии идентификации, сбора и оценки наличия биопленочного фенотипа микробных контаминантов пищевого производства.

Один из методов (методы индикации БП на месте *in situ* (экспресс-тесты)) оформлен в виде методических рекомендаций МР 4.2.0161–19 «Методы индикации биологических пленок микроорганизмов на абиотических объектах», в которых описаны этапы индикации БП на пищевых предприятиях: 1 – визуальная индикация мест локализации БП с помощью каталазного экспресс-теста; 2 – визуальная индикация мест локализации БП с помощью флуорохромных красителей и дальнейшей визуализации их при помощи специального

освещения; 3 – разрушение экзополисахаридного матрикса БП специальными ферментными индикаторами с последующим отбором и микробиологическим исследованием проб смывов. Также разработан проект «Методических рекомендаций по идентификации (оценке наличия), сбору и исследованию биопленок микробных контаминантов пищевых производств». 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» в которых описаны лабораторные модели БП микроорганизмов для изучения устойчивости/чувствительности к дезинфектантам.

На следующем этапе работы были исследованы 48 изолятов пищевых патогенов и условно-патогенных микроорганизмов, выделенных с различных объектов (рис. 11). Показано, что один из основных пищевых патогенов - *Listeria monocytogenes* - способен формировать БП уже за одни сутки при температуре всего +4 ºС. Аналогично вели себя изоляты *Pseudomonas* spp. и *Salmonella* spp.

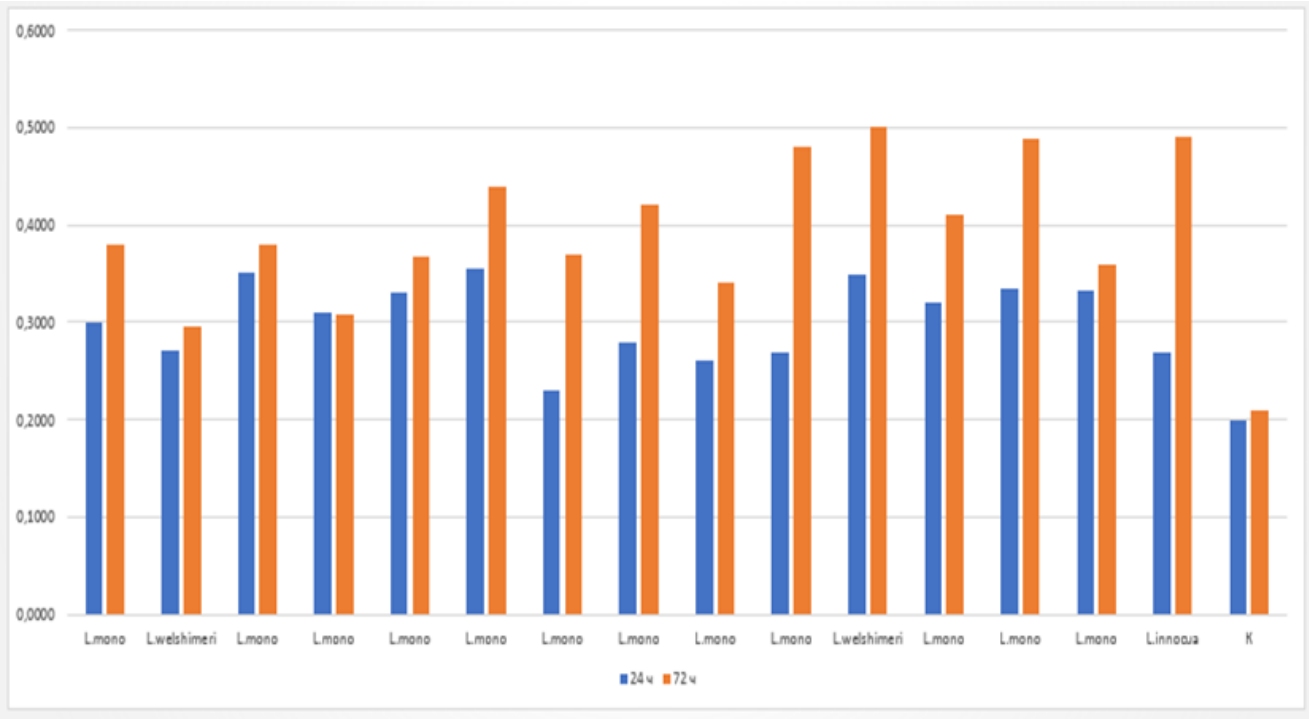
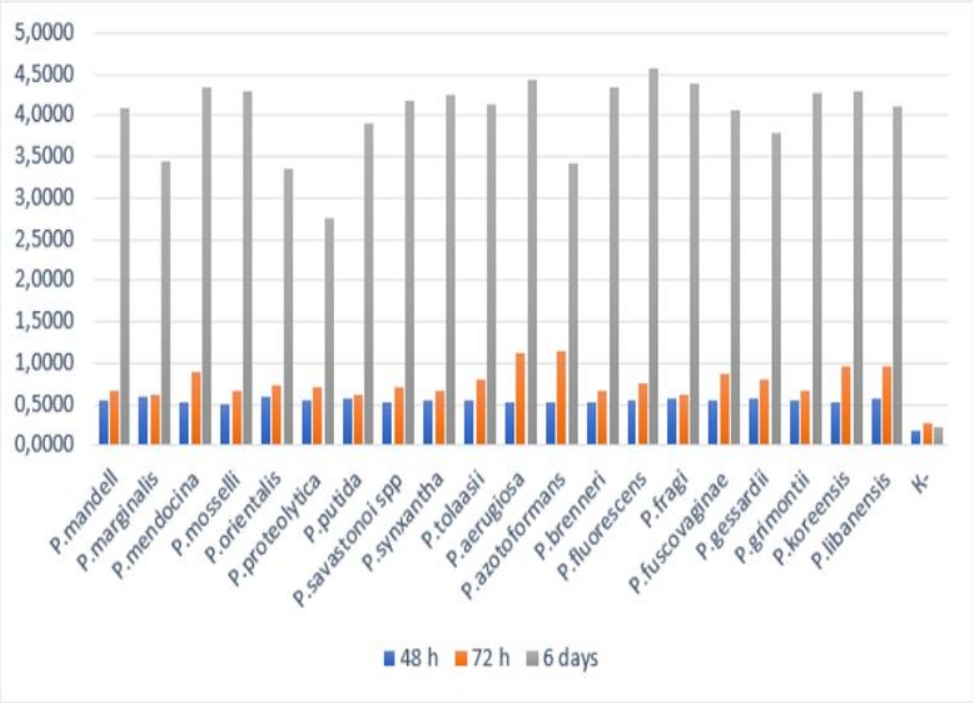
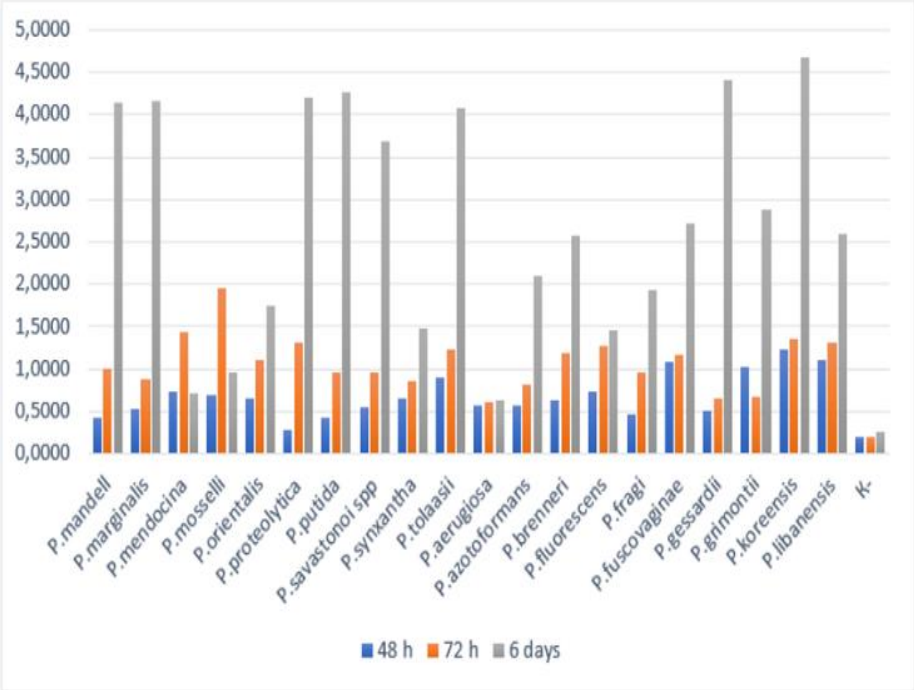


