

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

На правах рукописи

КИШИЛОВА СВЕТЛАНА АНАТОЛЬЕВНА

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К ОПТИМИЗАЦИИ
КОНТРОЛЯ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* НА МОЛОЧНЫХ
ПРОИЗВОДСТВАХ.**

4.3.5 – Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ

4.3.3 – Пищевые системы

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Фоменко О.Ю.
кандидат технических наук
Рожкова И.В.

МОСКВА, 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	10
1.1. Общая характеристика <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и ее распространение в окружающей среде	10
1.2 Метаболические характеристики и особенности <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ..	12
1.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> и комплексная оценка безопасности в пищевой отрасли.....	18
1.2.4 Формирование устойчивости <i>P. aeruginosa</i> к технологическим воздействиям.	27
1.3 Идентификация и методы контроля <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ	38
ГЛАВА 2 МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ, СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	39
2.1 Организация экспериментальных работ	39
2.2 Объекты исследований.....	41
2.3 Методы исследований	44
2.4 Математическая обработка данных.	54
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	56
3.1 Выделение и идентификация штаммов синегнойной палочки дикого типа. 56	56
3.2 Изучение морфологических, культуральных, биохимических свойств выделенных штаммов	57
3.3 Изучение эффективности действия биологических антимикробных агентов на рост штаммов <i>P. aeruginosa</i>	65
3.4 Изучение эффективности элиминации <i>P. aeruginosa</i> в зависимости от	

температурно-временных параметров среды при испытании режимов пастеризации и хранения молока.	90
3.5 Изучение эффективности действия биоцидных препаратов на элиминацию штаммов <i>P. aeruginosa</i>	102
ВЫВОДЫ	112
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	114
ПРИЛОЖЕНИЯ	135
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	140

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы.

Молоко и молочные продукты являются одними из важнейших в рационе человека, поэтому базовой задачей молочной промышленности является обеспечение населения качественной и безопасной продукцией. К бактериям, часто выделяемым в пищевой промышленности, относятся представители псевдомонад. Особое значение для безопасности пищевых продуктов имеет условно-патогенная психротрофная бактерия *Pseudomonas aeruginosa* (синегнойная палочка), как микроорганизм с исключительными адаптивными способностями, растущий в широком диапазоне температур и активно образующий биопленки. *P. aeruginosa*, являющаяся причиной тяжелых заболеваний у человека, особенно у лиц с ослабленным иммунитетом, является не только причиной порчи молочных продуктов, но и прямой угрозой здоровью людей – попадание возбудителя в организм с контаминированной пищей может рассматриваться как начальный этап колонизации. На сегодняшний день *P. aeruginosa* не нормируется в молоке и молочных продуктах, но роль данной бактерии в контаминации пищевых, в том числе молочных продуктов, постоянно нарастает, что связано как с общим ухудшением экологической ситуации, так и с укрупнением производств и повсеместным внедрением механического доения. Пороки, вызываемые *P. aeruginosa*, разнообразны и включают изменение цвета, консистенции и вкуса продуктов; устойчивые к температурам пастеризации и стерилизации ферменты бактерии вызывают порчу при хранении готовой продукции. Существование бактерии на производствах в составе биопленок приводит к недостаточной эффективности санитарных мероприятий. Несмотря на постоянное совершенствование санитарно-гигиенических процедур и системы контроля качества, *P. aeruginosa* остается серьезной экономической проблемой как для молочной промышленности, вызывая разнообразные признаки порчи продукции, так и для общественного здоровья.

Степень разработанности темы. Качество выпускаемых молочных

продуктов формируется под влиянием микробиологических процессов, оказывающих как положительное, так и отрицательное влияние на безопасность готовой продукции. Значительный вклад в развитие санитарной микробиологии молока внесли Шевелева С.А., Ефимочкина Н.Р., Королева Н.С., Рожкова И.В., Семенихина В.Ф., Свириденко Г.М., Харитонов В. Д., Rossi, Marshan и др. Однако, в области безопасности пищевых продуктов *P. aeruginosa* недостаточно изучена, между тем высокая метаболическая пластичность, быстрая воспроизводимость, высокие адаптационные способности и возможность роста при низких температурах делают ее распространённым возбудителем пищевых инфекций, часто выделяемым на предприятиях пищевой промышленности в разных странах. В связи с вышеизложенным, актуальным является изучение влияния температурно-временных факторов на элиминацию *P. aeruginosa* в молоке и изучение чувствительности патогена к действию антимикробных агентов.

Цель и задачи исследования. Цель работы – разработка методических подходов к оптимизации контроля *P. aeruginosa* на молочных производствах и снижение рисков безопасности и качества молочной продукции. В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи исследования:

1. Провести обзор научно-технической литературы, освещающий вопросы метаболизма *P. aeruginosa*, персистенции бактерии на молочных производствах и в природных объектах, принципов ее идентификации и методов контроля;
2. Провести санитарно-гигиенический мониторинг на молочных производствах при подозрении на контаминацию *P. aeruginosa*. Выделить и идентифицировать штаммы, персистирующие на предприятии; выявить возможные источники контаминации;
3. Изучить морфологические, культуральные и биохимические свойства выделенных штаммов *P. aeruginosa* дикого типа; сравнить ферментативную активность выделенных штаммов и типового коллекционного штамма;
4. Определить чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к действию биологических антимикробных агентов;

5. Изучить эффективность элиминации *P. aeruginosa* в зависимости от температурно-временных параметров среды при исследовании технологически значимых режимов пастеризации и хранения молока;
6. Определить чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к действию биоцидных препаратов;
7. Разработать СТО ВНИМИ (МР) по оптимизации контроля *P. aeruginosa* при производстве молочной продукции.

Научная новизна.

Получены зависимости эффективности элиминации *P. aeruginosa* от температурно-временных параметров среды при исследовании технологически значимых режимов пастеризации и хранения молока.

Научно обоснованы рекомендуемые температурно-временные параметры обработки молока для подтвержденной элиминации клеток *P. aeruginosa*. Показана способность реактивации термически поврежденных клеток *P. aeruginosa* при хранении молока.

Показана вариабельность штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующих на молочных производствах, относительно чувствительности к биологическим и химическим антимикробным агентам.

Установлена перспективность применения молочнокислых культур, как дополнительного барьера против *P. aeruginosa*.

Теоретическая и практическая значимость заключалась в определении зависимости выживаемости штаммов *P. aeruginosa* от температурно-временных параметров при исследовании режимов пастеризации и хранения молока; выявлении вариабельности свойств штаммов *P. aeruginosa* (коллекционного и выделенных на молочных производствах) при использовании химических и биологических антимикробных агентов. Доказана необходимость корректировки режимов пастеризации при риске контаминации *P. aeruginosa*; важность мониторинга реактивации патогенов при хранении; перспективность применения молочнокислых культур как дополнительного барьера против *P. aeruginosa*; необходимость подтверждения эффективности рабочих

концентраций используемых дезинфицирующих средств и их ротации для недопущения формирования резистентности у бактерий.

На основании полученных результатов разработан СТО ВНИМИ (МР) № 00419785-084-2025 «Оптимизация контроля *Pseudomonas aeruginosa* при производстве молочной продукции».

Методология и методы исследования.

Исследования проведены во ФГАНУ «ВНИМИ» в рамках выполнения работ по Государственному заданию № FNSS–2024-0002 и № FNSS–2025-0004. Методология работы построена на выполнении следующих этапов: ретроспективный поиск и формализация проблемы, анализ научно-технического материала, постановка цели и задач, проведение исследований, обработка полученного материала и оформление выводов по результатам работы. Апробация разработанного СТО ВНИМИ (МР) осуществлена на базе предприятий ООО «Итальянские традиции», АО «Зеленоградское», ОАО «Брянский молочный завод».

При выполнении работы применяли микробиологические и биохимические методы исследования с соответствующей статистической обработкой. Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ЦКП ВНИМИ).

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследований морфологических, культуральных и биохимических свойств штаммов *P. aeruginosa*, выделенных на производственных объектах и их сравнение со свойствами типового коллекционного штамма;
2. Результаты экспериментальной оценки чувствительности исследуемых штаммов *P. aeruginosa* к биологическим antimикробным агентам;
3. Результаты исследования механизмов antimикробного действия штамма *L. helveticus* NK1 при совместном культивировании с *P. aeruginosa*;

4. Результаты экспериментальных исследований эффективности элиминации *P. aeruginosa* в зависимости от температурно-временных параметров при пастеризации и хранении молока;

5. Результаты экспериментальной оценки чувствительности исследуемых штаммов *P. aeruginosa* к действию биоцидных препаратов.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность теоретических и экспериментальных данных подтверждается тщательно спланированной программой исследований, соразмерной выборкой объектов, применением современной научно-методической и приборной базы, а также методов статистической обработки массивов данных.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы были предметом докладов на научных конференциях: XII Всероссийская научная конференции студентов, аспирантов и молодых ученых (Кемерово, 2024 г); XXIV Международная Научно-практическая конференция, посвященная памяти В.М. Горбатова (Москва, 2024 г); Научно-практическая конференция с международным участием «Перспективы дезинфектологии. Актуальные вопросы обработок в современном пищевом производстве» (Москва, 2024 г); VII Международная научно-практическая молодежная конференция «Поландовские чтения», (Москва, 2025 г).

Личный вклад автора. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. Непосредственный вклад автора состоит в рассмотрении источников научной литературы, разработке дизайна исследования, участия в формулировании целей и задач исследования, проведении экспериментов, анализе результатов и формулировании выводов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 работ, из них 6 статей в журналах Перечня рецензируемых научных журналов ВАК РФ (К1 и К2), 4 статьи – в изданиях, индексируемых в международных базах научного цитирования Scopus и Web of Science.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, литературного обзора, объектов и методов работы, экспериментальной части,

выводов, перечня использованных литературных источников и приложений. Работа изложена на 141 странице машинописного текста, содержит 9 таблиц и 49 рисунков. Список литературы включает 189 источников, из них 57 отечественных и 132 зарубежных авторов.

ГЛАВА 1 ОБЗОР НАУЧНО-ТЕХНИЧЕСКОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика *Pseudomonas aeruginosa* и ее распространение в окружающей среде

Общие сведения

Pseudomonas aeruginosa (синегнойная палочка) – грамотрицательная аэробная психрофильно-мезофильная бактерия. Относится к семейству *Pseudomonadaceae*. В составе семейства на основании гомологии 16S рРНК выделяют 5 групп. *P. aeruginosa* относится к роду *Pseudomonas* (I группа рРНК гомологии) и входит в подгруппу *Fluorescent* наряду с *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas putida*. Клетки *P. aeruginosa* имеют форму прямых палочек размером 1–3 мкм. Бактерия способна сохранять жизнеспособность и размножаться при температуре от 6°C до 42°C, каталазо- и оксидазоположительна, подвижна, является активным биопленкообразователем [1, 2]. *P. aeruginosa* – облигатный аэроб. При росте на плотных средах у отдельных штаммов наблюдается эффект радужного лизиса. На жидких средах образует характерную поверхностную пленку [3]. Подавляющее большинство штаммов *P. aeruginosa* продуцируют пигменты, причем наличие зеленого пигмента пиоцианина характерно только для *P. aeruginosa* [4]. Рост *P. aeruginosa* часто сопровождается специфическим цветочно-парфюмерным запахом, благодаря продукции летучих соединений различного спектра. Однако, также встречаются штаммы, не продуцирующие пахучие вещества [1].

Геном P. aeruginosa

Геном *P. aeruginosa*, представляющий собой одну кольцевую хромосому, содержит около 7 миллионов пар оснований. 65% составляют комплементарные друг другу гуанин и цитозин [4]. *P. aeruginosa* отличается от других прокариот наибольшим количеством регуляторных генов – до 8,4% от общего размера хромосомы [5]. Полный набор генов среди различных штаммов *P. aeruginosa*

варьируется от 10 000 до 40 000 генов, их расположение в геноме может различаться у разных штаммов, что затрудняет идентификацию с помощью генетических маркеров [6]. Геном включает в себя большую долю регуляторных генов (например, насосов для выведения токсичных для клетки веществ и других транспортных белков, генов, отвечающих за подвижность и хемотаксис), генов, контролирующих метаболические пути (что позволяет адаптироваться к различным метаболическим состояниям), а также генов, кодирующих множество факторов вирулентности и детерминант устойчивости к антибиотикам [7,8]. Разнообразие генома *P. aeruginosa* дополнительно увеличивается за счет внедрения мобильных генетических элементов посредством горизонтального переноса генов. *P. aeruginosa* также обладает врождённым способом увеличения генетического разнообразия в гипермутабельных штаммах [7].

*Распространение *P. aeruginosa* в окружающей среде*

Высокая приспособляемость и неприхотливость к источникам питания делает *P. aeruginosa* практически вездесущей. *P. aeruginosa* можно встретить в пресной и соленой воде, в стоках промышленных предприятий и медицинских учреждений. Есть данные о положительной корреляции распространения этого микроорганизма с антропогенным загрязнением природных объектов, в том числе нефтепродуктами и пестицидами [6, 9]. Бактерия обнаруживается в различных типах почв, в том числе засоленных; на коже теплокровных животных и человека, в мусоре, на поверхностях растений. Вызывает признаки гнили у разных видов салата, картофеля, томатов, выделяется из свежих сырых овощей, фруктов и зелени [10, 11]. Часто контаминирует питьевую воду и пищевые продукты с высоким содержанием воды и pH 6,5-7,4 (красное мясо, рыба, птица, молоко и молочные продукты) [12].

В природе может паразитировать в простейших и являться патогеном ряда насекомых; длительно сохраняет жизнеспособность на различных поверхностях, в том числе на тканях из различных материалов (до трех месяцев) [4]. Будучи условно-патогенным, данный микроорганизм способен вызывать у человека ряд

тяжелых заболеваний, являясь одной из основных причин внутрибольничных инфекций [13].

Благодаря высокой метаболической пластиности, быстрой воспроизводимости, высокой адаптационной способности и возможности роста при низких температурах *P. aeruginosa* распространена по всему миру и является распространённым возбудителем пищевых инфекций [14].

1.2 Метаболические характеристики и особенности *Pseudomonas aeruginosa*

Метаболизм P. aeruginosa

Метаболизм *P. aeruginosa* (синегнойной палочки) позволяет ей использовать широкий круг веществ в качестве нутриентов – от простых углеводов и тканей человека и животных до дeterгентов и биоцидных препаратов [1]. Ограниченнная потребность в питательных веществах дает возможность синегнойной палочке сохранять свою жизнеспособность при почти полном отсутствии нутриентов [4]. Даже без источников углерода количество клеток снижается всего на 1–2 порядка. Оптимальный pH для роста *P. aeruginosa* составляет 7,2-7,5, возможно сохранение жизнеспособности в диапазоне 4,5-9,0 [15].

Данные исследований ингибирующего влияния pH на штаммы *P. aeruginosa*, выделенные из молочных продуктов в Багдаде, показали, что 12% изолятов сохраняли жизнеспособность при pH 2,3 [16]. Способность *P. aeruginosa* использовать для роста четвертичные аммониевые и фенолсодержащие соединения позволяет ей сохранять жизнеспособность в растворах дезинфицирующих агентов.

Ферменты P. aeruginosa

Большую проблему для молочной промышленности представляют внеклеточные ферменты *P. aeruginosa* из-за их высокой термостабильности. Микроорганизм обладает выраженной протеолитической, пептидазной, протеазной, а также липолитической активностью, гидролизует казеин,

утилизирует гемоглобин; восстанавливает нитраты до нитритов и далее до молекулярного азота [1]. После пастеризации активность ферментов *P. aeruginosa* сохраняется до 60-70% даже в случае тепловой деструкции клеток патогена, и до 30-40% при УВТ-обработке [17]. К внеклеточным ферментам *P. aeruginosa* относятся протеазы и липазы, способные вызывать разнообразные дефекты вкуса, цвета и запаха, в том числе появление в продукции синего пигмента. Протеазы *P. aeruginosa* гидролизуют как κ -казеин, так и α S1 -казеин и β -казеин, что приводит к разрушению казеиновых мицелл и гелеобразованию. Под действием липаз в молоке образуются свободные жирные кислоты, обуславливающие прогорклый вкус [17,18]. Протеолитическая активность, связанная с наличием протеаз, относится к основным физиолого-биохимическим свойствам микроорганизмов. Термин протеолитический фермент включает все гидролазы, которые действуют на белки, или далее разрушают их фрагменты [19]. Протеазы разделяют на пептидазы – расщепляющие пептиды и дипептиды, и протеиназы, расщепляющие непосредственно белок и полипептиды. *P. aeruginosa* свойственна множественная продукция протеаз. Протеазы вызывают горечь и образование геля в молоке, снижение выхода мягкого сыра. Большинство протеаз способны разрушать казеины.

Липазы приводят к нарушению вкуса, гидролизуя триглицериды, связанные с расщеплением жиров в сливках, сливочном масле, сыре и ультрапастеризованных продуктах, с образованием низкомолекулярных жирных кислот [20]. Липолитическая активность приводит к появлению нежелательных привкусов у продукта, таких как прогорклый, нечистый, горький или мыльный [21]. Способность штаммов *P. aeruginosa* активно вырабатывать протеазы и лецитиназы во многих случаях коррелирует с вирулентностью [22].

*Пигменты *P. aeruginosa**

Подавляющее большинство штаммов *P. aeruginosa* производят пигменты. Это прежде всего зеленый пиовердин, флуоресцирующий при ультрафиолетовом облучении, и водорастворимый пиоцианин, дающий сине-зеленое окрашивание. Интенсивность окрашивания коррелирует с вирулентностью – способностью

бактерии лизировать эритроциты [23, 24]. Также у синегнойной палочки встречается красный пигмент пиорубин, желтый L-оксифеназин и черно-коричневый пиомеланин. Меланинобразующие штаммы более вирулентны – они легче переносят гипоксию при инфицировании глубоких тканей благодаря защитному действию пиомеланина от ультрафиолетового излучения и низких концентраций кислорода. Как в клинической практике, так и в объектах внешней среды встречаются и атипичные беспигментные формы, а также штаммы со слабо выраженной пигментацией. При исследовании молочных продуктов и мяса с рынков города Ульяновска было выделено 35 штаммов *P. aeruginosa*, из них 4 беспигментных формы [25]. Наличие у бактерии беспигментных форм существенно затрудняет идентификацию микроорганизма. Крайне немногочисленные штаммы produцируют сразу несколько пигментов [23]. Предполагается, что синтез пигмента помогает противостоять повышенному окислительному стрессу. У *P. aeruginosa* обнаружен ген *ospR*, реагирующий на окислительный стресс и регулирующий выработку пигмента, также действующий на устойчивость *P. aeruginosa* к бета-лактамам [26].

*Бактериоцины и сидерофоры *P. aeruginosa**

P. aeruginosa способна синтезировать пиоцины – бактериоцины, ингибирующие рост Гр+ и Гр- бактерий. Их физиологическая роль окончательно не ясна, вероятно, они помогают доминированию *P. aeruginosa* в бактериальной экостише [27]. Описаны 3 типа пиоцинов. R и F пиоцины напоминают по форме хвосты бактериофагов и происходят от предкового гена, имеющего сходство с семейством фагов. S тип представляет собой чувствительный к протеазам белок. Гены пиоцинов *P. aeruginosa* расположены в хромосоме, тогда как у большинства других микроорганизмов бактериоцины кодируются плазмидами. Один штамм часто производит несколько пиоцинов, причем уровень их синтеза возрастает при возникновении того или иного фактора стресса [28]. Интересной особенностью *P. aeruginosa* является наличие нескольких систем захвата железа из окружающей среды, называемых сидерофорами, что позволяет синегнойной палочке лишать человеческие клетки ионов железа, необходимых для работы

дыхательной цепи [1]. Кроме собственных сидерофор, *P. aeruginosa* использует для своих нужд гем от гемопротеинов человека. Это явление получило название «сидерофорное пиратство» [29].

*Заболевания, ассоциированные с *P. aeruginosa**

Синегнойная палочка может быть причиной ряда заболеваний человека, вызывая острые и хронические инфекции, в том числе гнойные воспаления ран и ожогов [30,31], заболевания легких и ЛОР-органов [32], мочеполового тракта [33], причем в мировой популяции *P. aeruginosa* вирулентность варьируется от клона к клону и от штамма к штамму [34]. Опасность инфицирования существует при посещении бассейнов и во время бальнеологических процедур; снижение под действием тепла бактерицидной активности хлора может создать условия для образования биопленок *P. aeruginosa* на гидроконструкциях и привести к инфицированию воды [35]. Инфицирование синегнойной палочкой серьезно осложняет лечение травм, за счет выработки медиаторов воспаления и токсинов, том числе синильной кислоты [1, 36]. Продукция нескольких контактных токсинов с помощью поверхностного молекулярного комплекса, проникающих в цитоплазму клетки, на которой адгезирована *P. aeruginosa* [37], дает ей серьезные преимущества в противоборстве с иммунной системой – контактные токсины, не выходящие во внеклеточную среду, не могут быть нейтрализованы антителами [38]. Бактерия входит в тройку основных возбудителей оппортунистических инфекций у людей и ежегодно поражает более 2 миллионов пациентов, убивая около 90 тысяч человек в год [39]. Смертность от состояний, вызванных *P. aeruginosa*, достигает 38%, и лечение данной инфекции продолжает оставаться непростой задачей. ВОЗ включила *P. aeruginosa* в список важнейших приоритетных патогенов [40].

Устойчивость к антимикробным препаратам

Как уже отмечалось, по сравнению с другими прокариотами *P. aeruginosa* обладает существенно большим геномом, благодаря чему способна кодировать необычайно большое число регуляторных белков. Это придает микроорганизму очень высокие адаптивные способности по отношению к внешним воздействиям,

включая способность быстро развивать устойчивость к множеству классов антимикробных препаратов [41, 42, 43].

По сравнению с другими грамотрицательными бактериями, для *P. aeruginosa* характерна врожденная – кодируемая хромосомами – сниженная чувствительность к ряду антибиотиков – цефалоспоринам, макролидам, ампициллину, неомицину, хлорамфениколу и другим. Она называется природной резистентностью и связана с отсутствием мишней для групп антибиотиков и с наличием ферментов, способных их инактивировать [2]. Однако из-за мутаций и/или снижения активности систем инактивации антибиотиков некоторые штаммы могут проявлять к ним чувствительность [44]. В дикой популяции доля таких чувствительных штаммов находится в интервале 1–3%. Приобретенная устойчивость возникает как результат синтеза новых белков, изменения структуры и функций уже существующих, приобретения извне новых генов и изменения активности существующих [5]. Активация этих процессов ускоряется благодаря особенностям выживших после действия биоцидных веществ клонов *P. aeruginosa*. Их генетический аппарат с вероятностью в 1000 раз выше, чем у среднестатистического штамма, склонен к спонтанным мутациям. Это так называемые бактерии гипермутабельного фенотипа [45]. Причина его возникновения – поломки системы репарации хромосомной ДНК, полезные для выживания микроорганизма под давлением антимикробных веществ. В результате избирательной селекции жизнеспособность сохраняют только те клоны, мутации которых направлены на нейтрализацию факторов стресса. Ресурсы клетки при этом перенаправляются на формирование резистентности в ущерб процессам общего метаболизма. В отсутствии стрессорного давления клоны, продолжающие поддерживать резистентность, вытесняются популяциями с более эффективным метаболизмом [5]. Это явление дает надежду, что в борьбе с глобальной резистентностью микроорганизмов мероприятия по регулированию использования антибиотиков имеют перспективу.

Очень низкая проницаемость внешней мембранны и одновременно эффективно работающая система активного выброса токсичных для клетки

веществ – эффлюкса [1], также является важным механизмом устойчивости *P. aeruginosa* к антимикробным препаратам [46]. Система, ответственная за выброс ряда антибиотиков, состоит из трех белков. МехА и МехВ, связанные с цитоплазматической мембраной, осуществляют вывод из цитоплазмы в периплазму, а белок OprM, расположенный на внешней клеточной мембране, выводит токсичный для клетки препарат из периплазмы во внешнюю среду. Гены данных белков организованы в единый оперон и регулируются геном *texR*. У некоторых госпитальных штаммов обнаружена сверхэкспрессия эффлюксных систем, позволяющая сохранять жизнеспособность в условиях постоянного давления антибиотиков [1].

Нарушения протоколов дезинфекционных процедур, использование интенсивных технологий при выращивании сельскохозяйственных животных, бесконтрольное использование антибиотических препаратов приводят к возникновению форм патогенных микроорганизмов, включая *P. aeruginosa*, обладающих множественными факторами патогенности и устойчивостью к широкому кругу антибиотиков и биоцидных веществ [47]. В сочетании с высоким уровнем внутренней устойчивости к антимикробным препаратам, дополнительная приобретенная устойчивость способствует появлению штаммов, представляющих собой серьезнейшую проблему для общественного здоровья [48]. В большинстве государств проблема множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) в последние десятилетия представляет собой серьезную проблему для важнейших секторов экономики, таких как здравоохранение, сельское хозяйство и пищевые производства [49]. Проблема усугубляется нежеланием крупных фармацевтических компаний разрабатывать новые антибактериальные препараты в связи с высокой частотой неудач [50]. Перенос генов антибиотикоустойчивости может осуществляться на плазмидах, транспозонах, профагах, а также микроорганизмы могут получать эти гены посредством горизонтального переноса, причем не только от одного и того же, но и от разных видов бактерий [51].

Горизонтальный перенос генов может происходить с помощью

трансформации – поглощением бактериями фрагментов ДНК из окружающей среды. При активном разрушении бактериальных клеток биоцидными препаратами ДНК высвобождается. При этом показано, что некоторые из используемых в пищевом производстве дезинфицирующих средств способны защищать ДНК от деградации, предотвращая ее разрушение, в том числе бактериальными ДНКазами, увеличивая вероятность горизонтального переноса генов антибиотикорезистентности [52]. Трансдукция (пернос ДНК с помощью бактериофагов) и конъюгация (обмен генетическим материалом путем установления межклеточного контакта) также являются способами горизонтального переноса генетической информации, управляемой эволюционными процессами в бактериальных сообществах [53].

1.3 *Pseudomonas aeruginosa* и комплексная оценка безопасности в пищевой отрасли

1.3.1 Пороки, вызываемые *P. aeruginosa*

В пищевой отрасли *P. aeruginosa* является одним из высокоинфекционных патогенов, ставящих под угрозу безопасность пищевых продуктов. Данный микроорганизм хорошо известен, как вызывающий порчу молочных продуктов и молока. Питательные вещества молока и молочных продуктов делают их крайне восприимчивыми к микробиологическому загрязнению. Процессы тепловой обработки, уничтожающие вегетативные клетки *P. aeruginosa*, не затрагивают выработанные микроорганизмом ферменты, вызывающие в дальнейшем порчу продукта. Пороки, вызываемые бактерией *P. aeruginosa* разнообразны: изменение цвета молока, «посинение» творога, мягких сыров, горечь, образование геля в молоке, снижение выхода мягкого сыра, появление нежелательных привкусов у продукта, таких как прогорклый, нечистый, мыльный [21]. Устойчивые к повышенным температурам ферменты бактериального происхождения представляют собой самую важную проблему порчи термически обработанного молока и связанных с ним молочных продуктов. Сухое молоко может быть затронуто остаточной термостойкой липазой, т.к. липазы сохраняют большую

активность, чем пептидазы, в сухом молоке при длительном хранении и вызывают порчу при добавлении в качестве ингредиентов к жирным компонентам сухих сывороточных продуктов и сухого обезжиренного молока [20, 54].

Способность штаммов активно вырабатывать протеазы и лецитиназы во многих случаях коррелирует с вирулентностью [22]. Причем механизмы процессов порчи, вероятно, зависят от штамма и связаны с условиями окружающей среды. Так, штаммы с более выраженным образованием пиоцианина, демонстрировали существенное повышение гемолитической активности, причем эта гемолитическая активность была терморезистентна [55]. Штаммы, выделенные в зимний период, обладали большей скоростью роста и активнее вырабатывали протеолитические ферменты, по сравнению с изолятами, полученными в теплое время года [56]. На сегодняшний день, наиболее эффективным и одновременно экономичным способом предотвращения порчи, связанной с ферментами бактериального происхождения, являются профилактические меры – соблюдение правил доения, транспортировки и хранения молока, тщательный контроль воды для мойки оборудования и цехов, правильная конструкция оборудования для доения, эффективные процедуры дезинфекции.

1.3.2 Влияние экологических факторов на биобезопасность

В современных условиях нагрузка на системы обеспечения качества на пищевых производствах неуклонно возрастает. Это связано, прежде всего, с общим ухудшением экологической обстановки и усилением антропогенного давления на экосистемы. Ситуация усугубляется глобальной качественной перестройкой микробных сообществ, вызывающих инфекции у человека. Попадание в окружающую среду биоцидных средств вместе с отходами фармацевтических производств, сливами медицинских учреждений, бытовыми отходами способствует возникновению устойчивых форм микроорганизмов в природных экосистемах, включая объекты водопользования. Исходя из данных Роспотребнадзора, около трети водоемов России по показателям микробного и химического загрязнения превышают допустимые санитарные нормативы [57].

Значительная часть вод рек России в связи с высоким уровнем загрязнения не может быть использована в любых хозяйственных целях. Проводимая реконструкция очистных сооружений не успевает за ростом антропогенной нагрузки и зачастую не предотвращает интенсивного загрязнения водных объектов. Химические загрязнители – биоциды и тяжелые металлы – способствуют селекции резистентных микроорганизмов, а органические отходы создают питательную среду для размножения бактерий, включая патогенные формы [58]. Исследования воды Цимлянского водохранилища и Нижнего Дона выявили широкую циркуляцию штаммов микроорганизмов, включая *P. aeruginosa*, с высоким уровнем устойчивости к лекарственным препаратам [42]. На территории Австрии устойчивые к антибиотикам *P. aeruginosa* выделены из воды Дуная [59]. Загрязненная вода открытых водоемов способна образовать резервуар для антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов. При использовании такой воды для мойки молочнохозяйственного оборудования вероятность проникновения штаммов *P. aeruginosa* на производство крайне высока.

Поверхностные воды являются конечной точкой для очищенных и неочищенных стоков во многих странах, и перенос резистентных к антимикробным препаратам *P. aeruginosa* является глобальной проблемой [60].

1.3.3 Угроза распространности полирезистентных микроорганизмов в пищевых продуктах

Повсеместное бесконтрольное использование бактерицидных препаратов в период пандемии короновируса послужило дополнительным импульсом распространения микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [61].

Во многих странах объемы антибиотиков, применяемых в сельском хозяйстве и ветеринарии, многократно превышают объемы, используемые непосредственно в медицинской практике, что усиливает селективное давление на микроорганизмы в пищевой цепи [62]. Исследование распространности полирезистентных микроорганизмов в пищевых продуктах показало, что их доля

составляет до 50% изученных штаммов, причем селекция полирезистентности может быть вызвана не только антибиотиками, но и дезинфицирующими средствами [63]. Исследование, проведенное в Нигерии, выявило 54 штамма *P. aeruginosa* из 82 образцов зелени, 10 из этих 54 штаммов продуцировали лактамазу расширенного спектра [64]. Стressовая ситуация, к которой относится и воздействие дезинфектантов, увеличивает генетическую гетерогенность популяции с возможностью отбора устойчивых форм. Из мясного фарша в Египте была выделена *P. aeruginosa*, устойчивая ко всем антибиотикам, кроме колистина [65]. На Ямайке образцы овощей, собранные в супермаркетах (55,6%) и продуктовых магазинах (72,3%), были сильно загрязнены *P. aeruginosa*, устойчивыми к ампициллину (100%), хлорамфениколу (84%), триметоприму (83%) и азtreонаму (41%), при этом 35% этих изолятов были нечувствительны ко всем четырём антибактериальным препаратам [39]. Изучение распространения форм *P. aeruginosa* с МЛУ, выделенных на молочных предприятиях и в домашних хозяйствах Саудовской Аравии, показало высокую долю устойчивых форм – до 81,4% [66], причем в домашних хозяйствах распространенность *P. aeruginosa* была в 5 раз выше, и доля штаммов с МЛУ также была велика. Это, скорее всего, связано с массовым бесконтрольным применением в домашних хозяйствах антибиотиков. Чаще всего в обследованных хозяйствах встречались штаммы, резистентные к сульфаниламидам – широко применяемым во многих странах синтетическим антибиотикам с низкой стоимостью [67]. На сегодняшний день МЛУ у *P. aeruginosa*, ассоциированная с пищевыми продуктами, в частности молоком и сырами, попадающими в организм без предварительной термической обработки, еще не стала массовой угрозой общественному здравоохранению. Однако, очевидны риски ее нарастания, в том числе из-за возможной передачи генов устойчивости другим бактериям, патогенным для животных и человека [68, 69].

В настоящее время практически во всех странах мира распространение резистентных штаммов синегнойной палочки достигло глобальных масштабов. Резистентные штаммы *P. aeruginosa* включены Всемирной Организацией

Здравоохранения в приоритетный лист патогенов, требующих разработки и поиска новых антимикробных препаратов [40].

1.3.4 Риски персистенции *P. aeruginosa* на молочных производствах

В области безопасности пищевых продуктов *P. aeruginosa* недостаточно изучена, между тем высокая метаболическая пластичность, быстрая воспроизводимость, адаптационные способности и возможность роста при низких температурах делают *P. aeruginosa* распространённым возбудителем пищевых инфекций, часто выделяемым на предприятиях пищевой промышленности [14]. Устойчивость *P. aeruginosa* к широкому спектру стрессовых воздействий, включая обычные дезинфицирующие средства, способствует персистенции бактерий в производственных условиях и, как следствие, делает возможным их попадание в продукты питания на любой стадии производства [70].

Его недооценивают как патоген, передающийся через пищу, в различных группах продуктов. Между тем, у людей со сниженным иммунитетом, 1 грамма салата, содержащего 10^3 КОЕ/г *P. aeruginosa*, может быть достаточно для устойчивой колонизации кишечника, с тяжелыми последствиями для организма [39]. Риск попадания в пищевые цепочки человека с пищей, не подлежащей предварительной термической обработке, к какой относятся молочные продукты, несет опасность инфицирования данным патогеном, являющимся причиной тяжелых заболеваний у человека, зачастую трудно поддающимся диагностике и лечению.

Молоко является превосходной средой для роста различных микроорганизмов. Питательные вещества молока делают его восприимчивым к загрязнению представителями псевдомонад [39]. Согласно существующим документам, *P. aeruginosa* не нормируется в молоке и молочных продуктах, однако, ее роль как контаминаента молочных продуктов нарастает, что связано, в том числе, с широким применением в молочных хозяйствах систем механического доения и охлаждения молока. Порча продуктов, вызванная *P. aeruginosa*, должна вызывать серьёзную обеспокоенность у потребителей и отделов по надзору за качеством пищевых продуктов.

Психротрофная бактерия *P. aeruginosa* способна непрерывно увеличивать свою популяцию в молоке при температуре охлаждения 4–6°C.

Короткое время генерации – менее 4 часов – позволяет ей увеличить количество клеток до более чем 10^6 КОЕ/ см³ в молоке за 8 дней хранения [71]. В целом, количество психротрофных микроорганизмов в сыром молоке, поступающем на предприятия для переработки, отражает эффективность санитарно-гигиенических мероприятий на ферме. Количество 10^4 КОЕ/см³ говорит об удовлетворительном санитарном состоянии фермы; 10^4 - 10^5 КОЕ/см³ – индикатор необходимости улучшения условий получения молока и обработки цехового оборудования; более 10^5 КОЕ/см³ – показатель неудовлетворительных условий получения или неэффективного охлаждения молока [72].

Стабильное снижение количества психротрофных организмов до 10^3 КОЕ/см³ возможно только при тщательной мойке и дезинфекции оборудования. Согласно рекомендациям Международной молочной федерации, молоко необходимо охладить до 4-10°C в течение 1,5-3 часов. Однако, по ряду причин, доставка молока на завод может осуществляться раз в сутки, что, с учетом способности *P. aeruginosa* размножаться в широком температурном диапазоне, повышает вероятность увеличения количества клеток бактерии. После доения, проводимого в гигиенических условиях, общее количество психротрофных бактерий составляет примерно 10% от общего количества мезофильных аэробов, но может достигать 90% после холодильного хранения, причем доминирующей грамотрицательной микробиотой, обнаруженной в сыром молоке, хранящемся при низких температурах, являются представители псевдомонад. Псевдомонады составляют около 70% психротрофных микроорганизмов, вызывающих порчу молочных продуктов при хранении в холодильниках [16]. Синтез ими в процессе хранения липолитических и протеолитических ферментов, не инактивирующихся при пастеризации, а также сохранение их активности при ультрапастеризации, ведет к значимым экономическим потерям [73]. При проникновении на предприятие *P. aeruginosa* добиться эффективной санитарии весьма затруднительно. Причем, на одном предприятии могут одновременно

циркулировать формы с различной чувствительностью к антимикробным воздействиям, вплоть до возможной резистентности [74].

Источником инфекции на животноводческих и молочных фермах могут являться зараженные животные – *P. aeruginosa* у домашних животных является причиной различных инфекций у молочных коров, овец и коз [75, 76]. Доступ стада к неконтролируемым местам водопользования, таким как пруды со стоячей водой, может привести к инфицированию животных, в том числе маститом, вызванным синегнойной палочкой [66]. Инфицированная вода, навоз, многоразовые полотенца для вымени, загрязненные подстилки, корма и оборудование могут быть причиной контаминации производства данным микроорганизмом [75]. Риск инфицирования растительных кормов повышается при использовании навоза и неочищенных сточных вод. Особое значение имеет контроль качества используемой на предприятии воды. Вода, используемая на производствах, анализируется на отсутствие патогенов и колиформных бактерий, однако есть вероятность наличия в ней представителей псевдомонад [77]. Показана идентичность штаммов псевдомонад, выделенных из упакованного пастеризованного молока и штаммов, обнаруженных на молочном заводе – в конденсированной воде на разливочных форсунках, сточных водах разливочной машины, в окружающем воздухе [78]. Особое значение имеет отсутствие контакта источника водоснабжения на производстве со сточными водами, состояние водопроводных труб, эффективность системы очистки воды на предприятиях.

1.3.5 Биопленки *P. aeruginosa*

В молочной промышленности основным источником пищевых рисков являются биопленки – один из самых совершенных механизмов адаптации микроорганизмов к стрессовым воздействиям [79]. Проникновение синегнойной палочки на животноводческие и пищевые производства приводит к активной колонизации и быстрому образованию биопленок на технологическом оборудовании, что многократно усложняет задачу элиминации данного патогена. Шероховатые поверхности и труднодоступные участки в виде швов и стыков создают хорошие условия для локализации микробных биопленок [62].

Существуют данные, доказывающие, что способность патогенов образовывать биопленки и их антибиотикорезистентность взаимосвязаны [80]. Однако, при проведении санитарно-гигиенических мероприятий на пищевых производствах часто не учитывается факт возможного нахождения бактерий в состоянии биопленок, что ведет к недостаточной эффективности санитарных мероприятий [47].

Основными способами борьбы с биопленками остаются мойка и дезинфекция. Применение систем эффективной производственной практики (GMP), анализа критических контрольных точек риска (НАССР) и протокола, известного как Clean-In-Place (CIP), в целом позволяет предотвратить образование биопленок на оборудовании и микробную контаминацию молочных продуктов. В то же время следует отметить, что лабораторные исследования влияния моющих и дезинфицирующих средств проводятся в основном на планктонных микроорганизмах, а их устойчивость в биопленках в 100–1000 раз выше [81]. Нечувствительность к действию антимикробных агентов связана с наличием в составе биопленки так называемых клеток-персистеров – покоящихся клеток, у которых отмечается торможение метаболической активности, в то время как биоцидные препараты ориентированы на клетки с нормальным активным метаболизмом [82].

Наличие жгутиков и пилей, обеспечивающих подвижность микроорганизмов, способствует образованию биопленки [83, 84]. *P. aeruginosa* является важнейшим видом, образующим биоплёнки, а также бактерией-моделью для их изучения [39].

P. aeruginosa способна образовывать зрелую биопленку уже через 4 часа после первичного закрепления [85, 86]. Цикл биопленкообразования включает в себя первичную адгезию, фиксацию микроорганизма на поверхности, созревание биопленки, ее рост и дисперсию – выброс планктонных клеток, которые могут дать начало образованию новых биопленок [87]. В процессе формирования биопленки у бактерии повышается выработка альгината – экзополисахарида, защищающего бактерию от поверхностно-активных веществ и бактериофагов

[88]. Для микроорганизмов биопленки характерно поведение, управляемое системой чувства кворума (QS), основанное на продукции сигнальных молекул и способности микробов воспринимать эти сигналы [82]. QS связан также с выработкой факторов вирулентности, устойчивости к стрессу, регулировкой метаболизма [89, 90]. *P. aeruginosa* обладает 3 системами QS, и все они способствуют образованию биопленок [91].

В зависимости от особенностей штамма и внешних условий, *P. aeruginosa* может формировать плоские биопленки и дифференцированные – грибообразной формы, состоящие из клеток, соединенных разделенным каналами полисахаридным матриксом. Его основой у *P. aeruginosa* являются три экзополисахарида – Psl, Pel и гелеобразующий полимер альгинат, чрезвычайно важный для прикрепления к поверхности, формирования и стабилизации структуры биопленки [92].