Рисунок 11 – Формирование биопленки изолятами *Listeria* spp. в динамике при +4 ºС. (Ось абсцисс - исследованные микроорганизмы, ось ординат - оптическая плотность биопленок).

Интересным результатом исследования являлось то, что спустя 7 суток БП, сформированная *Pseudomonas* spp. при температуре +10 ºС (рис. 12 а), была более стабильна у всех штаммов, чем БП, сформированная при +25 ºС (рис. 12 б).



а)



б)

Рисунок 12 – Формирование биопленки изолятами *Pseudomonas spp.* в динамике при +10 ºС (а) и при +25 ºС (б)

Естественное явление частичного разрушения или пролиферации зрелой БП наблюдалось на примере БП, растущих при +25 ºС. В то же время, как БП, формировавшиеся при низких температурах, оказались более устойчивы и сохранили свою морфологию дольше.

В естественных условиях микроорганизмы редко формируют моновидовые БП. Совместно *Pseudomonas* spp. и *Salmonella* spp. формировали более интенсивную БП, чем каждый микроорганизм по отдельности.

Микрофотографии, сделанные с помощью флуоресцентного микроскопа, позволили визуализировать БП на различных поверхностях. Поверхность кафеля и стали – сравнительно гладкая, а поверхность пластика – рельефная. Но, вне зависимости от материала и его характеристик, на всех абиотических поверхностях хорошо формировались БП (рис. 13 и 14).

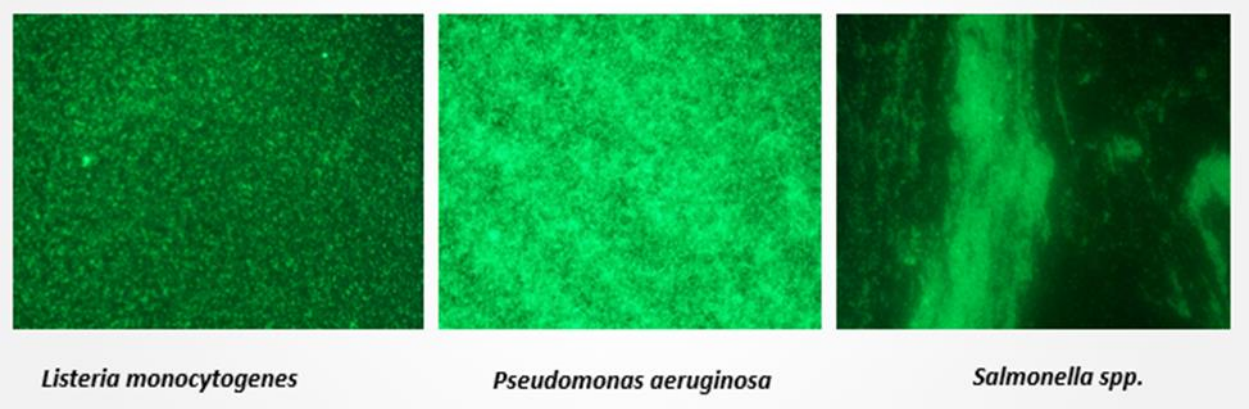


Рисунок 13 – Формирование БП на поверхности стекла за 18 часов. Флуоресцентная микроскопия, краситель SYTO©9