Пентасахарид Psl необходим для адгезии клеток на поверхностях и обеспечения межклеточных взаимодействий во время образования биопленки, стимулируя образование более прочных биопленок [93, 94]. Pel отвечает за образование плоской биопленки, образующейся на границе раздела фаз воздух-жидкость. Синтез Psl и Pel зависит от штамма и может переключаться в зависимости от окружающих условий [95].

P. aeruginosa способна образовывать биопленку, в том числе многовидовую, на стенках резервуаров для охлаждения молока и трубопроводов, непосредственно в молоке при хранении в холодильнике [96, 97].

У псевдомонад подтверждена способность к значительному росту в молоке в течение 21 дня при температуре охлаждения (около 6°C) [98]. Кроме того, благодаря способности многих штаммов продуцировать антибактериальные вещества и сидерофоры, *P. aeruginosa* «вытесняет» другие микроорганизмы [99].

Стойкие бактериальные сообщества *P. aeruginosa* могут существовать и вне биопленки, когда вследствие ошибок при проектировании помещений и оборудования возникают ниши, недоступные для обработки дезинфицирующими веществами. Особую опасность представляет оборудование с большим

количеством узлов, а также с недоступными для дезинфекции участками при безразборной мойке.

1.4 Формирование устойчивости *P. aeruginosa* к технологическим воздействиям.

Особое проблему представляет способность бактерии вырабатывать устойчивость к влиянию pH, осмотического давления и температуры. Исследование штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из молочных продуктов в Багдаде, показало, что более 25% штаммов были устойчивы к термической обработке при 72° С в течение 16 сек; около 12% сохраняли жизнеспособность при pH 2,3; и более 20% – в 5% и 7% солевом растворе. Бактериостатическая переносимость высокого pH была более свойственна изолятам, выделенным из сыров. Скорее всего, данное свойство являлось штаммоспецифическим и было связано с генетическими особенностями изолятов [16].

Отмечается, что устойчивость к осмотическому и кислотному стрессам у микроорганизмов способствует формированию толерантности к другим производственным воздействиям, в частности, осмотический стресс коррелирует с вероятностью появления термотолерантных форм [100]. В современном мире бактерии сталкиваются с новыми формами теплового стресса – термической обработкой (пастеризацией и стерилизацией) на пищевых производствах и в медицинских учреждениях. Эти воздействия должны уничтожать микроорганизмы, не позволяя им выработать механизмы адаптации. На сегодняшний день главным методом для устраниния патогенных и вызывающих порчу бактерий является тепловая обработка молока, которая применяется при производстве практически всех молочных продуктов. Наиболее популярным у потребителя является пастеризованное молоко [101]. Пастеризация молока применяется путем нагревания сырого молока до температуры ниже 100°С в течение периода времени, достаточного для уничтожения любых патогенных бактерий, которые могут в нем присутствовать. Разные режимы пастеризации рекомендованы для разных продуктов; для сыроделия широко применяется

режим пастеризации молока (72 ± 2) $^{\circ}\text{C}$; (76 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ – для питьевого молока; и (85 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ – при производстве кисломолочных продуктов.

Ранее предполагалось, что для предотвращения распространения *P. aeruginosa*, вызывающей инфекции, через молочные продукты, достаточно низкотемпературной пастеризации, т. к. не образующие споры патогенные бактерии должны погибать при нагревании выше $60\ ^{\circ}\text{C}$ из-за денатурации их жизненно важных белков [102, 103]. Однако, появляются данные о возникновении бактерий со сверхстойчивостью к принятым режимам тепловой обработки [104, 105]. Показана недостаточность обработки молока при $71,7\ ^{\circ}\text{C}$ в течение 15 секунд, для полной элиминации *Listeria monocytogenes*. Более того, отдельные клетки сохраняли жизнеспособность при температуре $72\ ^{\circ}\text{C}$ в течение четырёх минут [106]. Частота выделения *P. aeruginosa* в молоке после пастеризации может быть относительно высокой [107]. В Чехии, при исследовании образцов пастеризованного молока в течение года, обнаружение *P. aeruginosa* составило 4% (два штамма в 50 образцах).

По данным Свириденко и др., при концентрации в молоке клеток тест-культуры *Escherichia coli* менее 10^5 КОЕ/см 3 как низкотемпературная – (72 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, так и высокотемпературная – (80 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ пастеризация была эффективна, однако при более высоких концентрациях жизнеспособных клеток в исходном молоке – 10^5 КОЕ/см 3 при низкотемпературном и 10^6 КОЕ/см 3 при высокотемпературном режимах, соответственно, в пастеризованном молоке выявлены жизнеспособные клетки. При последующей выдержке пастеризованного молока наблюдалось некоторое увеличение количества клеток, что указывает на относительную термостабильность и способность к реактивации клеток *Escherichia coli*, получивших термический шок [108]. При высокотемпературном режиме пастеризации наблюдалась полная гибель клеток тест-культуры *Staphylococcus aureus* при концентрации в исходном молоке менее 10^6 КОЕ/см 3 , при этом низкотемпературный режим не привел к полному уничтожению жизнеспособных клеток. Также авторами отмечена способность к реактивации клеток, получивших термошок – количество клеток после пастеризации с последующей выдержкой 24

часа при температуре охлаждения увеличивалось примерно в 2 раза [108]. Тест-культура *P. aeruginosa*, обладающая психротрофными свойствами, также показала способность единичных выживших клеток размножаться после термической обработки при высокой контаминирующей дозе – более 10^6 КОЕ/см³ и сохранять при этом способность к реактивации.

Надежность пастеризации зависит как от исходной микробиологической загрязненности молока, так и от видового и штаммового состава контаминирующей микрофлоры. Способность штаммов *P. aeruginosa* адаптироваться к тепловому шоку мало изучена [103]. Есть данные, что кратковременное воздействие умеренно повышенных температур перед основной термической обработкой усиливает термоустойчивость *P. aeruginosa* [16, 109].

Термостойкость микроорганизмов варьирует в широких пределах и зависит от факторов, которые оказывают свое влияние до, во время или после тепловой обработки [109]. Механизмы, обеспечивающие адаптацию микроорганизмов к высокой температуре, до конца не изучены. Приводимые в научной литературе данные указывают, что клеточная реакция на тепловой удар заключается в синтезе различных белков, известных как белки теплового шока [110]. Тепловой шок вызывает нарушения в сворачивании существующих и вновь синтезируемых белков.

Межмолекулярные взаимодействия неправильно свернутых белков приводят к образованию их агрегатов, причем их количество возрастает пропорционально степени теплового воздействия [111]. Таким образом, потеря необходимых для жизнедеятельности белков снижает жизнеспособность клетки, вплоть до ее гибели. Для противостояния этим процессам, бактерии снабжены клеточными дезагрегазами, способными солюбилизировать и восстанавливать агрегированные белки и повышать тем самым термотолерантность микроорганизмов. Развитие адаптивного ответа большей величины при более высоких температурах связывают с накоплением большего количества и/или индукцией другого подмножества белков теплового шока. У бактерий наиболее

известны две дезагрегазы, защищающие клетки от разрушительного действия высоких температур – ClpB и ClpG. Дезагрегаза ClpG присутствует только у ряда грамотрицательных бактерий, включая *P. aeruginosa* и обеспечивает более высокий уровень термозащиты [112]. Показано, что гены, кодирующие ClpG, могут передаваться путем горизонтального переноса, вследствие чего резистентность к экстремальным температурам в бактериальном сообществе может распространяться, представляя угрозу установленным процедурам термических обработок [113].

У *P. aeruginosa* уровень ClpG повышается во время стационарной фазы роста, а активность ClpB преобладает на логарифмической фазе. Доказательств, что эти две системы работают синергично, нет: они могут замещать друг друга функционально только в определенном диапазоне температур – у *P. aeruginosa* ClpG остается стабильной при 70⁰C, в то время как дезагрегаза ClpB повреждается при температурах 60-65⁰C [114]. Увеличение количества дезагрегаз отражает способность бактерий адаптироваться к экстремально высоким температурам, испытываемым во время процедур стерилизации и пастеризации в пищевой промышленности и медицине. Сообщается об обнаружении у *P. aeruginosa* двух мощных гомологов дезагрегазы ClpG. Приобретение дополнительной дезагрегазы – ClpG_{GI} – способствовало широкому распространению в мире популяции клона *P. aeruginosa* C, у которого она была выявлена [115]. ClpG характерен для вида *P. aeruginosa* в пределах рода *Pseudomonas*, в то время как ClpG_{GI} присутствует в изолятах неродственных представителей грамотрицательных бактерий. Это позволяет предположить его недавнее приобретение *P. aeruginosa*, что может усилить термостойкость [110].

В целом, любая реакция на стрессорные факторы у бактерий приводит к схожим результатам адаптации – переходу клеток в состояние покоя [116]. Бактерии замедляют свой метаболизм, что выражается в остановке роста и деления клеток, а также в снижении экспрессии генов, отвечающих, в том числе, за биосинтез факторов вирулентности, в пользу выживания. Эти механизмы устойчивости к стрессу основаны не на генетических мутациях, а реализуются за

счет эпигенетических механизмов – изменений, не затрагивающих структуру ДНК, а изменяющих активность определенных генов, благодаря неоднородности популяции [116].

Технологические воздействия могут являться причиной перехода бактерий в некультивируемое состояние, при котором метаболическая активность и вирулентность сохраняются, но утрачивается способность к клеточному делению и возможность расти на питательных средах [66]. Длительность пребывания в некультивируемом состоянии у микроорганизмов, в частности, у *P. aeruginosa*, может достигать нескольких месяцев [117]. Выявление таких микроорганизмов требует специальных методов анализа, не всегда доступных для производственных лабораторий.

1.5 Идентификация и методы контроля *Pseudomonas aeruginosa*

1.3.1 Идентификация

Бактериологический метод остается наиболее доступным и распространенным в микробиологических лабораториях и включает посев исследуемого материала на специальные питательные среды или в среды накопления с дальнейшим высевом на селективные плотные среды. Наличие зеленого пигмента (пиоцианина) и цветочного запаха, характерных только для *P. aeruginosa*, с одновременным обнаружением в мазках при микроскопировании грамотрицательных палочек, позволяет на 2-е сутки идентифицировать около 75% культур [118]. Трудности распознавания *P. aeruginosa* возникают при наличии изолятов, утративших способность к пигментообразованию, продукции экзополисахарида и рамнолипида, а также при формировании некультивируемых форм. Исследователи отмечают определенные трудности с биохимической идентификацией *P. aeruginosa*. Наборы биохимических тестов API показывают высокий уровень неверной идентификации оксидазо-положительных грамотрицательных палочек, включая *P. aeruginosa*. Кроме того, для проведения теста требуется использование чистой бактериальной субкультуры и минимальное время инкубации 48 ч.

Следовательно, идентификация с использованием этого метода требует не менее 3 дней [119], кроме того, затруднено использование классических микробиологических методов применительно к *P. aeruginosa* в составе биопленок. В лабораторную практику все шире внедряется метод ПЦР-диагностики (полимеразной цепной реакции), который позволяет проводить прямое обнаружение ДНК или РНК микроорганизма. Чувствительность и специфичность метода составляют 90–100%, что позволяет за короткое время исследования (от 2 до 5 ч) гарантированно обнаруживать единичные бактериальные клетки. Это дает большое преимущество по сравнению с бактериологическими методами.

Для выявления *P. aeruginosa* предложены специфические праймеры для детекции гена *algd*, кодирующего gdp-дегидрогеназу, участвующую в продукции альгината у данного вида бактерий, кодирующего экзотоксин А гена *toxa*, а также генов *gyrb* и *ecfX* [120]. Возможна одновременная амплификация (multiplex-PCR) генов *oprI* и *oprL*, отвечающих за синтез двух липопротеинов наружной мембранны, которые маркируют флюоресцентную группу псевдомонад и *P. aeruginosa* соответственно. Разработаны подходы с использованием ПЦР в режиме реального времени для количественной оценки содержания геномной ДНК *P. aeruginosa* в составе биопленок. Праймеры и Тацман зонд, специфичные в отношении *GltA* *P. aeruginosa*, дают возможность обнаружить ДНК данного микроорганизма как в суспензионной культуре, так и в составе биопленок [121].

Однако надо учитывать, что высокая чувствительность методов ПЦР может быть и их слабым местом в связи с возможной контаминацией образца и получения ложноотрицательного результата из-за ингибирования различными веществами работы полимеразы [118]. Также отсутствуют нормативные документы, определяющие обязательные мишени и соответствующие праймеры для идентификации *P. aeruginosa*. Несмотря на это, в сложных случаях, в том числе при фенотипической разнородности штаммов синегнойной палочки, преимущества молекулярно-генетических методов очевидны. Таким образом,

молекулярные методы могут быть как единственным, так и дополнительным быстрым и надежным тестом для идентификации *P. aeruginosa* [121].

1.5.2 Методы контроля

Поиск эффективных средств противодействия *P. aeruginosa* остается на сегодняшний день весьма непростой задачей, в связи со способностью микроорганизма использовать разнообразный арсенал устойчивости к антимикробным воздействиям и требует различных стратегий контроля данного патогена. Основой обеспечения санитарно-гигиенической безопасности пищевой, в том числе молочной продукции, на сегодняшний день является соблюдение процедур санитарной обработки цехов и оборудования с использованием химических дезинфицирующих средств [79]. На протяжении многих лет хлорактивные дезинфицирующие средства остаются востребованными в процессах санитарной обработки на предприятиях молочной отрасли.

Большой научно-практический интерес представляют растворы нейтральных анионов, получаемые в результате электролиза водных растворов хлорида натрия [122]. В соответствии с инструкциями по применению этих препаратов на предприятиях молочной промышленности контроль концентраций должен осуществляться по основному действующему веществу – активному хлору. Эффективные бактерицидные концентрации при проведении профилактической дезинфекции поверхностей оборудования после мойки установлены в пределах 150-300 мг/дм³ (0,015-0,030 %) активного хлора (АХ) с экспозицией не менее 10 минут при температуре 20-30 °C [123].

С целью улучшения потребительских, в том числе бактерицидных свойств, в растворы анионов вводят функциональные добавки-смачиватели поверхностно-активные вещества (ПАВ), но их использование в подобных растворах ограничено вследствие потенциального взаимного разложения компонентов. Хорошую совместимость с такими окислителями как пероксид водорода и гипохлориты проявляют амфотерные и псевдокатионные неионогенные аминоксиды [124]. В качестве высокоэффективных хлорактивных дезинфектантов на молочных предприятиях достаточно широко используют

средства на основе дихлоризоцианурата натрия (ДХЦН) или натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты, обладающие широким спектром антимикробного действия, оцениваемые порой на производствах как «образцовые» биоциды [125]. Концентрации растворов ДХЦН также контролируются по активному хлору (АХ) и рекомендованы к применению органами Роспотребнадзора на предприятиях молочной промышленности в следующих режимах: содержание АХ не менее 150 мг/дм³ (0,015 %); экспозиция не менее 10 минут; температура 20-40 °С.

В настоящее время активно разрабатываются различные подходы для контроля нежелательных микроорганизмов, в том числе входящих в состав биопленок [86, 126]. Они включают в себя физические методы – так, фототермическая терапия (РТТ) стала привлекательным терапевтическим методом борьбы с устойчивыми к антибиотикам бактериальными инфекциями [127]. Обработка плазмой эффективно инактивировала биопленки *P. aeruginosa* [128]. Высокоинтенсивные световые импульсы, рентген, комбинация ультразвука и пара предложены для недопущения роста псевдомонад и сохранения качества сыров типа моцарелла [129, 130, 131].

Для повышения эффективности антибиопленочных дезинфицирующих средств применяют детергенты на основе ферментов, способных разрушать компоненты внеклеточного матрикса биопленок, включая *P. aeruginosa* [132]. Однако, активность ферментов протеиназ снижается в присутствии молока, поэтому эффективности фермента было недостаточно для применения в молочной отрасли. Важно понимать, что биоцидные средства и процедуры для пищевых предприятий должны соответствовать требованиям безопасности, установленным соответствующими регулирующими органами, и не влиять на вкусовые и питательные свойства продуктов, что особенно актуально для молочной промышленности. Наиболее подходящими были бы ингибиторы кворума, полученные из пищевых микроорганизмов, растений и других природных источников. С учетом прогрессирующего роста устойчивости микроорганизмов к традиционным антимикробным веществам, идет поиск

альтернативных биоцидных агентов, в том числе для применения в пищевой промышленности.

Особые перспективы существуют для бактериофагов, как для естественных врагов бактерий, способных диффундировать через зрелую биопленку [133]. Экологическая безопасность, высокая избирательность, быстрота действия, возможность совместного применения с биоцидными препаратами делает их привлекательными кандидатами на роль альтернативных средств санитарии [134].

Есть данные, подтверждающие эффективность санации помещений, при циркулировании в них микроорганизмов с множественной лекарственной устойчивостью, при помощи бактериофагов [135]. В США и Европе одобрены к применению в пищевой промышленности ряд препаратов на основе бактериофагов для элиминации представителей *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria* [134]. Показана эффективность применения бактериофагов, как средства борьбы с такими патогенами пищевого происхождения, как *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* [135,136,137]. Однако, ряд исследователей предостерегает от излишнего оптимизма, указывая на возможные риски широкого применения фагов, в частности, на проблему возможного роста фагоустойчивых форм бактерий, аналогично резистентности к химическим препаратам и антибиотикам [137,138]. Имеются сообщения о быстром увеличении субпопуляции резистентных к фагам микроорганизмов, после первичного уменьшения количества клеток в биопленке в результате обработки препаратами на основе фагов. Причем некоторые изоляты были устойчивы к коктейлю из 5 различных фагов [139].

Бактерии и их вирусы эволюционируют совместно, представляя собой биосистему, в которой постоянно идут процессы адаптации [140]. Применение бактериофагов в учреждениях здравоохранения показало, что их использование в низкой концентрации может, наоборот, стимулировать биопленкообразование [141]. Возможно, бактериофаги также могут являться векторами переноса генов резистентности между патогенами [142]. Исследования эффективности лизических свойств коммерческих бактериофагов показали, что среди

представителей *P. aeruginosa* доля фагорезистентных изолятов составляла от 16% до 85% [143]. В работе по изучению чувствительности клинических изолятов *P. aeruginosa* с различной степенью антибиотикорезистентности к коммерчески доступным препаратам бактериофагов, также указывается на недостаточную активность фаговых препаратов применительно к *P. aeruginosa* [144].

В условиях пищевых производств эффективность фаговых препаратов может варьировать в зависимости от таких производственных факторов, как температура и влажность. Обеспечение их стабильности и процедуры использования пока не имеют готовых решений [138]. Кроме того, известны риски, которые несет использование бактериофагов при производстве заквасок и молочных продуктов.

По мнению ряда исследователей, перспективным объектом для ингибирования *P. aeruginosa* могут являться представители пробиотических молочнокислых микроорганизмов и вырабатываемые ими метаболитные комплексы [145, 146]. Особенностью лактобацилл является способность к образованию ряда antimикробных комплексов: органических кислот – молочной, уксусной, пропионовой, масляной; бактериоцинов, перекиси водорода, antimикробных бактериоциноподобных ингибирующих субстанций [147, 148, 149]. Их можно рассматривать как метод естественной защиты от патогенов, для разработки инновационных технологий с применением метаболитных комплексов, для различных областей промышленности [146, 150, 151, 152]. Отмечено, что *Lactobacillus plantarum* и его метаболиты, оказывали сильное ингибирующее действие на продукцию молекул, определяющих кворум у *P. aeruginosa* [153]. Исследование 57 штаммов лактобацилл позволило выделить 2 штамма *Lactobacillus fermentum*, с мощным ингибирующим действием на рост *P. aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью [154]. Действие *Lactobacillus* может включать в себя, кроме выработки antimикробных метаболитов, способность конкурировать с патогеном, не допуская первичной адгезии нежелательного микроорганизма на поверхности [155].

Есть исследования, подтверждающие эффективность применения бактериоцинов лактобацилл для борьбы с организованными в биопленки *P. aeruginosa* [156]. Антимикробные пептиды, выделяемые молочнокислыми бактериями, и сами штаммы могут оказывать биоцидное действие на патогены, в том числе в составе биопленок [146,149,157].

Антимикробные пептиды можно рассматривать как альтернативу антибиотикам и веществам, усиливающим действие других противомикробных препаратов [158]. Их эффективность как антибактериальных агентов проявлялась и по отношению к *P. aeruginosa* [159, 160].

Неспецифичность действия антимикробных пептидов также повышает их перспективность в борьбе с биопленками, особенно с учетом способности *P. aeruginosa* сосуществовать в составе биопленки с другими микроорганизмами, потенциально несущими разные гены антибиотикорезистентности и способствующими развитию механизмов горизонтального переноса генов [79, 161, 162].

Ведутся работы по изучению антимикробных свойств ароматических растений и эфирных масел [163, 164]. Исследования, направленные на поиск механизмов ингибирования QS, могут предложить эффективные методы подавления патогена. Идеальными источниками действующих веществ для нарушения QS представляются одобренные для пищевой промышленности микроорганизмы, растения и другие природные источники. В различных эфирных маслах обнаружены такие эффективные ингибиторы QS, как циннамальдегид, карвакрол, гексанал, тимол [165]. Однако, их использование в качестве пищевых консервантов ограничено из-за резкого запаха и низкой растворимости [166]. Кроме того, не было получено данных об отсутствии возникновения резистентности к данным веществам и об их возможном влиянии на экспрессию генов антибиотикорезистентности [73].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ПО ОБЗОРУ

На основании критического анализа научно-технической литературы, освещющей вопросы особенностей метаболизма *P. aeruginosa*, в том числе в условиях стресса различной природы, механизмов устойчивости к нему и возможных путей её преодоления, показана актуальность и необходимость проведения исследований по поиску и разработке средств для противодействия бактерии *P. aeruginosa*.

Обладание одной из самых сложных регуляторных систем у бактерий делает *P. aeruginosa*, относящуюся к условно-патогенным микроорганизмам, универсальным микробным патогеном, с практически неограниченными метаболическими возможностями, представляющим реальную угрозу здоровью человека, в том числе при попадании в пищевые цепочки. В доступной литературе нет достаточных данных о вариабельности свойств штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующих на молочных производствах, их способности противостоять санитарным процедурам с использованием химических биоцидных препаратов и технологическим воздействиям при пастеризации молока. Недостаточно информации о антагонистическом действии на *P. aeruginosa* молочнокислых бактерий. Поиск эффективных средств противодействия *P. aeruginosa* остается на сегодняшний день весьма непростой задачей и требует различных стратегий контроля данного патогена.

ГЛАВА 2 МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ, СХЕМА ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ, ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Организация экспериментальных работ

Работа выполнена во Всероссийском научно-исследовательском институте молочной промышленности ФГАНУ «ВНИМИ» в рамках выполнения работ по Государственному заданию № FNSS-2024-0002 и № FNSS-2025-0004.

Методология организации работы предусматривала: анализ литературных источников по теме исследований, формулирование цели исследований, постановку задач исследований для реализации поставленной цели, подготовку методической базы исследований, проведение исследований, включающих экспериментальную часть, анализ и обработку полученных результатов, разработку технической документации.

На первом этапе проведен анализ литературных источников, освещающих вопросы особенностей распространения, метаболизма, резистентности к стрессорным воздействиям, идентификации и методам контроля *P. aeruginosa*.

Экспериментальная часть работы включала в себя несколько этапов:

выделение, идентификация и характеристика выделенных штаммов синегнойной палочки;

оценка ферментативной активности штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из объектов производственной среды в сравнении с типовым коллекционным штаммом;

определение чувствительности выделенных штаммов к действию биологических антимикробных агентов;

исследование механизмов антимикробного действия штамма *L. helveticus* NK1 при совместном культивировании с *P. aeruginosa*;

изучение эффективности элиминации *P. aeruginosa* в зависимости от температурно-временных параметров среды при исследовании режимов

пастеризации и хранения молока;

оценка чувствительности выделенных штаммов к действию биоцидных препаратов.

Заключительный этап предусматривал статистическую обработку и анализ полученных результатов; разработку СТО ВНИМИ (Методические рекомендации) по оптимизации контроля *P. aeruginosa* при производстве молочной продукции.

Организация проведения экспериментальных работ приведена на схеме (рисунок1).

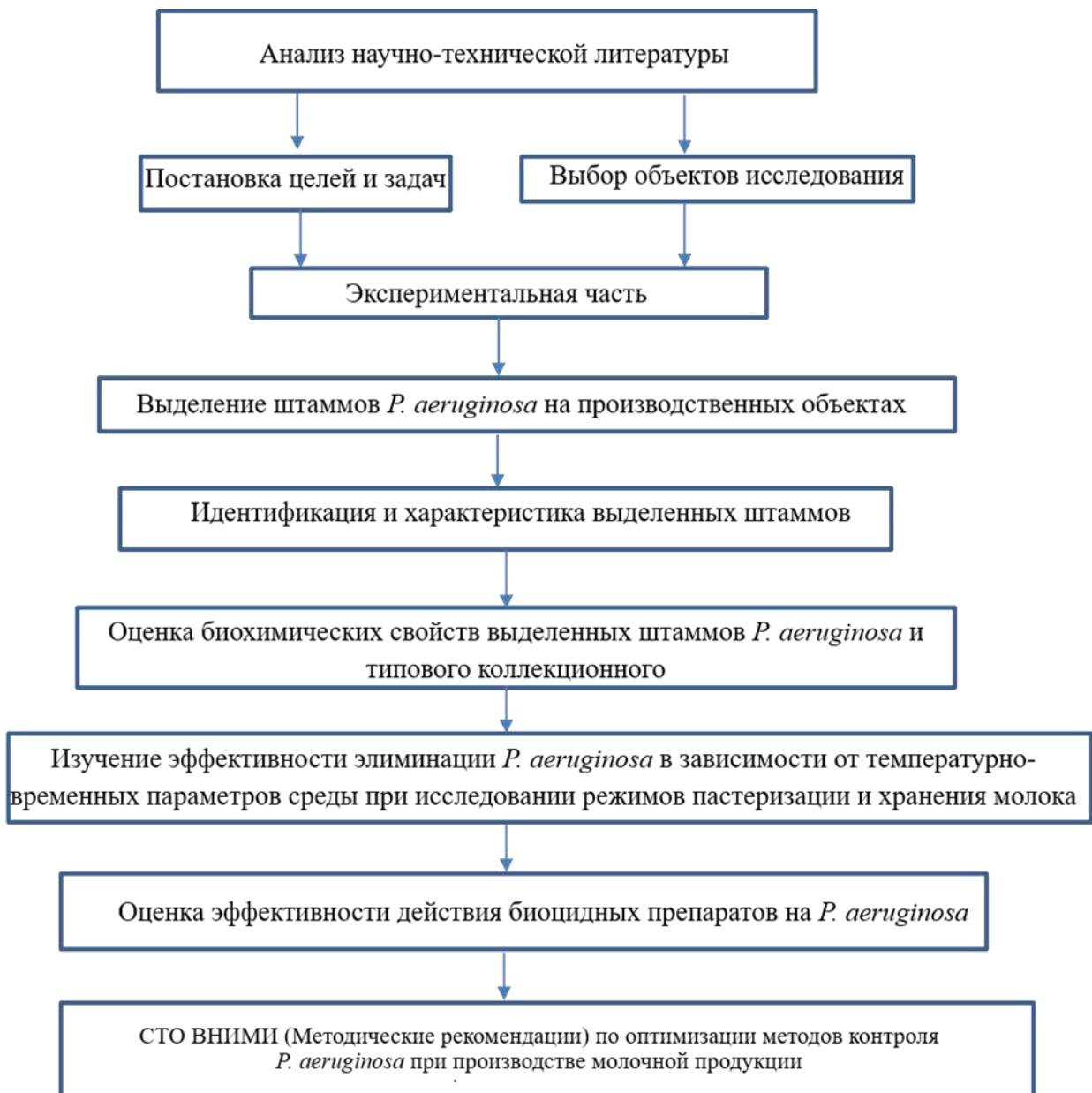


Рисунок 1 — Схема проведения экспериментальных работ

2.2 Объекты исследований

В соответствии с целями и задачами объектами исследования являлись:

1. Молоко, контаминированное штаммами *P. aeruginosa* и подвергнутое обработке при различных температурно-временных параметрах при исследовании режимов пастеризации молока.
2. Исследуемые образцы молока в хранении.
3. Штаммы *P. aeruginosa* дикого типа, выделенные в процессе мониторинга

санитарно-гигиенического состояния на молочных производствах и контрольный штамм *P. aeruginosa* 25668, полученный в Государственной коллекции микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск». Исследуемые штаммы *P. aeruginosa* дикого типа были выделены с цехового оборудования (доильных аппаратов); штамм *P. aeruginosa* M1 был выделен из образца масла сливочного; штамм *P. aeruginosa* B2 получен из образца воды, используемой для мойки цехового оборудования. Штаммы *P. aeruginosa* хранили на полужидком питательном агаре при температуре (4±2)°C.

4. Штаммы молочнокислых бактерий (МКБ) и кефирные грибки из коллекции микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ФГАНУ «ВНИМИ»). Коллекционные штаммы МКБ хранили в лиофилизированном состоянии при температуре минус 50°C.

Для проведения исследования использовались 17 штаммов МКБ и грибковая кефирная закваска приготовленная в соответствии с инструкцией по приготовлению и применению заквасок для приготовления кисломолочных продуктов на предприятиях молочной промышленности. Перечень представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Используемые в работе штаммы МКБ

№ п/п	Вид	Наименование штамма	Источник выделения
1	<i>Lactobacillus helveticus</i>	АК	<i>feces</i> здорового человека
2		14вв	ферментированный зерновой продукт
3		2вв	ферментированный зерновой продукт
4		5вв	ферментированный зерновой продукт
5		Ббн4	самоквасный

№ п/п	Вид	Наименование штамма	Источник выделения
			кисломолочный продукт
6		NK1	<i>feces</i> здорового человека
7	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	MA1	ферментированный зерновой продукт
8		AM1	ферментированный зерновой продукт
9		dLA	сметана
10	<i>Streptococcus thermophilus</i>	16t	самоквасный кисломолочный продукт
11		163	самоквасный кисломолочный продукт
12		159	листья апельсина
13	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	АВК	кефирный грибок
14		МА2	ферментированный зерновой продукт
15		МА3	ферментированный зерновой продукт
16		KF1	кефирный грибок
17	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	F	<i>feces</i> здорового человека
18	Грибковая кефирная закваска	-	Естественный симбиоз МКБ, дрожжей и уксуснокислых бактерий (кефирный грибок)

2.3 Методы исследований

2.3.1 Выделение, идентификация и культивирование выделенных штаммов *P. aeruginosa*

Выделение и идентификацию выделенных культур проводили согласно ГОСТ ISO 16266-2018 «Качество воды. Обнаружение и подсчет *Pseudomonas aeruginosa*. Метод мембранный фильтрации», ГОСТ Р 54755-2011 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий вида *Pseudomonas aeruginosa*» и МР «Обнаружение и идентификация *Pseudomonas aeruginosa* в объектах окружающей среды (пищевых продуктах, воде, сточных жидкостях)». Для получения 24-часовых культур и проведения посевов использовали питательный бульон и среду СПА («Агар сухой питательный»), производства НПЦ ООО «Биокомпас-С», а также агар для псевдомонад фирмы Himedia (Индия). Выраженность пигментации у изолятов оценивали визуально, при культивировании культур на среде СПА и цетримидном агаре для псевдомонад при (37 ± 1) °С в течение 24-48 часов. Морфологические характеристики выделенных культур изучали микроскопическим методом с использованием микроскопа Olympus BX 50.

Перед проведением исследований штаммы *P. aeruginosa* пересевали на среду СПА (НПЦ Биокомпас-С, Россия) и культивировали при температуре (37 ± 1) °С. Для приготовления инокулятов *P. aeruginosa* из культур, выросших на СПА, готовили суспензии с мутностью, эквивалентной 0,5 ед. по MacFarland (Biomerieux, Франция). Для исследования антибиотикорезистентности штаммов *P. aeruginosa* использовали диско-диффузионный метод согласно МУК 4.2.1890-04 «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам».

Восстановление культур лактобацилл проводили в стерильном обезжиренном коммерческом молоке марки «Стандарт» (Комплимилк, Слуцкий сыродельный комбинат, г. Слуцк, Беларусь), путем инкубации при температуре

(37±1) °C для *L. helveticus*, *S. thermophilus*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* и при температуре (30±1) °C для *L. lactis* в течение 16-20 часов. Для исследования использовали 16-20 часовые культуры, вторую генерацию.

Грибковую кефирную закваску получали согласно «Инструкции по приготовлению и применению заквасок для кисломолочных продуктов на предприятиях молочной промышленности», утверждена 27.09.2022 г.

2.3.2 Оценка ферментативной активности штаммов *P. aeruginosa*

Для определения ферментативной активности использовали тест-системы API®ZYM («BioMérieux», Франция), позволяющие проводить полуколичественное измерение активности ферментов. Оценку полученных результатов проводили согласно инструкции производителя. При проведении исследования из культур, выращенных на среде СПА, в среде API Suspension Medium готовили суспензии с мутностью 5-6 ед. по McFarland. Полученные суспензии вносили в лунки стрипов API®ZYM в количестве 65 мкл, стрипы инкубировали при температуре (37±1) °C в течение (4–4,5) ч. После инкубации в каждую лунку стрипов вносили по 1 капле реагентов ZYM A и ZYM B. Через 5 минут после внесения реактивов ZYM A и ZYM B проводили визуальную оценку изменения окраски субстрата в лунках по шкале 0-5 по сравнению с контролем в соответствии с инструкцией производителя (по данной шкале положительным результатом считается 3-5).

Подтверждение протеолитической активности – способности пептонизировать казеин – проводили на молочном агаре Эйкмана [56], при трех температурах: (37±1) °C (оптимальной для роста псевдомонад), (20±1) °C (комнатная температура), (6±2) °C (температура холодильника). Степень протеолиза оценивали визуально, по наличию зоны просветления на молочном агаре.

2.3.3 Определение чувствительности штаммов *P. aeruginosa* к лизическому действию синегнойного бактериофага

Для изучения чувствительности штаммов *P. aeruginosa* к лизическому действию синегнойного бактериофага использовали бактериофаг РУФАГ

синегнойной палочки производства АО НПО «Микроген», г. Нижний Новгород с заявленной активностью против *P. aeruginosa*. Бактериофаг был приобретен в аптечной сети и хранился в лаборатории при температуре (4 ± 2) °C. Чувствительность к бактериофагу изучалась двумя методами. Сначала использовали капельный метод (спот-тест) [143]. Из суточной культуры бактерий готовили суспензию, соответствующую $1,5\times10^8$ КОЕ/см³ (оптическая плотность 0,5 ед. по МакФарланду).

Инокулят наносили стерильным ватным тампоном на поверхность подсушенной чашки со средой СПА частыми штрихами. Ряд десятикратных разведений бактериофага наносили на поверхность чашки по 20 мкл исходного препарата, и его третьего, шестого и девятого разведений. После подсушивания чашки с посевами инкубировали 24 часа при (37 ± 1) °C. Оценку степени лизиса бактериальных изолятов препаратами бактериофага выполняли по крестовой системе: (4+) – сливной (полный) лизис; (3+) – полусливной лизис, рост культуры в зоне лизиса; (2+) – наличие в месте нанесения капли фага свыше 50 колоний фага (пятен лизиса); (1+) – наличие в месте нанесения капли фага от 20 до 50 колоний фага; (+/-) – наличие в месте нанесения капли фага менее 20 колоний фага; (-) – полное отсутствие лизиса.

Для подтверждения полученных результатов использовали второй метод – совместное культивирование в жидкой питательной среде препаратов бактериофага и штаммов *P. aeruginosa*. Для этого из взвеси смыва суточных культур штаммов *P. aeruginosa*, содержащих 10^8 микробных клеток в 1 см³, вносили по 1 капле (0,03 см³) в пробирки с питательным бульоном и добавляли 0,03 см³ препарата бактериофага в исходной концентрации и в разведениях от 10^{-1} до 10^{-9} [167]. Пробирка, содержащая бульон и 0,03 см³ взвеси культуры *P. aeruginosa* была контрольной. Пробирка без добавления микроорганизма и фага являлась контролем стерильности среды. Инкубацию проводили при (37 ± 1) °C в течение 24 часов. Литическую активность бактериофага относительно штаммов *P. aeruginosa* оценивали по мутности питательной среды следующим образом:

«высокая активность» – прозрачная среда; «умеренная активность» – опалесцирующая среда; «низкая активность» – мутная среда.

2.3.4 Оценка антимикробной активности штаммов молочнокислых бактерий и кефирной грибковой закваски по отношению к *P. aeruginosa*

Антимикробную активность исследовали методом совместного культивирования в соответствии с МУ 2.3.2.2789-10 «Методические указания по оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов».

Для определения антимикробной активности в 20 см³ стерильного обезжиренного молока вносили по 1 см³ инокулятов исследуемых штаммов МКБ, грибковой кефирной закваски и *P. aeruginosa* и инкубировали в течение 24 и 48 ч при температуре (37±1)°С при сокультивировании с *L. helveticus* и *S. thermophilus*, при температуре (30±1)°С при сокультивировании с *L. lactis*, *L. paracasei* и (20±1)°С – с грибковой кефирной закваской. Контролем являлся образец, инокулированный только 1 см³ *P. aeruginosa*.

После инкубации определяли количество *P. aeruginosa* путем высева на селективную среду для псевдомонад – цетримидный агар (Himedia, Индия). Посевы на цетримидном агаре инкубировали при температуре (37±1)°С в течение 24 ч, затем проводили подсчет выросших колоний.

Оценивали антимикробную активность исследуемых штаммов МКБ по отношению к коллекционному тест-штамму *P. aeruginosa* 25668. Для штаммов МКБ, показавших наибольшую антимикробную активность по отношению к *P. aeruginosa* 25668, дополнительно исследовали антимикробную активность по отношению к выделенным штаммам *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* 47, *P. aeruginosa* M1, *P. aeruginosa* B2.

Для определения способности пробиотических штаммов *L. helveticus* NK1, *L. rhamnosus* F и грибковой кефирной закваски подавлять рост штаммов *P. aeruginosa* также использовали метод совместного культивирования согласно МУ 2.3.2.2789-10.

2.3.5 Изучение возможных механизмов ингибирующего действия *L. helveticus* NK1 по отношению к *P. aeruginosa*

Исследование метаболомных профилей проводили с помощью ГХ-МС газовой хромато-масс-спектрометрии. Образцы для анализа готовили путем культивирования штамма *L. helveticus* NK1 в монокультуре и совместно с *P. aeruginosa* 25668 на среде MRS бульон производства НПЦ ООО «Биокомпас-С» в течение 24 и 48 часов при температуре $(37\pm1)^\circ\text{C}$. Культуральную жидкость для последующего анализа отделяли от клеток путем центрифугирования в течение 15 мин при скорости вращения 6000 оборотов в минуту на лабораторной медицинской центрифуге ОПн-8УХЛ4.2, производства Россия.

Для проведения метаболомного анализа образцы культуральных сред (аликвота 20 мл) лиофильно высушивали, растворяли в пиридине и далее с использованием N,O-бис-(триметилсилил) трифторацетамида (BSTFA N,O-bis—3-methyl-silyl-3-F-acetamide) (Supelco, США) получали ТМС (триметилсилил ТМС)-производные. Силилирование выполняли в течение 15 мин при $100\text{ }^\circ\text{C}$. Использовали колонку MDN-5 30 м \times 250 мкм \times 0.25 мкм (“Supelco”, США), в качестве подвижной фазы – гелий, скорость потока элюента – 1 см³/мин, деление потока 1:5. Объем вводимой пробы 1 мкл, температура термостата 120 °C, температура инжектора 200 °C. Температурный градиент: 120°C выдержка 1 мин; с 120 °C до 280 °C со скоростью 10°C/мин, изотерма 3 мин. Сбор данных и обработку хроматограмм проводили с помощью программного обеспечения LabSolutions GCMSsolution (“Shimadzu”, Япония). Относительные интенсивности (относительное содержание) отдельных соединений были получены нормированием на общую интенсивность идентифицированных пиков. Соединения идентифицировали путем сравнения их экспериментальных спектров со спектрами библиотеки Национального института стандартов и технологий (база данных масс-спектров NIST/EPA/NIH, NIST 11). Относительные интенсивности соединений были получены нормированием на общую интенсивность идентифицированных пиков. Только отнесения пиков с достоверностью идентификации $\geq 90\%$ считались надежными.

При проведении протеомного анализа культуральной среды MRS при монокультивировании *L. helveticus* NK1 и при сокультивировании с *P. aeruginosa* концентраци белка в препаратах была определена ВСА методом (анализ Смита), с использованием набора ВСА assay kit (ThermoFisher, США).

Белково-пептидное содержимое препаратов (100 мкг общего белка) осаждали ледяным ацетоном, осадок растворяли в восстановливающем буфере (50мМ Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 мМ EDTA, 8 М мочевина, 10 мМ дитиотреитол), инкубировали 45 минут при 37 °С и алкилировали йодацетамидом (25 мМ, 45 минут, при комнатной температуре, в темноте). Добавляли 25мМ аммоний-бикарбонатный буфер pH 8,0 до конечной концентрации мочевины 1М. Добавляли трипсин в соотношении белок/фермент – 50:1 и инкубировали в течение 16 часов при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением муравьиной кислоты до конечной концентрации 0,1%.