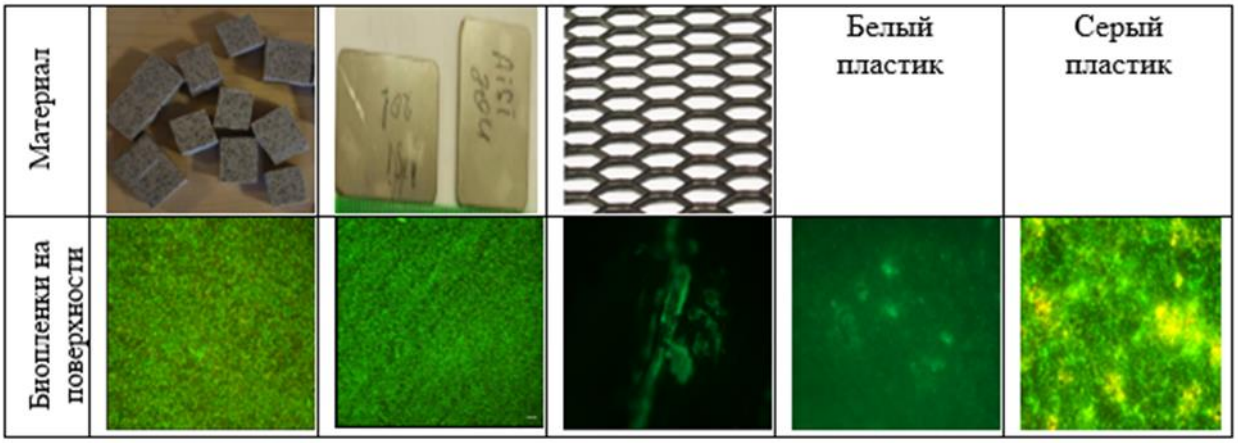


Рисунок 14 – Формирование БП бактериями *Listeria monocytogenes* на различных абиотических поверхностях за 24 часа. Флуоресцентная микроскопия, краситель SYTO©9.

Глава 6. Изучение устойчивости моно- и поливидовых БП, сформированных пищевыми патогенами и сапротрофами к воздействию дезинфектантов, полимерных комплексов и физических методов

До настоящего времени оценка эффективности дезинфицирующих средств для пищевых производств проводилась относительно планктонных форм микроорганизмов. На данном этапе работы была изучена эффективность некоторых промышленных дезинфектантов в отношении БП микроорганизмов.

Учитывая то, что в БП бактерии более устойчивы к стрессорам, была взята концентрация Фудлекс ОХУ (основное действующее вещество – перекись водорода и надмолочная кислота) 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. В то же время, при 30-тиминутном воздействии дезинфектантом, *S. aureus* 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 монопленках, в целом оказалась более устойчивой, чем моно-БП (рис. 15). Действие хлорсодержащего препарата (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-тиминутном воздействии выживаемость клеток была ожидаемо почти в 4 раза выше, чем при 30-тиминутном воздействии (рис. 16). При этом при воздействии на «старую» БП выявили почти полное стерилизующее действие.

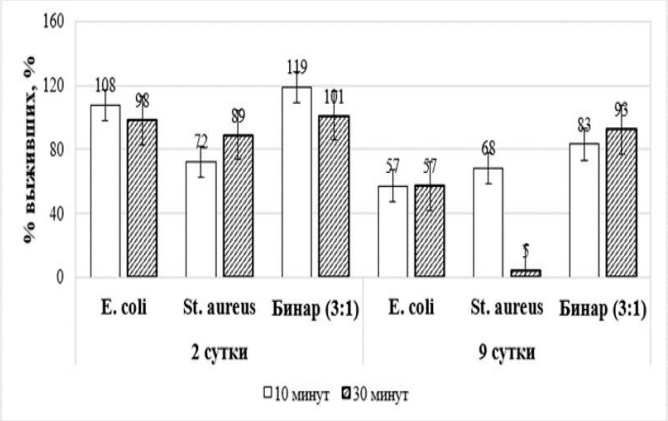


Рисунок 15 - Действие дезинфектанта Фудлекс ОХУ в концентрации 0,2% на выживаемость бактерий в БП

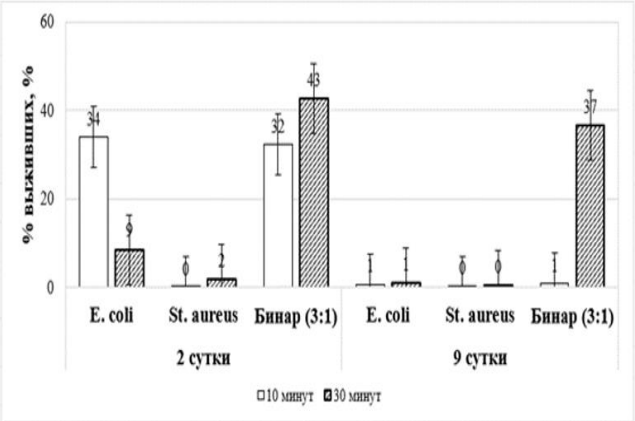


Рисунок 16 - Действие дезинфектанта ДИМАКС хлор в концентрации 0,152% на выживаемость бактерий в БП

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. 6).

Таблица 6 – Подавление полимерами формирования бактериальной пленки *L. monocytogenes*

Штамм микроорганизма	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, БП не сформировались. В ранее

проведенных опытах было показано, что адгезия и формирование пленки *L. monocytogenes* начинается уже через 4 часа.

Метод аппликационного лазерного переноса НЧ металлов серебра и меди на поверхности БП показал высокую эффективность. В результате воздействия были полностью уничтожены БП независимо от степени зрелости и не зависимо от поверхности, на которой они были сформированы (рис. 17).

Материал		Наночастицы металлов			Контроль
		Ag	*Cu*	*Au*	*Staphylococcus aureus* КОЕ/мл
	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	$3X10^5$	$5X10^5$

Рисунок 17 – Антибактериальное воздействие наночастиц металлов на БП, сформированные на различных поверхностях.

Также были показано, что ИК-лазерное воздействие на БП обладает выраженной инактивацией микроорганизмов (рис. 18), что предположительно связано с разрушением системы водородных связей и соответствующим изменением вторичной и третичной структуры полипептидов.

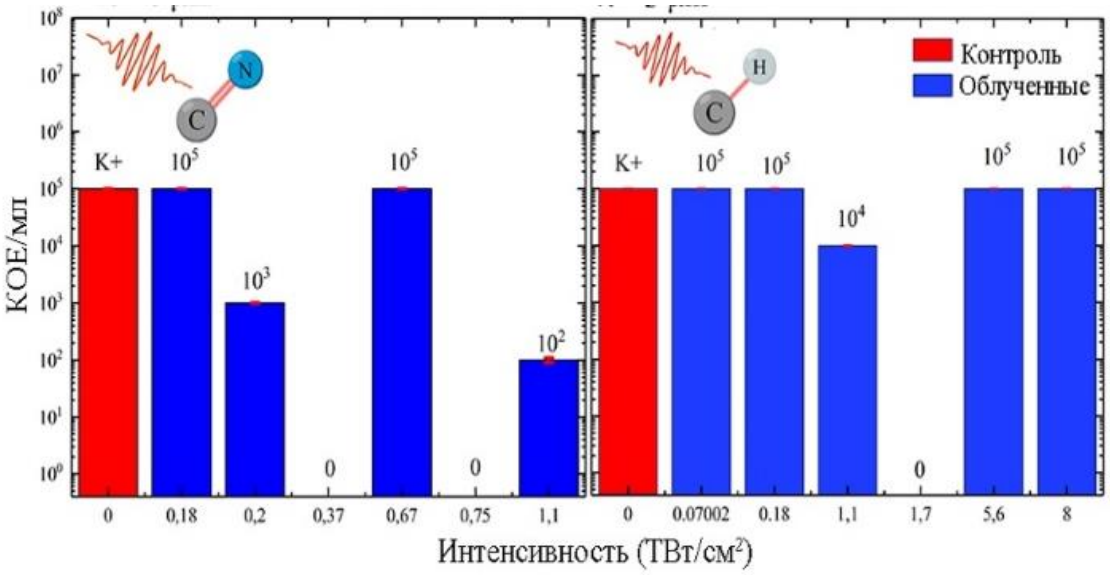


Рисунок 18 – Выживаемость *P. aeruginosa* под воздействием ИК-лазера в области 3 (справа) и 6 (слева) мкм. К+ - контрольный образец.

Пороговое значение интенсивности излучения, при котором становилось очевидным уменьшение количества КОЕ, было оценено как 0.3х0.1 ТВт/см^2 при длине волны 6 мкм (рис. 18 слева).

Глава 7. Разработка схемы реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности

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.

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 к процессам обеспечения микробиологической безопасности в настоящее время представляется чрезвычайно своевременным, поскольку традиционно существовавшая практика 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 реинжиниринга процедур обеспечения микробиологическиой безопасности пищевого производства лежит методология проведения расширенного микробиологического профилирования пищевого предприятия для детализации циркулирующих микроорганизмов, в том числе в составе БП. Структурно схема реинжиниринга представлена на рис. 19.

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 целесообразности 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.