Полученную смесь пептидов очищали от реагентов на C18-картриджах для ТФЭ (Waters) и лиофилизовали. Анализ пептидной фракции проводили на системе ВЭЖХ Dionex Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, США), сопряженной с масс-спектрометром TIMS TOF Pro (Bruker Daltonics, США), используя метод сбора данных с параллельным накоплением и последовательной фрагментацией (PASEF) в режиме DDA (Data Dependent Data Acquisition). Настройки источника электрораспыления были следующими: напряжение капилляра 4500 В, потенциал смещения концевой пластины 500 В, поток сухого газа 3,0 л/мин при 180 °С. Измерения проводили в диапазоне массы/заряда (m/z) от 100 до 1700. Диапазон подвижности ионов включал значения от 0,60 до 1,60 В с/см² (1/k₀, где k₀ — подвижность ионов). Общее время цикла было установлено на 1,16 сек, а количество сканирований PASEF MS/MS было 10. Для ВЭЖХ объем загрузки образца составлял 1 мкл на инъекцию. Разделение ВЭЖХ проводилось с использованием эмиттерной колонки (C18, 25 см × 75 мкм 1,6 мкм) (Ion Optics, Parkville, Австралия) методом градиентного элюирования. Подвижная фаза А содержала 0,1% муравьиной кислоты в воде; подвижная фаза В содержала 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле.

Разделение ЖХ достигалось при скорости потока 400 нл/мин с использованием 40-минутного градиента от 4 до 90% фазы В. Полученные данные были проанализированы с использованием программного обеспечения PEAKS Studio 8.5 (BSI, Онтарио, Канада), со следующими параметрами: погрешность измерения массы родительского иона – 20 ppm; погрешность измерения массы ионов фрагментов – 0,05 Да. Был проведен неспецифический по обоим концам поиск пептидов длиной от 6 до 45 аминокислот по базам данных UniProtKB *Lactobacillus helveticus* с учетом карбамидометилирования, окисления и фосфорилирования в качестве возможных модификаций. Для каждого пептида допускалось не более трех модификаций. Максимально допустимый уровень FDR были установлен 0,1% на уровне PSM и 1% на уровне белков с требованием идентификации по крайней мере одного уникального пептида.

*2.3.5 Изучение эффективности элиминации *P. aeruginosa* в зависимости от температурно-временных параметров среды при испытании режимов пастеризации и хранения молока*

Из суточной культуры бактерий в физиологическом растворе готовили суспензию, соответствующую примерно $1,5 \times 10^8$ КОЕ/см³ (оптическая плотность 0,5 по МакФарланду). При проведении исследования использовали молоко марки «Стандарт». Опыты проводили на стерильном молоке. Пробирки со стерильным молоком контаминировали суспензией исследуемых штаммов *P. aeruginosa* для получения необходимого конечного количества клеток в опытных пробирках ($N \times 10^3$, $N \times 10^5$ КОЕ/см³). Количество клеток подтверждали путем высева аликовты из десятичных разведений. Обработку контаминированного молока проводили на устройстве контроля термоустойчивости УКТ-150, имитирующем пастеризатор, разработанный во ВНИМИ и обеспечивающий классическую эффективность пастеризации 99,99% по нормируемым показателям [168] (рис.2).

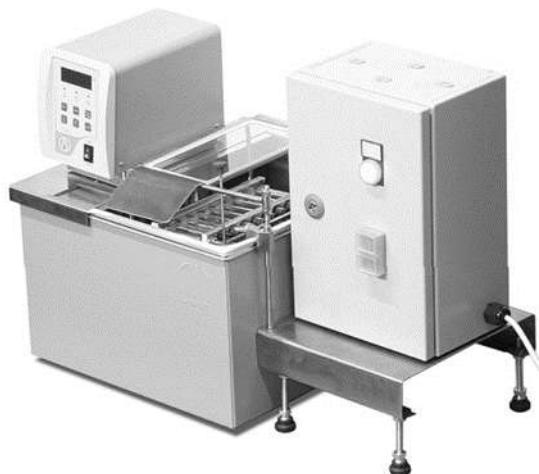


Рисунок 2 – Устройство контроля термоустойчивости УКТ-150

При включении установки, подставку с установленными на ней термостойкими пробирками с контаминированным молоком, с плотно завинчивающимися пробками, погружали в силиконовый раствор. Установка, совершая колебательные движения, обеспечивала равномерный нагрев в пробирках исследуемого продукта. В соответствии с ГОСТ ТИ 32260-2013 «Сыры полутвердые. Технические условия», оптимальным режимом пастеризации молока в сыроделии является нагревание до температуры (72-74) °C, с выдержкой 20-25 секунд. В случае повышенной бактериальной обсемененности молока допускается температура 76 °C, с выдержкой 20-25 секунд. Согласно Техническому регламенту Таможенного союза «О безопасности молока и молочной продукции» (ТР ТС 033/2013) – «пастеризованное молоко» – молоко, подвергнутое термической обработке в целях соблюдения установленных требований настоящего технического регламента к микробиологическим показателям безопасности». Режим пастеризации для питьевого молока предполагает воздействие температуры (76±2) °C в течение 20 секунд. (ТТИ ГОСТ 31450-2013 Молоко питьевое. Технические условия).

Обработка молока при (85±2) °C с выдержкой 10-15 мин. используется для дальнейшего приготовления кисломолочных продуктов (ТТИ ГОСТ 31981-2013

Йогурты. Общие технические условия; ГОСТ 31453 Творог. Общие технические условия; ГОСТ 31454 Кефир. Общие технические условия и др.).

В нашей работе исследовали следующие режимы термической обработки:

- (72 ± 2) °C с выдержкой 20, 40 и 60 сек; 5 мин, 10 мин, 15 мин
- (76 ± 2) °C с выдержкой 20, 40 и 60 сек; 5 мин, 10 мин, 15 мин
- (85 ± 2) °C с выдержкой 20 сек, 10 мин, 15 мин

Контроль температуры осуществляли с использованием контрольной пробирки с молоком и термометра для учета времени подъема температуры до необходимого значения. По истечении времени температурного воздействия, пробирки остужали путем погружения в ледяную баню. Из обработанных пробирок с молоком проводили высея на твердую питательную среду и инкубировали при температуре (37 ± 1) °C в течение 24-48 часов. Результат учитывали путем подсчета выросших колоний. Для имитации сроков годности и режимов хранения пастеризованного молока, опытные пробирки хранили в холодильнике при температуре (4 ± 2) °C до 14 суток. Для выявления способности потенциально выживших клеток *P. aeruginosa* восстанавливаться в молоке в течение срока хранения, по истечении 7 и 14 суток проводили посев из опытных пробирок с молоком, и после инкубирования учитывали количество выросших колоний. Также проводили микроскопию препаратов выросших колоний для обнаружения возможных фенотипических изменений клеток.

2.3.6 Оценка действия биоцидных препаратов на штаммы *P. aeruginosa*

Для исследования процессов ингибирования штаммов *P. aeruginosa* биоцидным препаратом был использован «чистый» нейтральный анолит, анолит с добавлением ПАВ – аминоксидов и растворы ДХЦН с различным содержанием активного хлора. Раствор нейтрального анолита получали на электрохимической установке СТЭЛ-АНК-СУПЕР; используемый раствор анолита имел следующие физико-химические показатели: содержание АХ – $C_{ax}=183\pm5$ мг/дм³, показатель pH= $6,1\pm0,2$ и окислительно-восстановительный потенциал (ОВП) – 1107±5 мВ. Растворы ДХЦН готовили в соответствии с инструкцией по применению с

содержанием активного хлора 150 и 585 мг/дм³. Массовую долю активного хлора в используемых растворах анолита и ДХЦН определяли методом йодометрического титрования по ГОСТ Р 57001–2016 «Дезинфектология и дезинфекционная деятельность. Химические дезинфицирующие средства и антисептики. Метод определения содержания активного хлора».

В качестве добавок-смачивателей использовали 2 амфотерных ПАВ аминоксида: – низкопенное ПАВ окись дециламина с контролируемым пенообразованием и пенное ПАВ окись алкилдиметиламина. Содержание аминоксидов в водном растворе и в растворах нейтрального анолита составляло 0,03 % (о.в.).

Варианты дезинфицирующих растворов представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Дезинфицирующие растворы, использованные в опыте

№	Дезинфицирующие растворы
1	«чистый» нейтральный анолит
2	анолит с добавлением окиси дециламина
3	анолит с добавлением окиси алкилдиметиламина
4	ДХЦН 150 мг/дм ³
5	ДХЦН 585 мг/дм ³

Нейтральный анолит – электролизный раствор кислородных соединений хлора, получаемый в ходе электрохимических превращений растворов хлорида натрия. В результате реакций, происходящих внутри электрохимической установки, образуется метастабильный раствор, содержащий несколько реакционноспособных ионов и свободных радикалов, включая хлорноватистую кислоту, озон, пероксид водорода, атомарный и сенглетный кислород, хлор, гипохлорит-ионы, соляную кислоту, гидроксид ионы и другие хлор-пероксидные соединения. Содержание активного хлора (АХ) в чистом анолите составляло 183 ± 5 мг/дм³.

Исследование проводили супензионным методом согласно согласно Р 4.2.3676 Руководство «Методы контроля. Биологические и микробиологические

факторы». Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности». Растворы дезинфицирующего средства разливали в стерильные пробирки по 4,5 см³. Из суточных культур бактерий готовили суспензию, соответствующую $1,5 \times 10^8$ КОЕ/мл (оптическая плотность 0,5 по МакФарланду) и добавляли по 0,5 см³ в пробирки с растворами дезинфектанта. Время воздействия составляло 15 минут. После добавления нейтрализатора по 0,5 см³ вносили в пробирки со стерильным физиологическим раствором, после чего, на поверхность плотной питательной среды и в пробирки, содержащие 5 см³ питательного бульона, вносили по 0,1 см³ из каждой пробы. В контроле вместо раствора дезинфицирующего средства использовали стерильный физиологический раствор.

Посевы культивировали 24-48 часов при температуре (37±1) °C. При отсутствии роста исследуемых штаммов ежедневно по 0,5 см³ пересевали в 4,5 см³ новой порции питательного бульона и после культивирования оценивали наличие роста на плотной и жидкой питательных средах. Опыт повторяли трижды, так как согласно МР, эффективность дезинфицирующего средства считают подтвержденной при отсутствии роста во всех трех повторах. Оценку способности штаммов *P. aeruginosa* сохранять жизнеспособность в водном растворе ПАВ – окиси дециламина, используемого в качестве функционального компонента в составах дезинфицирующих средств, осуществляли следующим образом: по 0,5 см³ микробной суспензии, соответствующей примерно $1,0 \times 10^8$ КОЕ/см³, вносили в 4,5 см³ ПАВ и инкубировали при (37±1) °C. Готовили ряд десятичных разведений и высевали на твердые питательные среды. Учет результатов проводили на 1-е, 2-е, 5-е и 60-е сутки.

2.4 Математическая обработка данных.

Для обработки результатов и построения графиков использовали программу MS Office Excel 2016. Эксперименты проводили в трех независимых повторностях, результаты на графиках выражены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение. Статистически значимыми по двустороннему критерию

Стьюодента считали отличия при $p \leq 0,05$. Исследование выполнено с использованием оборудования Центра коллективного пользования Всероссийского научно-исследовательского института молочной промышленности (ЦКП ВНИМИ).

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Выделение и идентификация штаммов *P. aeruginosa* дикого типа

Проведен мониторинг санитарного состояния ряда молочных предприятий. Были исследованы следующие объекты: вода, используемая на производстве, смывы с различных объектов цехового оборудования, пробы кормов, смывы с рук и технологической одежды работников предприятия, пробы растворов дезинфицирующих средств, а также образцы готовой продукции и сырого молока. В результате проведенного мониторинга были выделены штаммы, предварительно отнесенные к *P. aeruginosa*. Им присвоены рабочие номера: *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* 47, *P. aeruginosa* M1, *P. aeruginosa* B2.

Источниками выделения штаммов являлись:

- цеховое оборудование молочной фермы (смывы с доильных аппаратов);
- вода, используемая для мытья производственного оборудования (сыродельческое предприятие);
- готовый продукт – масло сливочное.

Было проведено подтверждение принадлежности выделенных изолятов к *P. aeruginosa*. Все штаммы показали характерный поверхностный пленочный рост на питательном бульоне, с дальнейшим его помутнением. На агаре для псевдомонад образовывали пигментированные сине-зеленые плоские или мелкие выпуклые колонии с гладкой поверхностью, присутствовал свойственный *P. aeruginosa* парфюмерно-цветочный запах. Пигментация усиливалась на 2-3 сутки культивирования. На среде СПА наблюдался эффект радужной пленки. При посеве культур в 12% желатину штаммы проявляли протеолитическую активность в виде разжижения среды; на средах Гисса не ферментировали мальтозу, окисляли глюкозу. Отмечен рост культур при температурных режимах (41±1) °C, (37±1) °C, (6±1) °C.

Для всех штаммов показаны положительные результаты тестов на каталазу и оксидазу. При микроскопии мазков, приготовленных из культур и окрашенных

по Граму, наблюдали грамотрицательные палочки. В результате была подтверждена принадлежность выделенных штаммов к *P. aeruginosa*.

3.2 Изучение морфологических, культуральных, биохимических свойств выделенных штаммов

3.2.1 Морфология клеток выделенных культур

Из суточных культур готовили препараты и окрашивали по Граму. Наблюдали грамотрицательные короткие прямые палочки, расположенные в основном одиночно и попарно (рис.3)

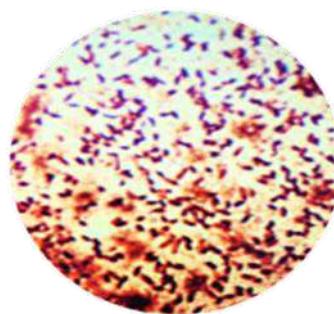


Рисунок 3 – Морфология клеток *P. aeruginosa*

3.2.2 Особенности роста выделенных штаммов *P. aeruginosa* на плотных и жидких питательных средах.

При культивировании наблюдались фенотипические отличия выделенных штаммов от типового *P. aeruginosa* ATCC 25668. Штаммы *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* 47 и *P. aeruginosa* B2 при культивировании на питательном агаре СПА и агаре для псевдомонад при температуре (37±1) °C демонстрировали более выраженное пигментообразование по сравнению с типовым коллекционным штаммом *P. aeruginosa* 25668 (Рис. 3а, 3б), что может свидетельствовать об их большей вирулентности [1].

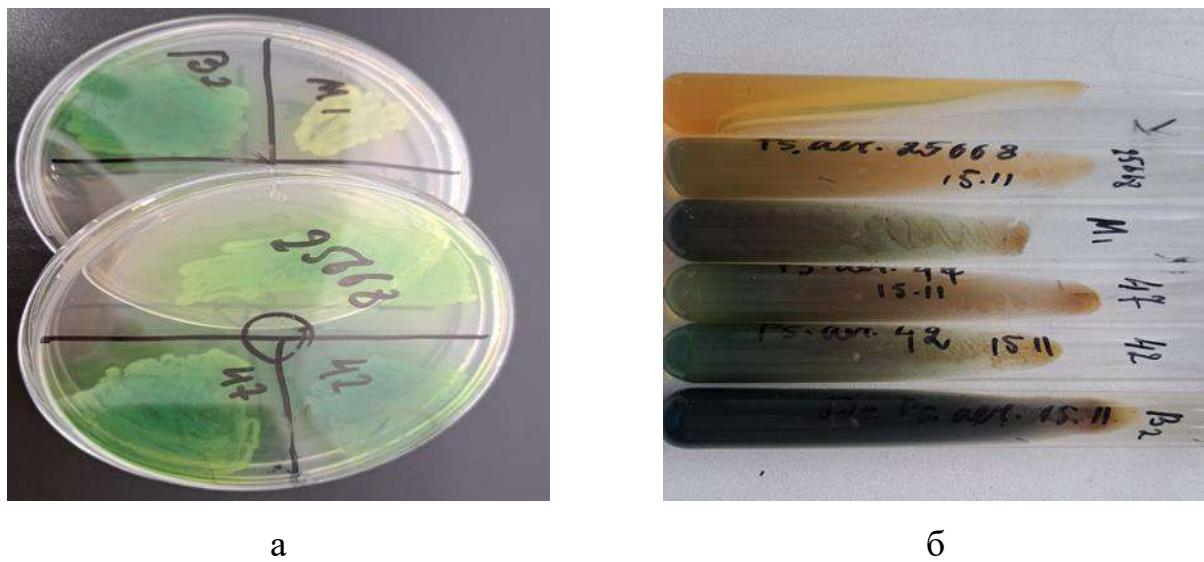


Рисунок 4 – Образование пигмента штаммами *P. aeruginosa* на цетримидном агаре (а) и СПА (б)

Примечание: а: рост на цетримидном агаре; б: на среде СПА; первая пробирка – контроль среды. При культивировании на стерильном обезжиренном молоке при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ отмечались визуальные отличия в характере роста штаммов, что предположительно может быть связано с различиями в работе их ферментов.

На рисунке 5 представлен характер роста на обезжиренном молоке выделенных штаммов *P. aeruginosa* дикого типа и коллекционного.

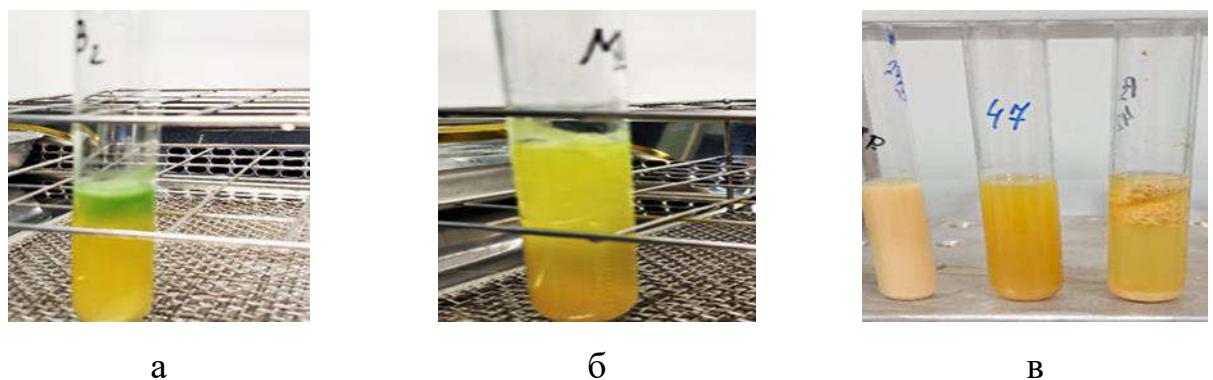


Рисунок 5 – Характер роста на молоке штаммов *P. aeruginosa*

Примечание: а – *P. aeruginosa* B2, б – *P. aeruginosa* M1, в – *P. aeruginosa* 25668, *P. aeruginosa* 47, *P. aeruginosa* 42 (слева направо)

Штамм *P. aeruginosa* B2 в процессе культивирования, кроме расслоения и общего изменения цвета молока, образовывал в зоне пленочного поверхностного роста яркий зеленый пигмент. Штамм *P. aeruginosa* M1 демонстрировал

выраженный обильный пленочный рост, изменение цвета молока и его расслоение. Контрольный тест-штамм не оказывал на молоко столь значительного разрушающего действия, визуально фиксировалось только некоторое изменение цвета и пленочный рост. Для *P. aeruginosa* 47 было характерно сильное пигментообразование в среде инкубирования, сгустки отсутствовали, наблюдался характерный для синегнойной палочки поверхностный рост. При культивировании *P. aeruginosa* 42 в молоке наблюдались визуальные выраженные признаки порчи – образование плотного пористого сгустка, расслоение, изменение цвета [145]. Подобные отличия, вероятно, говорят о более высокой активности ферментов у штаммов дикого типа по сравнению с коллекционным и об их вариабельности.