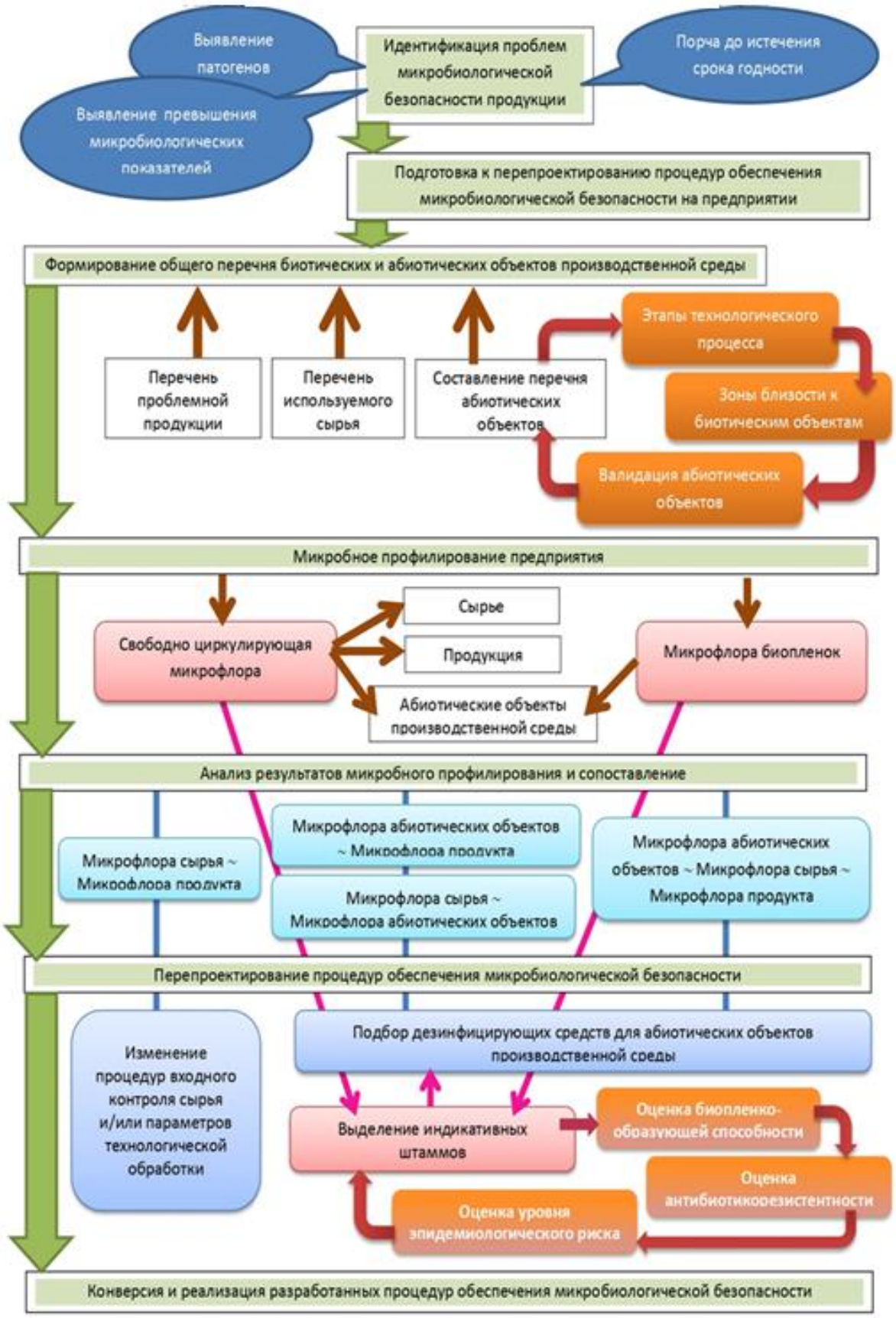


Рисунок 19 – Структурная схема реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности продукции.

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.

Схема реинжиниринга легла в основу МР «Методические рекомендации по повышению пищевой безопасности» Приложение 3. Данный документ был разработан в рамках выполнения Гранта № 075-15-2020-775 и содержитследующие 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.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. 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.

2. 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.

3. Охарактеризована структура и свойства БП 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 БП, который был представлен бактериями, относящихся более чем к 11 филумам, из которых доминировали *Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmientes, Proteobacteria*. Эти филумы были представлены бактериями, вызывающими порчу мясных, рыбных и молочных продуктов и образующими биопленки (*Pseudomonas, Flavobacterium, Arcobacter, Vagococcus, Chryseobacterium, Carnobacterium* и др.), а также оппортунистические патогены человека и животных (*Arcobacter, Corinobacteria* и др.). Показана, зависимость таксономического состава БП на пищевом предприятии от вида перерабатываемого сырья. Установлено наличие БП на объектах, не описанных в литературных источниках: на потолках, на колесах тележек, а также на объектах, размещенных в производственных цехах с температурой 0 °С.

4. 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, опасных для человека.

5.Установлена способность выделенных с пищевых предприятий штаммов патогенов и сапрофитов образовывать БП. Определено, что интенсивность образования БП патогенными бактериями, в частности *L.monocytogenes* и *Salmonella* spp., при температуре + 4 °С зависит от времени инкубации.

6.Установлено, что микроорганизмы рода *Pseudomonas* spp, обладают способностью формировать стабильную БП при температуре 10 °С. Установлено, что при совместном культивировании *Pseudomonas* spp. и *Salmonella* spp. образование БП значительно усиливалось через 48 часов.

7. 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.

8. Разработаны Методические рекомендации: МР 784-00419779-2021 «Методика создания моделей моно- и мультивидовых БП грамотрицательных и грамположительных бактерий»; Методические рекомендации МР 4.2.0161-19 «Методы индикации биологических пленок микроорганизмов на абиотических объектах». Подготовлен проект «Методических рекомендаций по идентификации (оценке наличия), сбору и исследованию биопленок микробных контаминантов пищевых производств».

9. Показано, что 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 БП, что обусловливает необходимость улучшения процедур дезинфекции.

10.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 БП 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. aeruginosa*), так и на сформированных и формирующихся БП указанных микроорганизмов.

11. Разработана схема реинжиниринга процедур обеспечения микробиологической безопасности мясной продукции.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ:

СТАТЬИ, ИНДЕКСИРУЕМЫЕ В МЕЖДУНАРОДНЫХ БАЗАХ ДАННЫХ WEB OF SCIENCE И SCOPUS

1. Andriyanov, P.A. Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Strains Isolated from Humans, Animals, and Food Products in Russia in 1950–1980, 2000–2005, and 2018–2021 / P.A. Andriyanov, P.A. Zhurilov, E.A. Liskova, T.I. Karpova, E.V. Sokolova, **Y.K. Yushina**, E.V. Zaiko, D.S. Bataeva, O.L. Voronina, E.K. Psareva, I.S. Tartakovsky, D.V. Kolbasov, S.A. Ermolaeva // Antibiotics. – 2021. – V.10, 1206. DOI:10.3390/antibiotics10101206.
2. Kompanets, V. Spectrally-selective mid-IR laser-induced inactivation of pathogenic bacteria / V. Kompanets, S. Shelygina, E. Tolordava, S. Kudryashov, I. Saraeva, A. Rupasov, O. Baitsaeva, R. Khmelnitskii, A. Ionin, **Yu. Yushina**, S. Chekalin, M. Kovalev // Biomedical Optics Express. – 2021. – V. 12. – № 10. – P. 6317-25. DOI: 10.1364/BOE.434969. Q1, IF 3.732 (поWoS).

3. Nastulyavichus, A.A. Dynamic light scattering detection of silver nanoparticles, food pathogen bacteria and their bactericidal interactions / A. A. Nastulyavichus, S. I. Kudryashov, E. R. Tolordava, L. F. Khaertdinova, **Yu. K. Yushina**, T. N. Borodina, S. A. Gonchukov, A. A. Ionin// Laser Physics Letters. – 2021. – V. 18. – № 8. – P. 086002. DOI: 10.1088/1612-202X/ac0d07. Q2, IF 2.016 (по WoS).
4. 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. Q4, IF 0.19.
5. **Yushina, Y**. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *L. monocytogenes* in meat / **Y. Yushina**, A. Makhova, E. Zayko, D. Bataeva // Potravinarstvo. – 2019. – V. 13. – № 1. – P. 800-805. DOI 10.5219/1165. Q3, IF 0.26.
6. Velebit, B. The common foodborne viruses: A review / B. Velebit, V. Djordjevic, L. Milojevic, M. Babic, N. Grkovic, V. Jankovic, **Y. Yushina** // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science: 60, Mt. Kopaonik. – Mt. Kopaonik, 2019. – P. 012110. DOI: 10.1088/1755-1315/333/1/012110.
7. Zayko, E. Flow cytometry as a rapid test for detection of tetracycline resistance directly in bacterial cells in Micrococcus luteus / E. Zayko, D. Bataeva, **Y. Yushina**, A. Makhova, M. Grudistova // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2020. – 14. – P. 954–959. DOI: 10.5219/1354.
8. Ionin, A.A. Combatting bacterial biofilms and bacterial plankton for medicine and food industryvia laser nanotechnology / A. A. Ionin, S. A. Gonchukov, S. I. Kudryashov, A. A. Nastulyavichus, Yu. M. Romanova, I. N. Saraeva, A. A. Semenova, N. A. Smirnov, E. R. Tolordava, **Yu. K. Yushina** // Advanced Laser Technologies ALT`21: Book of abstracts the 28th International Conference, Moscow, 06–10 october 2021. – 2021. – P. 111.
9. **Yushina, Y**. Prevalence of *Campylobacter* spp. in a poultry and pork processing plants / Y. **Yushina,** D. Bataeva, A. Makhova, E. Zayko // Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences. – 2020. – 14. – P. 815–820. DOI: 10.5219/1422Q3, IF 0.26.
10. Velebit, B. The common foodborne viruses: a review / B. Velebit, V. Djordjevic, L. Milojevic, V. Jankovic, M. Babic, N. Grkovic, **Y. Yushina** // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 60. Сер. "60th International Meat Industry Conference. – MEATCON 2019". – 2019.– С. 012110.
11. **Yushina, Yu. K**. Bacterial populations and volatile organic compounds associated with meat spoilage / **Yu. K. Yushina,** D. S. Bataeva, E. V. Zaiko, A. A. Machova, B. Velebit // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 60. Сер. "60th International Meat Industry Conference. – MEATCON 2019". – 2019. – С. 012114.
12. Rakitin, A.L. Evaluation of Antibiotic Resistance of Salmonella Serotypes and Whole-Genome Sequencing of Multiresistant Strains Isolated from Food Products in Russia / A.L. Rakitin, Y. K. **Yushina,** E. V. Zaiko, D. S. Bataeva, O. A. Kuznetsova, A. A. Semenova, S. A. Ermolaeva, A. V. Beletskiy, T. V. Kolganova, A. V. Mardanov, S. O. Shapovalov, T. E. Tkachik // Antibiotics. – 2022. – 11(1). DOI: 10.3390/antibiotics11010001.

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

13. **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.

14. Зайко, Е.В. Изучение микробной популяции фаршей сырокопчёных колбас с помощью высокопроизводительного секвенирования / Е.В. Зайко, **Ю.К. Юшина,** Е.В. Груздев, А.В. Белецкий, А.В. Марданов, Д.С. Батаева, А.А. Семенова // Все о мясе. – 2021. – № 2. – С. 64-67.
15. Velebit, B. Factors influencing microbial transmission in a meat processing plant / B. Velebit, B. Lakicevic, A. Semenova, N. Revutskaya, **Yu. Yushina**, V. Nasonova // Theory and Practice of Meat Processing. – 2021. – V. 6. – № 2. – P. 183-190. DOI: 10.21323/2414-438X-2021-6-2-183-190.
16. **Юшина, Ю. К.** Перспективы применения MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа в пищевой микробиологии / Ю. К. Юшина, Д. С. Батаева, Е. В. Зайко, Н.А. Насыров, М.А. Грудистова // Все о мясе. – 2021. – № 4. – С. 56-58. DOI 10.21323/2071-2499-2021-4-56-58.
17. Батаева, Д. С. Разнообразие микроорганизмов порчи на поверхности тушек птицы в процессе хранения / Д. С. Батаева, М. А. Грудистова, **Ю. К. Юшина**, Е. В. Зайко// Все о мясе. – 2021. – № 3. – С. 68-72. DOI: 10.21323/2071-2499-2021-3-68-72.
18. Тутельян, А. В. Методы борьбы с биологическими пленками на пищевых производствах / А. В. Тутельян, Ю. М. Романова, Б. В. Маневич, **Ю. К. Юшина**, Л. С. Федорова, О. А. Синицына, А. П. Синицын, О. В. Ешманов // Молочная промышленность. – 2020. – № 11. – С. 48-53. DOI: 10.31515/1019-8946-2020-11-48-53.
19. Соколова, О. В. Исследование биопленкообразующей способности *Listeria monocytogenes* / О. В. Соколова, Ю. К. **Юшина** // Пищевая промышленность. – 2019. – № 4. – С. 94-95.
20. **Юшина, Ю. К.** Унификация методов контроля качественных характеристик мяса и мясных продуктов / Ю. К. Юшина, А. В. Куликовский, И. А. Становова // Все о мясе. – 2016. – № 4. – С. 18-22.
21. Батаева, Д. С. Идентификация микробиологических рисков контаминации туш крупного рогатого скота и свиней патогенными микроорганизмами при убое и переработке / Д. С. Батаева, **Ю. К. Юшина,** Е. В. Зайко // Теория и практика переработки мяса. – 2016. – 1 (2). – С. 34-41. DOI:10.21323/2414-438X-2016-1-2-34-41.
22. Зайко, Е. В. Изучение фенотипического и генотипического профиля устойчивости сероваров *S. enteritidis* и *S. typhimurium*, выделенных из мясного сырья для производства сырокопчёных колбас / Е. В. Зайко, Д. С. Батаева, Ю. К. **Юшина,** Д. М. Сатабаева // Все о мясе. – 2020. – № 3. – С.53-57. DOI: 10.21323/2071-2499-2020-3-53-57.
23. Батаева, Д. С. Расширение возможности использования мультискринингового микробиологического метода для определения химиотерапевтических препаратов в мясе / Д. С. Батаева, Е. В. Зайко, **Ю. К. Юшина,** В. Н. Горбунов // Все о мясе. – 2019. – № 3. – С. 36-39. DOI: 10.21323/2071-2499-2019-3-36-39.
24. 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.