3.2.2 Определение чувствительности штаммов *P. aeruginosa* к антибиотикам

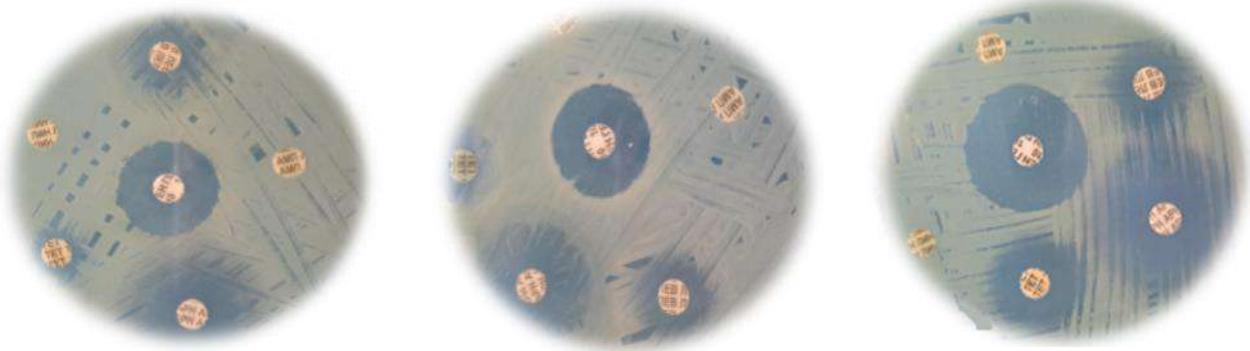
Исходя из предполагаемой корреляции пигментообразования с вирулентностью [1], мы сравнили чувствительность выделенных штаммов и коллекционного *P. aeruginosa* 25668 к ряду антибиотиков, на предмет обнаружения возможной резистентности и разницы в чувствительности к ним у выделенных штаммов. Данные представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к антибиотикам (диско-диффузионный метод)

Антибиотик	Штамм <i>P. aeruginosa</i> , зона подавления роста, мм				
	25668	42	47	M1	B2
ампициллин	R	R	R	R	R
азитромицин	22±1	22±1	20±1	20±1	23±1
гентамицин	20±1	22±1	20±1	20±1	20±1
тетрациклин	11±1	12±1	7±1	11±1	8±1
левомицетин	12±1	12±1	10±1	10±1	12±1
линкомицин	R	R	R	R	R

Примечание: R – резистентный

У всех штаммов наблюдалась устойчивость к линкомицину и ампициллину. Чувствительность к гентамицину, левомицетину и азитромицину была примерно одинакова у всех штаммов. Штаммы *P. aeruginosa* 47 и B2 показали более высокую устойчивость к тетрациклину по сравнению с другими штаммами. Зоны подавления роста штаммов *P. aeruginosa* антибиотиками на плотной среде показаны на рисунке 6.



P. aeruginosa 47

P. aeruginosa 25668

P. aeruginosa 42

Рисунок 6 – Зоны подавления антибиотиками роста *P. aeruginosa*

Подбор антибиотиков крайне важен при лечении маститов, вызванных *P. aeruginosa* – в случае неверно подобранного препарата сырое молоко, являющееся точкой риска, может быть источником *P. aeruginosa*.

3.2.3 Оценка ферментативной активности штаммов *P. aeruginosa*

Результаты исследования ферментативной активности штаммов *P. aeruginosa* представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Профили ферментативной активности штаммов *P. aeruginosa*

Фермент	Активность штаммов <i>P. aeruginosa</i> , у.е.					Фермент	Активность штаммов <i>P. aeruginosa</i> , у.е.				
	25668	42	47	M1	B2		25668	42	47	M1	B2
Контроль	0	0	0	0	0	Кислая фосфатаза	1,0	1,0	1,0	2,5	3,0
Щелочная фосфатаза	2,0	2,0	3,0	4,5	5,0	Нафтол-AS-BI-фосфогидро-лаза	3,0	3,0	3,0	4,5	3,5
Эстераза (C4)	3,5	4,0	3,5	4,0	4,0	α -галактозидаза	0	0	0	0	0
Эстераза-	3,0	4,0	4,5	4,0	4,0	β -галактозидаза	0	0	0	0	0

Фермент	Активность штаммов <i>P. aeruginosa</i> , у.е.					Фермент	Активность штаммов <i>P. aeruginosa</i> , у.е				
	25668	42	47	M1	B2		25668	42	47	M1	B2
	липаза (C8)						β - глюкоронидаза				
Липаза	3,0	3,0	3,5	4,0	2,0		0	0	0	0	0
Лейцин ариламида	3,0	3,0	3,0	4,0	5,0	α -глюкозидаза	0	0	0	0	0
Валин ариламида	0	0	0	0	1,0	β -глюкозидаза	0	0	0	0	0
Цистин ариламида	0	0	0	0	0	N-ацетил- β -глюкозаминидаза	0	0	0	0	0
Трипсин	0	0	0	0	0	α -маннозидаза	0	0	0	0	0
α -химотрипсин	0	0	0	0	0	α -фруктозидаза	0	0	0	0	0

Стрипсы API®ZYM после инкубации исследуемых штаммов представлены на рисунке 7.





Рисунок 7 – Стрипсы API®ZYM после инкубации исследуемых штаммов *P. aeruginosa*

Согласно полученным результатам, все исследуемые штаммы *P. aeruginosa* синтезировали эстеразу, эстеразу-липазу, лейцин-ариламиазу и нафтол-AS-BI-фосфогидролазу, что согласуется с литературным данными. Данные ферменты обеспечивают *P. aeruginosa* высокую выживаемость в неблагоприятных условиях и оказывают влияние на физико-химические свойства внеклеточных полимеров при формировании биопленок [169, 170].

Активность ферментов, синтезируемых исследуемыми штаммами, была различна. Штаммы *P. aeruginosa* 47, *P. aeruginosa* M1, *P. aeruginosa* B2, *P. aeruginosa* 42 проявляли высокую активность эстеразы-липазы. Штамм *P. aeruginosa* M1 проявлял наибольшую активность лейцин-ариламиазы и нафтол-AS-BI-фосфогидролазы. *P. aeruginosa* B2 проявлял наибольшую активность лейцин-ариламиазы.

Штаммы *P. aeruginosa* M1, *P. aeruginosa* B2 и *P. aeruginosa* 47 синтезировали щелочную фосфатазу, в то время как у штаммов *P. aeruginosa* 25668 и *P. aeruginosa* 42 отсутствовала выраженная активность данного фермента. Штамм *P. aeruginosa* M1 проявлял высокую активность липазы.

Результаты исследования протеолитической активности штаммов псевдомонад на молочном агаре при различных температурах культивирования представлены на рисунках 8-10. На рисунке 8 представлены результаты протеолитической активности штаммов при температуре (37 ± 1) °C.

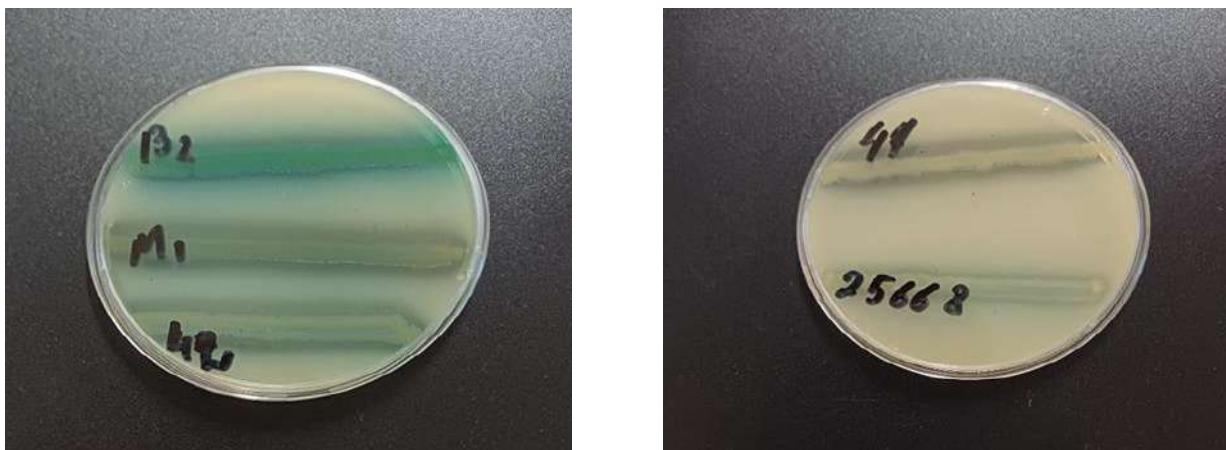


Рисунок 8 – Протеолитическая активность исследуемых штаммов при культивировании на молочном агаре при (37 ± 1) °C

У всех штаммов при данной температуре (37 ± 1) °C через 24 часа наблюдалась зоны протеолиза на молочном агаре. Однако, у штаммов дикого типа *P. aeruginosa* M1, *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* 47, зона протеолиза была шире, чем у коллекционного штамма и «водного» изолятта *P. aeruginosa* B2. На рисунке 9 представлены результаты протеолитической активности штаммов при температуре (20 ± 1) °C.



Рисунок 9 – Протеолитическая активность исследуемых штаммов при культивировании на молочном агаре при (20 ± 1) °C

При температуре (20 ± 1) °C после 24 часов инкубации протеолитическая активность изолятов *P. aeruginosa* M1 и *P. aeruginosa* B2 была незначительна, в отличие от штаммов *P. aeruginosa* 47, *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* 25668, у которых зона протеолиза была даже несколько шире, чем при температуре (37 ± 1) °C.

На рисунке 10 представлены результаты протеолитической активности штаммов при температуре (6 ± 1) $^{\circ}\text{C}$.



Рисунок 10 – Протеолитическая активность исследуемых штаммов при культивировании на молочном агаре при (6 ± 1) $^{\circ}\text{C}$

При температуре (6 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, не являющейся оптимальной для роста *P. aeruginosa*, но используемой при хранении продуктов, протеолитическая активность отмечалась только у штаммов *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* M1 через 72 часа инкубации, на фоне медленного роста культур.

В целом, можно констатировать более высокую ферментативную активность у выделенных штаммов дикого типа по сравнению с коллекционным. Обнаружена разница в протеолитической активности штаммов при разной температуре культивирования. Литературные данные подтверждают, что ферменты псевдомонад способны к протеолитической активности при разных температурах [18]. При низких температурах инкубации меньшее количество штаммов способно вырабатывать пептидазы, однако разные пептидазы активны при разных температурах, и эта способность является во многом штаммоспецифичной. Большинство внеклеточных ферментов *Pseudomonas*, в том числе протеолитических, проявляют наиболее высокую активность при $(30-45)$ $^{\circ}\text{C}$, однако некоторые штаммы сохраняют протеолитическую активность при $(15-20)$ $^{\circ}\text{C}$ [17], что согласуется с результатами нашего исследования.

Есть данные о способности некоторых изолятов псевдомонад проявлять пептидазную активность при низких температурах $(2-10)$ $^{\circ}\text{C}$, что подчеркивает

важность контроля загрязнения на ранних этапах хранения молока. Известно, что важной протеазой, ответственной за порчу молока, является внеклеточная щелочная металлопротеаза из семейства белков AprX [171]. Вариабельность протеолитической активности у псевдомонад, выделенных из различных источников, также была показана в работе Caldera с соавторами. При температуре 5 °C протеолитическая активность наблюдалась у 22% штаммов, выделенных из молока, и у 48% – выделенных из молочных продуктов; а при 25 °C – у 61% и 78%, соответственно [18].

Таким образом, выявлены отличия в ферментативной активности коллекционного и выделенных штаммов *P. aeruginosa*. Для выделенных штаммов была характерна более высокая ферментативная активность. Проявление протеолитической активности зависело как от штамма, так и от температуры культивирования. У всех исследуемых штаммов протеолитическая активность наблюдалась при температуре (37±1) °C, являющейся оптимальной для роста *P. aeruginosa*. При температуре (20±1) °C протеолитическая активность была более выражена у *P. aeruginosa* 47, *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* 25668, а у штаммов *P. aeruginosa* M1 и *P. aeruginosa* B2 была незначительна. При (6±1) °C незначительная протеолитическая активность наблюдалась только у штаммов *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* M1. Метаболическая активность при низких температурах подтверждает риски снижения хранимоспособности, связанные с психротрофностью *P. aeruginosa*.

3.3 Изучение эффективности действия биологических антимикробных агентов на рост штаммов *P. aeruginosa*

3.3.2 Изучение действия синегнойного бактериофага

Ряд исследователей рассматривает возможность использования бактериофагов, как эффективных и экологически безопасных биоцидных средств. При изучении действия антимикробных биологических агентов на рост *P. aeruginosa* исследовали лигическое действие синегнойного бактериофага.

Результаты исследования чувствительности штаммов *P. aeruginosa* к действию синегнойного бактериофага капельным методом представлены в таблице 5 и на рисунках 11-15.

Таблица 5 – Чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к бактериофагу синегнойной палочки

штамм	Разведения бактериофага			
	исх	3-е	6-е	9-е
25668	++++	+/-	-	-
42	+/-	-	-	-
47	++++	+++	-	-
M1	+	-	-	-
B2	++++	+++	+/-	-

Примечание: (++++) сливной (полный) лизис ;(++) полусливной лизис, (+) наличие в месте нанесения фага от 20 до 50 колоний фага (+/-) наличие в месте нанесения фага менее 20 колоний фага; (-) полное отсутствие лизиса.

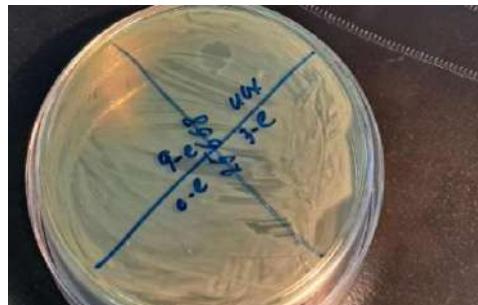


Рисунок 11 – Эффективность действия бактериофага в исходной концентрации и в разведениях 10^{-3} , 10^{-6} и 10^{-9} на коллекционный штамм *P. aeruginosa* ATCC 25668

Степень лизиса коллекционного типового штамма *P. aeruginosa* 25668 при нанесении на газон без разведения была полной (4+). В разведении бактериофага 10^{-3} в месте его нанесения присутствовало менее 20 колоний фага – (+/-), в последующих разведениях ингибирующее действие бактериофага на тест-культуру отсутствовало.



Рисунок 12 - Эффективность действия бактериофага в исходной концентрации и в разведениях 10^{-3} , 10^{-6} и 10^{-9} на штамм *P. aeruginosa* 47

Штамм *P. aeruginosa* 47 полностью лизировался бактериофагом в исходной концентрации (4+), также сохраняя чувствительность к фаговому препарату, разведенному до концентрации 10^{-3} (3+). Для последующих разведений бактериофага литическое действие на штамм *P. aeruginosa* 47 не было обнаружено.



Рисунок 13 – Эффективность действия бактериофага в исходной концентрации и в разведениях 10^{-3} , 10^{-6} и 10^{-9} на штамм *P. aeruginosa* 42

Штамм *P. aeruginosa* 42 был устойчив действию бактериофага начиная с разведения 10^{-3} ; при нанесении бактериофага в исходной концентрации наблюдалось крайне слабое литическое действие (+/-).

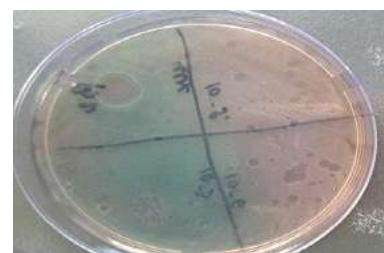


Рисунок 14 – Эффективность действия бактериофага в исходной концентрации и в разведениях 10^{-3} , 10^{-6} и 10^{-9} на штамм *P. aeruginosa* B2

Степень лизиса штамма *P. aeruginosa* B2 при нанесении на газон без разведения была полной (4+). В разведении бактериофага 10^{-3} и 10^{-6} в месте его нанесения присутствовало менее 20 колоний фага – (+/-), в разведении бактериофага 10^{-9} ингибирующее действие бактериофага на тест-культуру отсутствовало.

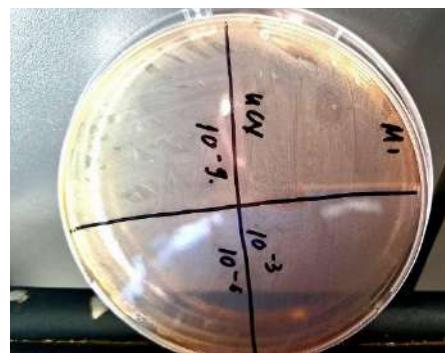


Рисунок 15 – Эффективность действия бактериофага в исходной концентрации и в разведениях 10^{-3} , 10^{-6} и 10^{-9} на штамм *P. aeruginosa* M1

Штамм *P. aeruginosa* M1 был устойчив к действию бактериофага, начиная с разведения 10^{-3} ; литическое действие – (+) наблюдалось только при нанесении бактериофага в исходной концентрации. Результаты определения чувствительности штаммов *P. aeruginosa* на жидкой среде представлены на рисунках 16 - 20 и в таблице 6.



Рисунок 16 —Чувствительность коллекционного штамма *P. aeruginosa* 25668 к препарату бактериофага синегнойного и его разведениям

Выраженные литические свойства бактериофага по отношению к коллекционному штамму *P. aeruginosa* ATCC 25668 проявились до разведения 10^{-2} (пробирки №№1-3), умеренное действие наблюдалось с 10^{-3} по 10^{-7} разведения

(пробирки №№ 4-8), начиная с разведения 10^{-8} литическое действие бактериофага отсутствовало (пробирки №№ 9-10). Пробирка «К» – культура без добавления бактериофага.



Рисунок 17 – Чувствительность штамма *P. aeruginosa* 42 к препарату бактериофага синегнойного и его разведениям

Штамм *P. aeruginosa* 42 продемонстрировал резистентность к литическому действию бактериофага, включая исходную концентрацию препарата.



Рисунок 18 – Чувствительность штамма *P. aeruginosa* 47 к препарату бактериофага синегнойного и его разведениям

Чувствительность к литическому действию бактериофага у штамма *P. aeruginosa* 47 была высокой – до 10^{-4} разведения фагового препарата включительно (пробирки №№ 1-5), что выше, чем у коллекционного типового штамма. Для разведений 10^{-5} и 10^{-6} действие фага оценивалось как умеренное (пробирки №№ 6-7). Литическое действие отсутствовало, начиная с разведения 10^{-7} (пробирки №№ 8-10). Пробирка «К» – культура без добавления бактериофага.



Рисунок 19 – Чувствительность штамма *P. aeruginosa* M1 к препарату бактериофага синегнойного и его разведениям

Чувствительность к литическому действию бактериофага у штамма *P. aeruginosa* M1 отмечалась до 10^{-3} разведения фагового препарата включительно (пробирки №№ 1-3), для разведений 10^{-4} и 10^{-5} действие фага оценивалось как умеренное (пробирки № 5-6). Литическое действие отсутствовало, начиная с разведения 10^{-6} (пробирки №№ 7-10). Пробирка «К» – культура без добавления бактериофага.



Рисунок 20 – Чувствительность штамма *P. aeruginosa* B2 к исходному препарату бактериофага синегнойного и его разведениям

Чувствительность к литическому действию бактериофага у штамма *P. aeruginosa* B2 была сходна со штаммом *P. aeruginosa* 47 – показан высокий уровень чувствительности до 10^{-5} разведения фагового препарата включительно (пробирки №№ 1-6). Для разведений 10^{-6} и 10^{-7} действие фага оценивалось как умеренное (пробирки №№ 7-8). Литическое действие отсутствовало, начиная с разведения 10^{-6} (пробирки №№ 9-10). Пробирка «К» – культура без добавления бактериофага.

Результаты определения чувствительности к бактериофагу синегнойной палочки штаммов *P. aeruginosa* (на жидкой среде) представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Чувствительность к бактериофагу синегнойной палочки штаммов *P. aeruginosa* (на жидкой среде)

штамм	Разведения бактериофага									
	исх	1	2	3	4	5	6	7	8	9
25668	В	В	В	У	У	У	У	У	Н	Н
42	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н	Н
47	В	В	В	В	В	У	У	Н	Н	Н
M1	В	В	В	У	У	Н	Н	Н	Н	Н
B2	В	В	В	В	В	В	У	У	Н	Н

Примечание: В – высокая чувствительность, У – умеренная чувствительность, Н – низкая чувствительность

При определении антибиотикочувствительности, штаммы *P. aeruginosa* 47 и *P. aeruginosa* B2 показали большую устойчивость к антибиотикам, по сравнению с другими штаммами [145]. В то же время, у них выявлена самая высокая чувствительность к лизическому действию синегнойного фага. Это согласуется с литературными данными о различных механизмах возникновения резистентности к антибиотикам и бактериофагам, возможно, имеющих разнонаправленный характер [172].

У штамма *P. aeruginosa* 42 подтверждена резистентность к действию бактериофага, выявленная капельным методом. Штамм *P. aeruginosa* M1 показал большую резистентность по сравнению с контрольным штаммом, *P. aeruginosa* 47 и *P. aeruginosa* B2. Согласно литературным данным, фагоустойчивость у микроорганизмов первично может быть связана с отсутствием на поверхности клетки специфических рецепторов для прикрепления бактериофага, но может быть приобретенной, и распространяться в популяциях *P. aeruginosa* [173]. При оценке эффективности применения бактериофагов для предотвращения формирования и разрушения сформированных биопленок, образованных штаммами *P. aeruginosa* в медицинском стационаре, показано, что профилактическое действие бактериофагов на процесс формирования биопленки отсутствовало в 42,9%. Заявленной способности к деструкции сформированных биопленок не наблюдалось в 35,7% случаев [174]. Есть данные о резком увеличении роста биопленки после частичной деструкции в результате действия

фага [172]. Известно, что синтезируемый *P. aeruginosa* экзополисахарид играет существенную роль в выживаемости во внешней среде, защищая микрорганизм, в том числе, от бактериофагов [138]. Большая эффективность действия фаговых коктейлей по сравнению с действием монофаговых препаратов также неоднозначна [172].

В результате данного исследования показано, что бактерии *P. aeruginosa*, в том числе циркулирующие на одном предприятии, обладают разным фаготипом. Разработка процедур элиминации данного патогена с использованием бактериофагов для санитарно-профилактических мероприятий требует всякий раз оценки эффективности препарата, аналогично определению антибиотикочувствительности, с учетом возможной циркуляции на одном предприятии бактерии *P. aeruginosa* с разным фаготипом, вплоть до резистентности к лизическим свойствам фагового препарата. Применение данного фага для предотвращения развития выделенных штаммов *P. aeruginosa* не является целесообразным.

3.3.3 Определение антимикробной активности штаммов молочнокислых бактерий и грибковой кефирной закваски в отношении *P. aeruginosa*

Для оценки возможности снижения рисков развития *P. aeruginosa* при производстве ферментированных молочных продуктов изучено антагонистическое действие производственно значимых коллекционных штаммов МКБ разных групп на штаммы *P. aeruginosa* при инкубации в молоке методом сокультивирования. Контролем являлся рост монокультуры *P. aeruginosa*. Сначала антагонистическую активность определяли по отношению к типовому штамму *P. aeruginosa* 25668. На рисунке 21 представлены результаты антимикробной активности представителей *L. helveticus* по отношению к типовому коллекционному штамму *P. aeruginosa* 25668.

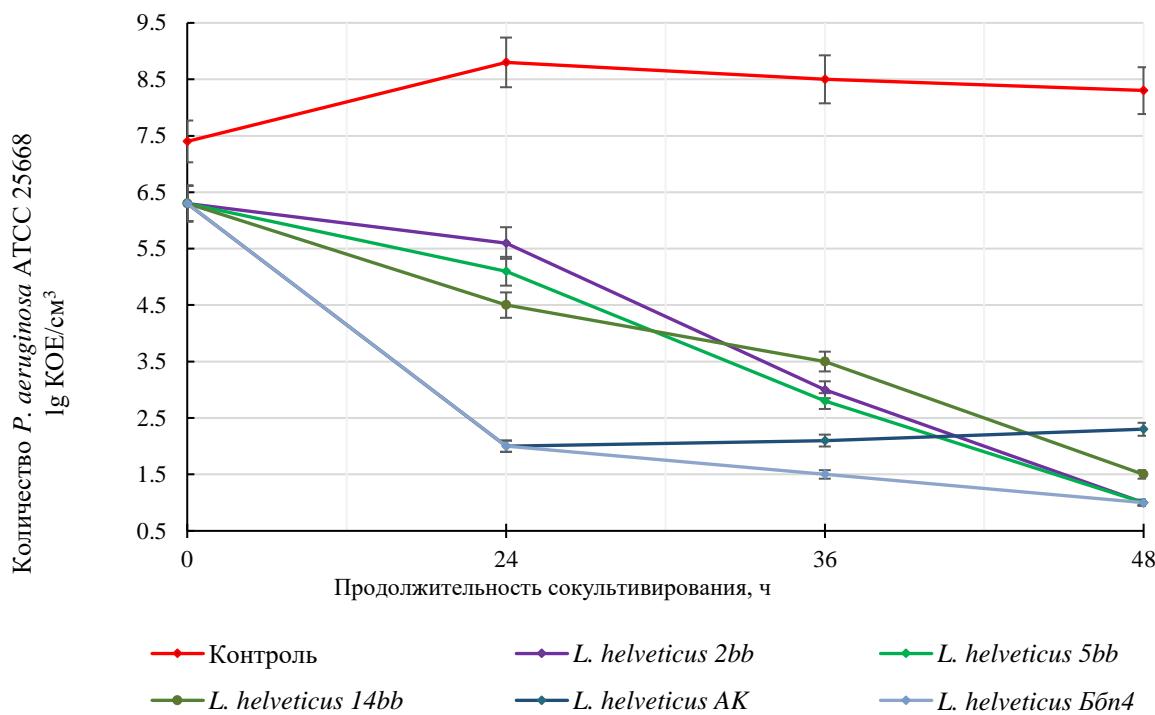


Рисунок 21 – Антимикробная активность *L. helveticus* по отношению к *P. aeruginosa* 25668

В целом, все изученные штаммы *L. helveticus* оказывали выраженное ингибирующее действие на синегнойную палочку. Через 48 часов сокульттивирования количество клеток *P. aeruginosa* 25668 снижалось на 4-5 порядков и составляло от $2,2 \times 10^2$ до $1,0 \times 10^1$ KOE/cm³. В то же время в контрольном образце наблюдался рост монокультуры *P. aeruginosa* 25668 – до $6,4 \times 10^8$ KOE/cm³ через 24 ч с незначительным снижением до $1,9 \times 10^8$ KOE/cm³ через 48 ч. При этом антимикробное действие было наиболее выражено у штамма *L. helveticus* Ббн4 – количество *P. aeruginosa* 25668 уже через 24 ч составило $1,0 \times 10^2$ KOE/cm³ с дальнейшим снижением количества клеток на порядок – до $1,0 \times 10^1$ KOE/cm³.

На рисунке 22 представлены результаты антимикробной активности представителей *L. paracasei* по отношению к коллекционному штамму *P. aeruginosa* 25668.

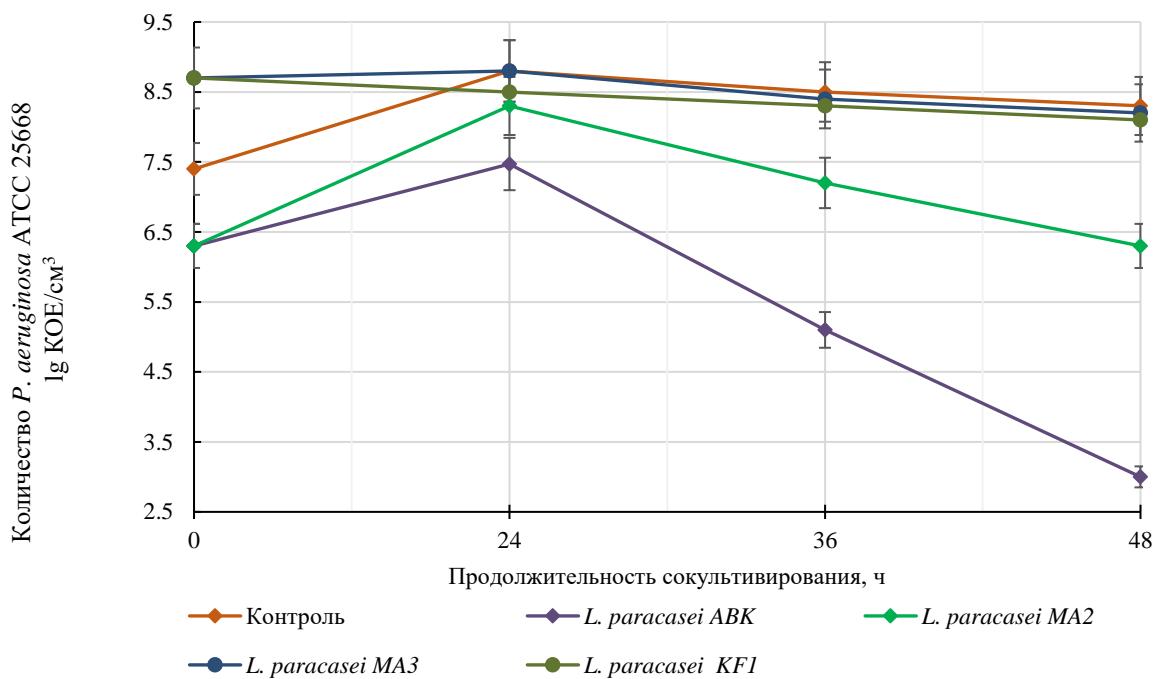


Рисунок 22 – Антимикробная активность *L. paracasei* по отношению к *P. aeruginosa* 25668

Ингибирующее действие штаммов *L. paracasei*, за исключением *L. paracasei* АВК, на рост *P. aeruginosa* 25668 было слабым. Через 24 ч сокультивирования во всех вариантах наблюдалось или отсутствие ингибирующего эффекта или даже рост патогена. В то же время при сокультивировании с *L. paracasei* АВК через 48 ч количество клеток *P. aeruginosa* снижалось до $1,0 \times 10^3$ КОЕ/см³, что может быть связано с накоплением культурой антимикробных метаболитов.

На рисунке 23 представлены результаты изучения антимикробной активности представителей *S. thermophilus* по отношению к коллекционному штамму *P. aeruginosa* 25668.

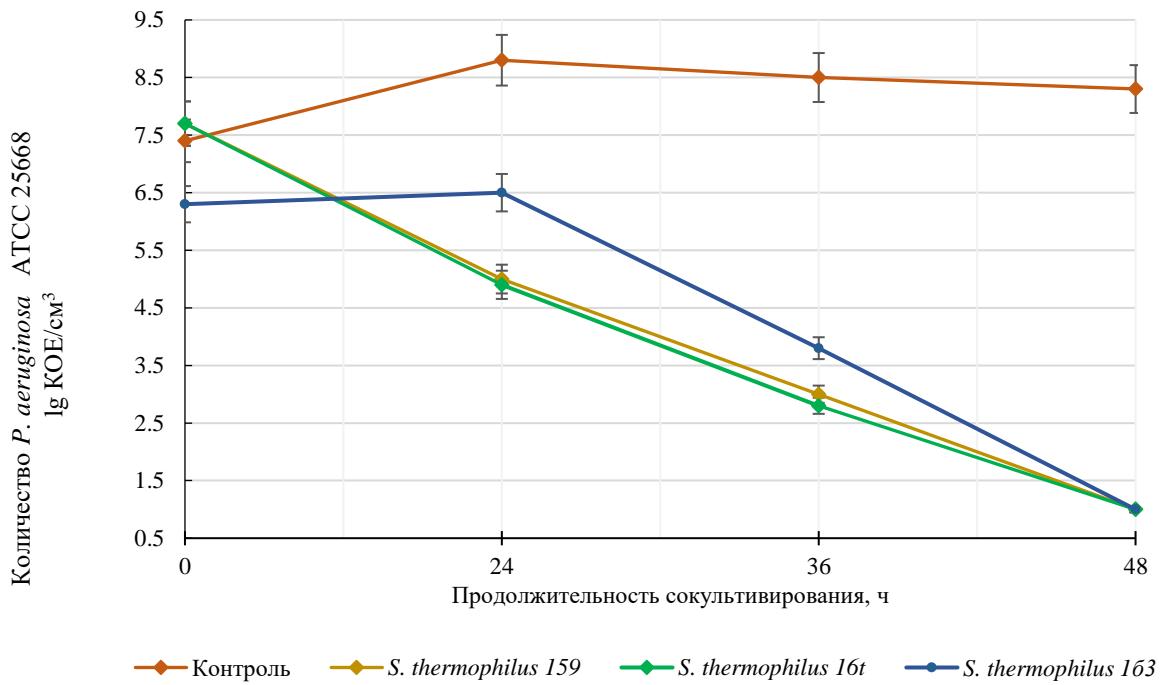


Рисунок 23 – Антимикробная активность *S. thermophilus* по отношению к *P. aeruginosa* 25668

Все три изученных штамма *S. thermophilus* активно подавляли рост *P. aeruginosa*. Количество клеток *P. aeruginosa* 25668 через 48 часов сокульттивирования снизилось на 5 порядков и составило $1,0 \times 10^1$ КОЕ/см³, при увеличении количества клеток синегнойной палочки примерно на порядок в контрольном образце через 24 часа и незначительном снижении к 48 часам. Причем *S. thermophilus* 159 через 24 часа практически не оказывал подавляющего действия на синегнойную палочку, значительно усиливая его к 48 часам, что, возможно связано с особенностями штамма – медленным накоплением антимикробных метаболитов.

Результаты изучения антимикробной активности *L. lactis* по отношению к *P. aeruginosa* 25668 представлены на рисунке 24.

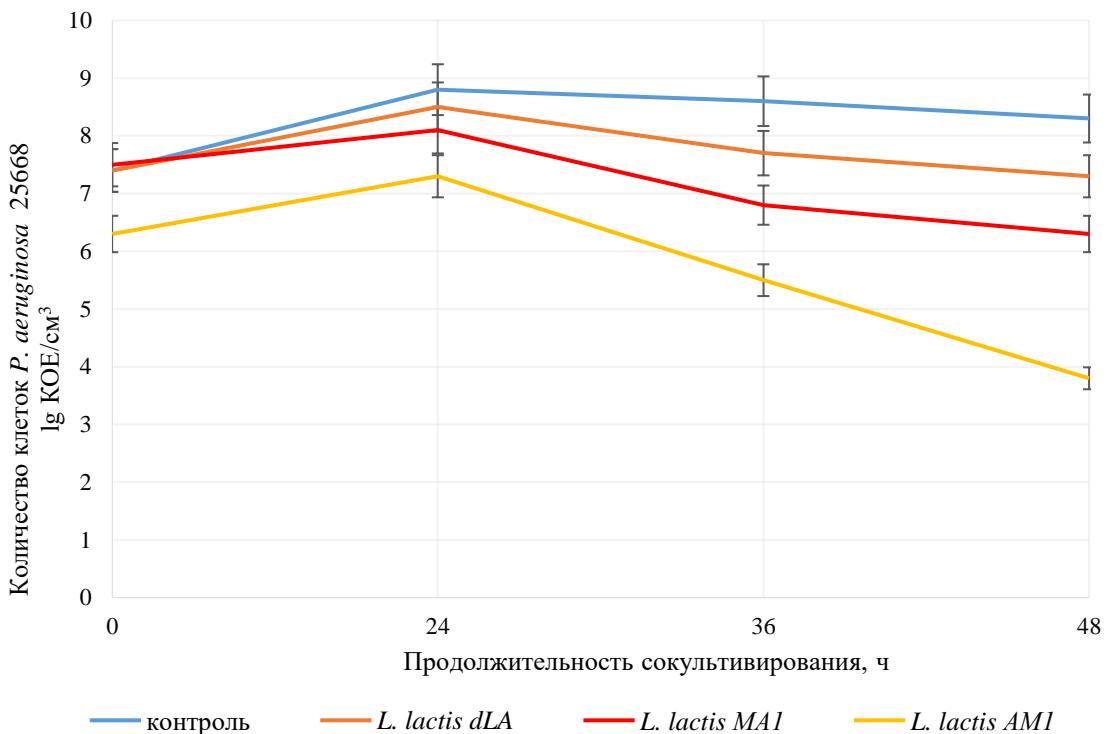


Рисунок 24 – Антимикробная активность *L. lactis* по отношению к *P. aeruginosa* 25668

Представители *L. lactis* не обладали значительной антагонистической активностью по отношению к *P. aeruginosa* 25668. Максимальный ингибирующий эффект оказывал штамм *L. lactis* AM1 через 48 часов. При сокультивировании с данным штаммом количество клеток *P. aeruginosa* 25668 через 48 ч снизилось на 2,5 порядка – до $6,5 \times 10^3$ KOE/cm³.

В целом, можно констатировать, что ингибирующее действие *L. helveticus* и *S. thermophilus* на коллекционный штамм синегнойной палочки было более выражено по сравнению с *L. paracasei* и *L. lactis*. Для подтверждения ингибирующих свойств относительно *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* 47, *P. aeruginosa* M1 и *P. aeruginosa* B2 были выбраны 2 штамма – *S. thermophilus* 16t и *L. helveticus* Ббн4.

На рисунке 25 представлены результаты изучения антимикробной активности штаммов *S. thermophilus* 16t и *L. helveticus* Ббн4 по отношению к *P. aeruginosa* 47.

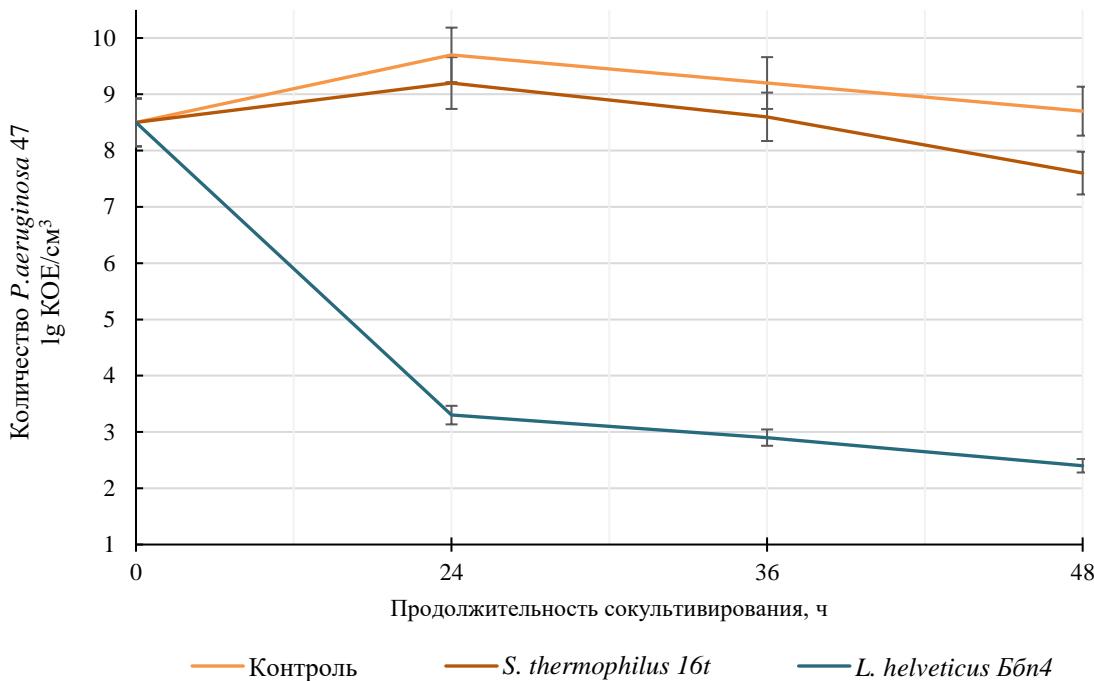


Рисунок 25 – Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* 47

Показана высокая антимикробная активность *L. helveticus* Ббн4 по отношению *P. aeruginosa* 47. Количество клеток патогена через 24 часа снижалось на 5 порядков, с дальнейшим снижением на порядок к 48 ч сокультивирования и составило $2,0 \times 10^3$ КОЕ/см³, по сравнению с $1,0 \times 10^9$ КОЕ/см³ в контроле, что согласуется с результатами, полученными для коллекционного типового штамма. В то же время, ингибирующее действие *S. thermophilus* 16t на *P. aeruginosa* 47 было крайне незначительно – через 24 часа даже наблюдался незначительный рост патогена до $1,5 \times 10^9$ КОЕ/см³, а через 48 ч сокультивирования количество клеток синегнойной палочки составило $4,0 \times 10^7$ КОЕ/см³. Таким образом, можно предположить наличие у штамма *P. aeruginosa* 47, в отличие от коллекционного, устойчивости к метаболитам *S. thermophilus* 16t.

На рисунке 26 представлены результаты изучения антимикробной активности штаммов *S. thermophilus* 16t и *L. helveticus* Ббн4 по отношению к *P. aeruginosa* M1.