25. Костенко, Ю. Г. Современные санитарно-микробиологические аспекты переработки крупного рогатого скота / Ю. Г. Костенко, **Ю. К. Юшина**, Н. В. Глазова, С. Г. Сальников // Все о мясе. – 2018. – № 1. – С. 46-49. DOI:10.21323/2071-2499-2018-1-46-49.
26. **Юшина, Ю. К.** Актуальные вопросы установления сроков годности пищевых продуктов / **Ю. К. Юшина** // Все о мясе. – 2018. – № 3. – С. 48-51. DOI: 10.21323/2071-2499-2018-3-48-51.
27. Батаева Д.С. Практическое применение научных разработок для контроля безопасности мяса и мясной продукции / Д. С. Батаева, **Ю. К. Юшина,** О. В. Соколова, Е. В. Зайко // Всё о мясе. – 2017. – № 3. – С. 3-5.
28. **Юшина, Ю. К.** Микробные контаминанты мяса: что нового? / **Ю. К. Юшина**, Д. С. Батаева, О. В. Соколова // Всё о мясе. – 2017. – №. 4. – С. 37-39.
29. Батаева, Д.С. Концептуальные подходы к экспресс-выявлению Campylobacter spp. в мясе убойных животных / Д. С. Батаева, М. Ю. Минаев, **Ю. К. Юшина**, О. В. Соколова, Е. В. Зайко // The oryand Practice of Meat Processing. – 2017. – Т. 2. – № 4. – С. 76-95. DOI: 10.21323/2414-438X-2017-2-4-76-95.
30. **Юшина, Ю. К.** Экспресс-методы анализа пищевых продуктов / **Ю. К. Юшина,** Н. Л. Вострикова, И. А. Становова // Пищевая промышленность. – 2011. – № 4. – С. 32-33.
31. Зайко, Е.В. Моделирование влияния антибиотиков на развитие микроорганизмов стартовых культур / Е. В. Зайко, Д. С. Батаева, **Ю. К. Юшина,** Д. М. Сатабаева, М. А. Грудистова // Все о мясе. – 2021. – № 1. – С. 42-47.
32. Зайко, Е. В. Изучение микробной популяции фаршей сырокопченых колбас с помощью высокопроизводительного секвенирования / Е. В. Зайко, **Ю. К. Юшина,** Е. В. Груздев, А. В. Белецкий, А. В. Марданов, Д. С. Батаева, А. А. Семенова. // Все о мясе. – 2021. – № 2. – С. 64-67.
33. Кузнецова, О. А. Особенности биопленкообразования штаммов *L.monocytogenes*, выделенных с производственных объектов мясоперерабатывающего предприятия / О. А. Кузнецова, **Ю. К. Юшина,** М. А. Грудистова, Е. В. Зайко, Д. М. Сатабаева // Все о мясе. – 2020. – № 4. – С. 50-54.
34. Тутельян, А. В. Образование биологических плёнок 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.
35. Соколова, О.В. Исследование биоплёнкообразующей способности *Listeria monocytogenes* / О. В. Соколова, **Ю. К. Юшина** // Пищевая промышленность. – 2019. – № 4. – С. 94-95.
36. Батаева, Д. С. Расширение возможности использования мультискринингового микробиологического метода для определения химиотерапевтических препаратов в мясе / Д. С. Батаева, Е. В. Зайко, **Ю. К. Юшина,** В. Н. Горбунов // Все о мясе. – 2019. – № 3. – С. 36-39.
37. **Юшина, Ю. К**. Испытательно-экспертный центр: профессионализм, оснащённый по высшему разряду / **Ю. К. Юшина** // Все о мясе. – 2010. – № 5. – С. 38-39.
38. Иванкин, А. Н. Биохимические изменения в мясных продуктах при длительном хранении / А. Н. Иванкин, **Ю. К. Юшина** // Мясная индустрия. – 2010. – № 12. – С. 58-61.

39. Храмов, М. В. Листериоз: лабораторная диагностика в современных условиях / М. В. Храмов, Ю. Г. Костенко, **Ю. К. Юшина,** Д. С. Батаева // Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т. 6. – № 3. – С. 121.
40. Костенко, Ю. Г. Создание системы быстрого контроля безопасности и качества продукции – актуальная проблема мясной отрасли России / Ю. Г. Костенко, **Ю. К. Юшина,** А. А. Брагута // Все о мясе. – 2009.– № 2. – С. 32-33.
41. Костенко, Ю. Г. Использование тестовых пластин питательных сред при ускоренном микробиологическом контроле мясных продуктов / Ю. Г. Костенко, **Ю. К. Юшина,** А. А. Брагута // Все о мясе. – 2009. – № 3. – С. 26-28.
42. 42. **Юшина, Ю. К.** Качество и безопасность продуктов. Современные методы определения / **Ю. К. Юшина** // Мясные технологии. – 2007. – № 3. – С. 22.
43. **Юшина, Ю. К.** Обнаружение листерий в мясном сырье и его санитарная оценка / **Ю. К. Юшина**, К. С. Янковский, Ю. Г. Костенко // Все о мясе. – 2003. – № 3. – С. 31-32.
44. Янковский, К.С. Контроль пищевых продуктов на наличие листерий / К.С. Янковский, Ю. Г. Костенко, Ю. К. Ерофеева // Мясная индустрия. – 2003. – № 1. – С. 26.

Материалы симпозиумов, конгрессов, конференций

45. Соколова, О. В. Молочнокислые бактерии как причина возникновения порчи мясной продукции / О. В. Соколова, **Ю. К. Юшина** // В сборнике: Безопасность и качество товаров. Материалы XII Международной научно-практической конференции. Под ред. С.А. Богатырева. – 2018. – С. 315-320.
46. Батаева, Д. С. Проблемы, связанные с наличием остаточных количеств антимикробных препаратов в мясе и в продуктах убоя животных и метод их обнаружения / Д. С. Батаева, Е. В. Зайко, **Ю. К. Юшина** // Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова. – 2016.– № 1. – С. 50-53.
47. Иванкин, А. Н. Изучение возможности применения комплекса наносеребра и лактата натрия для защиты пищевой продукции / А. Н. Иванкин, **Ю. К. Юшина,** Н. А. Горбунова, Ю. М. Евдокимов // В сборнике: Инновационные технологии – основа модернизации отраслей производства и переработки сельскохозяйственной продукции. Материалы международной научно-практической конференции. Волгоградский государственный технический университет, ГНУ Поволжский НИИ производства и переработки мясомолочной продукции. – 2011. – С. 201-203.
48. Вострикова, Н. Л. Безопасность и качество мясной продукции / Н. Л. Вострикова, **Ю. К. Юшина,** А. Н. Иванкин // Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова. – 2008. – С. 199.
49. Семенова А.А. Изучение микробных сообществ мясоперерабатывающих предприятий / А. А. Семенова, **Ю. К. Юшина,** М. А. Грудистова [и др.] // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: Материалы Международной конференции NT + M&Ec`2020. Весенняя сессия**,** Гурзуф, 31 мая – 10 2021 года. – Москва: ООО Институт новых информационных технологий, 2021. – С. 184-189. DOI: 10.47501/978-5-6044060-1-4.30. – EDN SBTEXP.
50. Храмов, М. В. Дифференциально-диагностическая среда для выделения листерий / М. В. Храмов, Н. И. Ажермачева, Ю. Г. Костенко, Т. С. Шагова, К. С. Янковский, **Ю. К.**

Ерофеева // Патент на изобретение RU 2223313 C2, 10.02.2004. Заявка № 2001135141/13 от26.12.2001.

51. Kostenko,Yu .G. Creation of Russian national system of foods safety with regards to the presence of pathogenic listeria / Yu. G. Kostenko, K. S. Yankovsky, **Yu. K. Erofeyeva**, I. S. Tartakovsky, S. A. Yermolayeva, M. V. Khramov, V. M. Kotlyarov, S. A. Sheveleva // В сборнике: ISOPOL XV. Abstracts. – 2004. – С. 75-76.
52. **Юшина, Ю. К**. Мониторинг мяса на наличие остаточных количеств антимикробных веществ и управление рисками, возникающих при производстве и употреблении мясных продуктов / **Ю. К. Юшина**, Д. С. Батаева, Е. В. Зайко // Интенсификация пищевых производств: от идеи к практике. – 2018. – С. 108-109.
53. Соколова, О. В. О биопленках листерий / О.В. Соколова, **Ю. К. Юшина** // В сб.: Сборник научных трудов к 75-летию со дня основания ВНИИМС "Научные подходы к решению актуальных вопросов в области переработки молока". – 2019. – С. 224-226.
54. **Юшина, Ю. К.** Образование бактериальных биопленок патогенными листериями/ Ю. К. Юшина, О. В. Соколова // В сборнике: Приоритеты модернизации и технологического развития продовольственного сектора Российской Федерации на современном этапе. Материалы Всероссийской научно-технической конференции с международным участием. – 2019. – С. 23.
55. Соколова, О.В. Молочнокислые бактерии как причина возникновения порчи мясной продукции / О. В. Соколова, **Ю. К. Юшина** // В сборнике: Безопасность и качество товаров Материалы XII Международной научно-практической конференции. Под ред. С.А. Богатырева. Саратов. – 2018. – С. 315-320.
56. Соколова, О.В. Биопленки патогенов как причина рецидивирующей контаминации патогенными листериями. / О. В. Соколова, **Ю. К. Юшина**, Д. С. Батаева // Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2018». – 2018. – С. 167-168.
57. Соколова, О. В. Бактериальный матрикс как фактор выживания и распространения Listeria monocytogenes / О. В. Соколова, **Ю. К. Юшина** // Инновационные процессы в пищевых технологиях: наука и практика: материалы Международной научно-практической конференции (19-20 февраля 2019, Москва). ВНИИЗ – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН. – 2019. – С. 337-343.
58. Соколова, О. В. Фотометрическое исследование количества биопленок Listeria monocytogenes / О. В. Соколова, **Ю. К. Юшина** // XI Международная научная конференция студентов и аспирантов "Техника и технология пищевых производств": материалы конференции. – 2019.
59. **Юшина, Ю. К.** Образование бактериальных биопленок патогенными листериями / **Ю. К. Юшина**, О. В. Соколова // I Всероссийская научно-техническая конференция с международным участием "Приоритеты модернизации и технологического развития продовольственного сектора Российской Федерации на современном этапе": материалы конференции. – 2019.