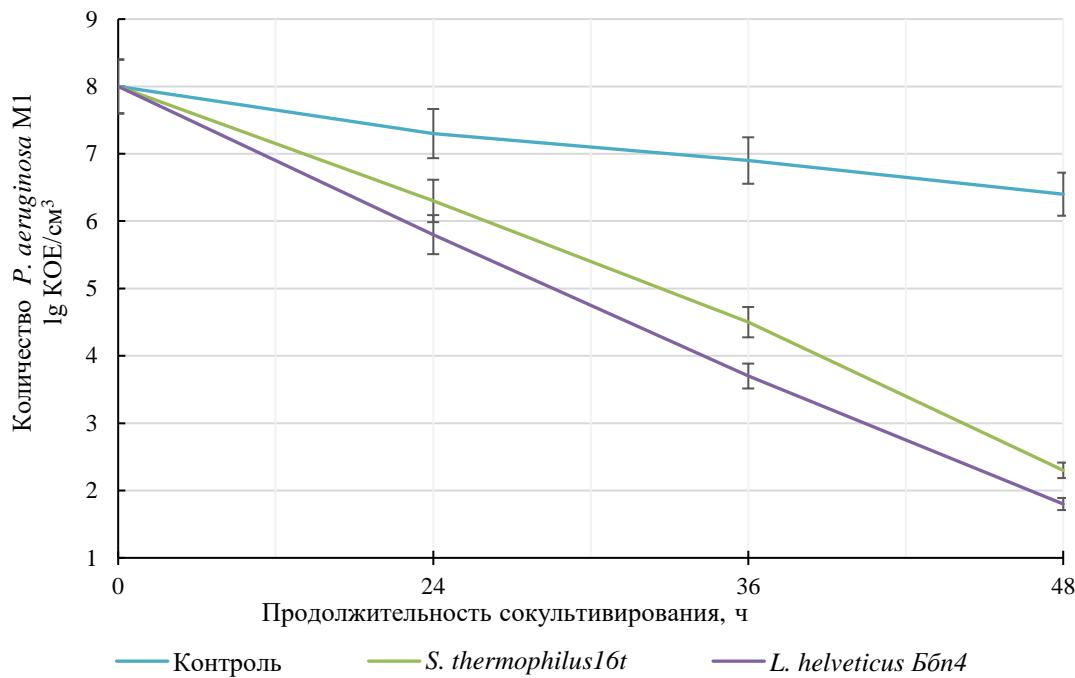


Рисунок 26 – Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* M1

Из представленных данных видно, что оба штамма МКБ оказывали значительное ингибирующее действие на *P. aeruginosa* M1, снижая количество клеток синегнойной палочки через 24 часа на 1,5-2 порядка и на 5,5-6 порядков через 48 часов, что согласуется с данными, полученными для коллекционного штамма. При этом действие *L. helveticus* Ббн4 было чуть более выраженным как через 24, так и через 48 часов сокультивирования. При сокультивировании *L. helveticus* Ббн4 и *P. aeruginosa* M1 через 24 ч количество клеток *P. aeruginosa* M1 составило $6,0 \times 10^5$ КОЕ/см³, через 48 ч количество клеток *P. aeruginosa* M1 снизилось до $7,0 \times 10^1$ КОЕ/см³.

На рисунке 27 представлены результаты изучения антимикробной активности штаммов *S. thermophilus* 16t и *L. helveticus* Ббн4 по отношению к изоляту *P. aeruginosa* 42.

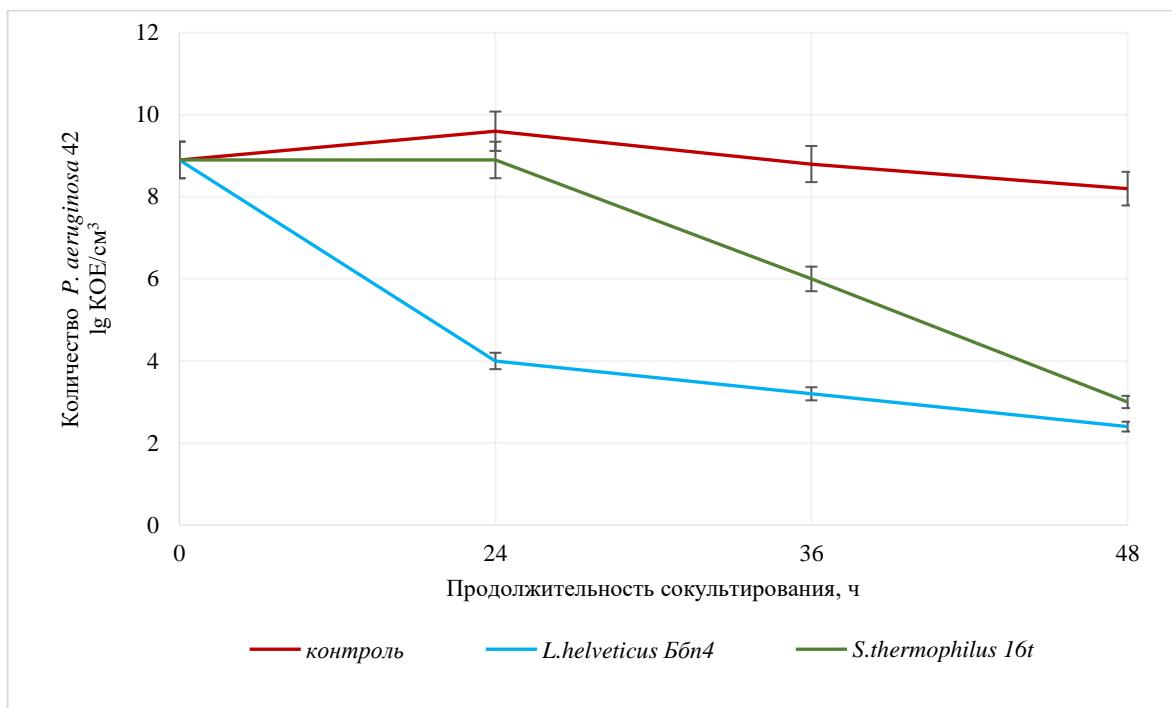


Рисунок 27 – Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* 42

При сокультивировании *L. helveticus* Ббн4 и *P. aeruginosa* 42 через 24 ч количество клеток *P. aeruginosa* составило $1,0 \times 10^4$ KOE/cm³, а через 48 ч – $2,0 \times 10^2$ KOE/cm³. Ингибирующего действие *S. thermophilus* 16t на штамм *P. aeruginosa* 42 через 24 ч не обнаружено; через 48 ч оно присутствовало, но было менее выражено по сравнению со штаммом *L. helveticus* Ббн4 – $1,5 \times 10^3$ KOE/cm³. В контрольном образце количество клеток *P. aeruginosa* 42 составило $6,0 \times 10^9$ KOE/cm³ через 24 ч культивирования и $1,0 \times 10^8$ KOE/cm³ – через 48 ч.

На рисунке 28 представлены результаты антимикробной активности штаммов *S. thermophilus* 16t и *L. helveticus* Ббн4 по отношению к штамму *P. aeruginosa* B2.

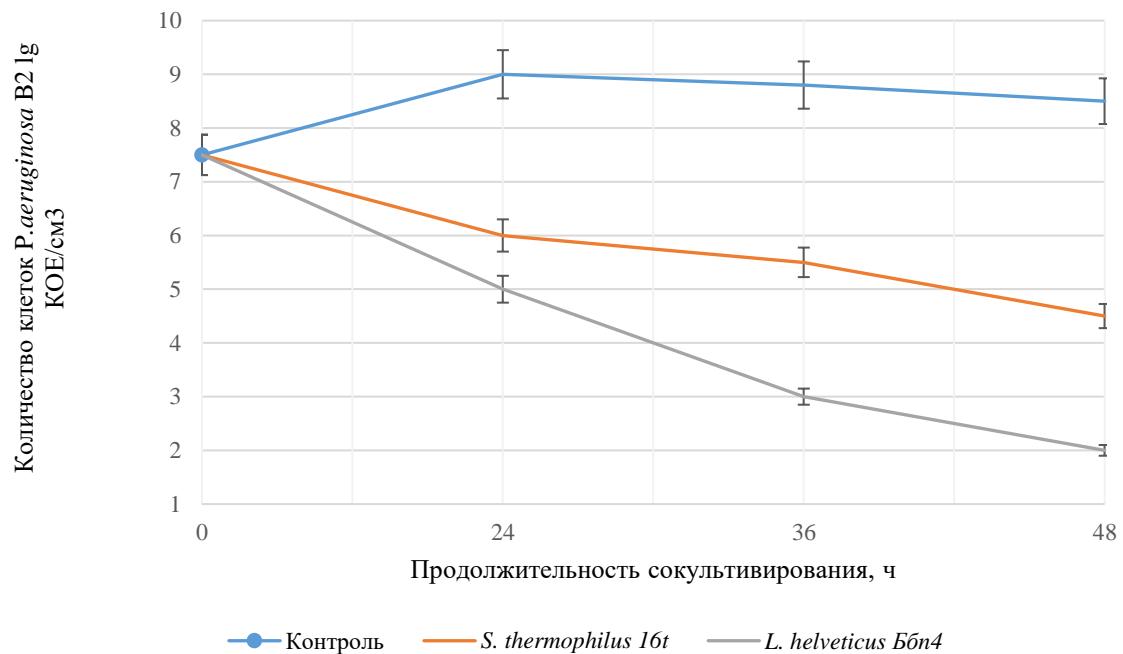


Рисунок 28 – Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* B2

При сокультивировании *L. helveticus* Ббн4 и *P. aeruginosa* B2 через 24 ч количество клеток *P. aeruginosa* составило $1,4 \times 10^5$ КОЕ/см³, по сравнению с $1,4 \times 10^9$ КОЕ/см³ в контроле, а через 48 ч – $1,7 \times 10^2$ КОЕ/см³. При сокультивировании с *S. thermophilus* 16t количество клеток *P. aeruginosa* B2 через 24 ч составило $1,9 \times 10^6$ КОЕ/см³; через 48 ч $4,5 \times 10^4$ КОЕ/см³. Таким образом ингибирующее действие *L. helveticus* Ббн4 было более выраженным.

Для дальнейших исследований были выбраны 2 штамма: *P. aeruginosa* 47 и *P. aeruginosa* 42, выделенные на одном предприятии и показавшие значимые отличия по своим свойствам. В качестве контрольного использовали типовой коллекционный штамм *P. aeruginosa* 25668.

Данные по антагонистической активности при совместном культивировании типового штамма *P. aeruginosa* ATCC 25668, коллекционных лактобактерий *L. helveticus* NK1, *L. rhamnosus* F и грибковой кефирной закваски представлены на рисунке 29.

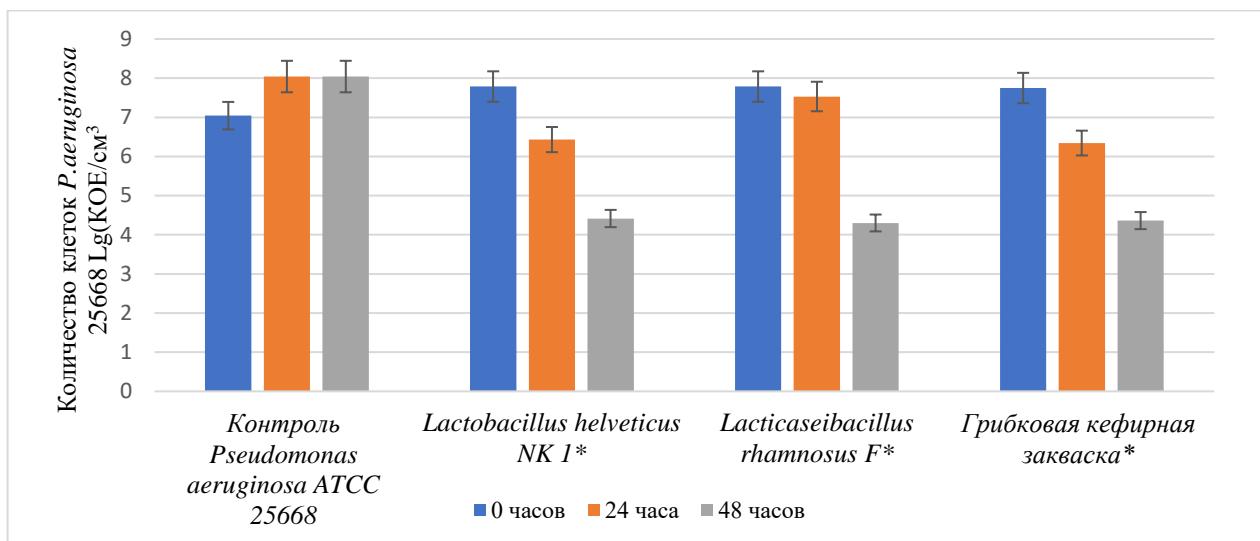


Рисунок 29 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 25668 в монокультуре и при сокультивировании* с лактобациллами и грибковой кефирной закваской

Анализ полученных данных показал, что подавление роста *P. aeruginosa* 25668 при сокультивировании с штаммом *L. helveticus* NK1 и грибковой кефирной закваской через сутки было примерно одинаково – количество клеток снижалось на один порядок – до $2,7 \times 10^6$ КОЕ/см³ и до $2,2 \times 10^6$ КОЕ/см³ соответственно, по сравнению с контролем. В монокультуре в то же время наблюдался рост – с $5,1 \times 10^7$ до $1,1 \times 10^8$ КОЕ/см³.

Антагонистическое действие *L. rhamnosus* F через 24 ч сокультивирования было минимально и составило $3,4 \times 10^7$ КОЕ/см³. Надо отметить, что ранее, при сокультивировании с госпитальным штаммом *Klebsiella pneumonia* с множественной устойчивостью к антибиотикам разных групп, именно штамм *L. rhamnosus* F показал высокую антагонистическую активность уже через 24 часа с дальнейшим снижением количества патогена, в то время как *L. helveticus* NK 1 не проявил значительного антагонистического эффекта [148]. Ингибирующее действие на *P. aeruginosa* 25668 через 48 часов сокультивирования во всех трех вариантах было примерно одинаковым: количество клеток составило $2,0 \times 10^4$ – $2,6 \times 10^4$ КОЕ/см³, снижаясь на три порядка.

Данные по антагонистической активности при совместном культивировании выделенного штамма *P. aeruginosa* 42, коллекционных лактобацилл и грибковой кефирной закваски представлены на рисунке 29.

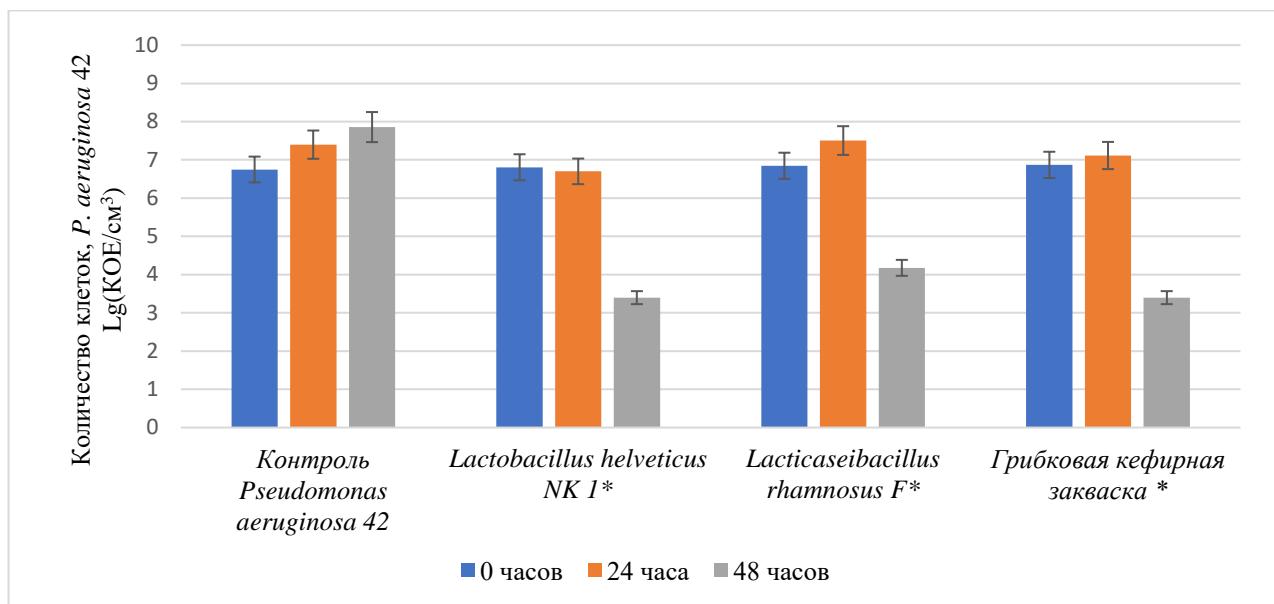


Рисунок 29 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 42 в монокультуре и при сокультивировании* с лактобациллами и грибковой кефирной закваской

Через 24 часа сокультивирования *L. helveticus* NK1 с *P. aeruginosa* 42 антагонистическая активность не проявлялась. Через 48 часов сокультивирования отмечено снижение количества клеток *P. aeruginosa* на 3 порядка – до $2,5 \times 10^3$ КОЕ/см³.

Антагонистическое действие *L. rhamnosus* F также через 24 часа сокультивирования не проявлялось. Через 48 ч антагонистическое действие было выраженным – количество клеток *P. aeruginosa* 42 снизилось на 2 порядка по сравнению с исходным значением и составило $1,5 \times 10^4$ КОЕ/см³.

При сокультивирования *P. aeruginosa* 42 с грибковой кефирной закваской отмечается тенденция, аналогичная результатам, полученными для *L. rhamnosus* F, где через 24 ч отмечается незначительный рост культуры. Однако, через 48 ч сокультивирования антагонистическое действие было более выраженным, наблюдалось снижение количества клеток синегнойной палочки на 3 порядка и составило $2,5 \times 10^3$ КОЕ/см³.

Данные по антагонистической активности при совместном культивировании выделенного штамма *P. aeruginosa* 47, коллекционных лактобацилл и грибковой кефирной закваски представлены на рисунке 30.

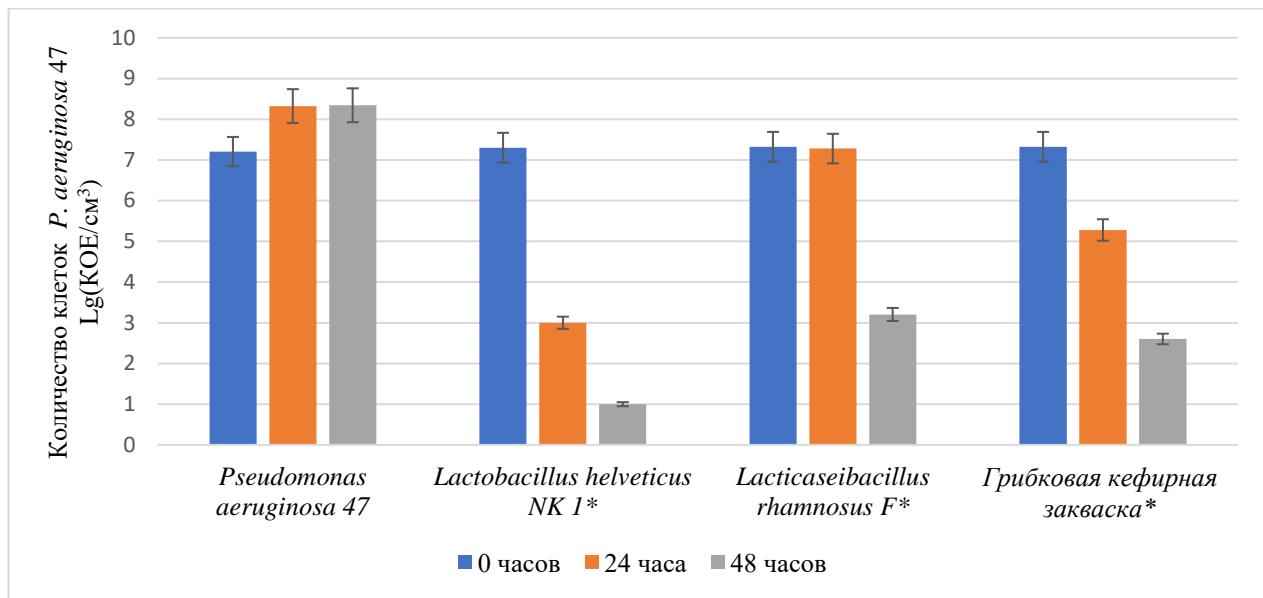


Рисунок 30 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 47 в монокультуре и при сокультивировании (*) с лактобациллами и грибковой кефирной закваской

При сокультивировании с *L. helveticus* NK1 через 24 ч количество клеток *P. aeruginosa* 47 снижалось с $2,0 \times 10^7$ КОЕ/см³ до $1,0 \times 10^3$ КОЕ/см³, (на 4 порядка) и до $1,5 \times 10^1$ КОЕ/см³ через 48 ч. Ингибирующий эффект грибковой кефирной закваски был менее заметным – количество клеток *P. aeruginosa* 47 снижалось через 24 ч на 2 порядка (с $1,9 \times 10^7$ КОЕ/см³ до $1,9 \times 10^5$ КОЕ/см³) и через 48 ч – до $6,0 \times 10^2$ КОЕ/см³. При этом в монокультуре наблюдался рост с $2,3 \times 10^7$ КОЕ/см³ до $2,1 \times 10^8$ КОЕ/см³. Влияние *L. rhamnosus* F на рост *P. aeruginosa* 47 через 24 ч практически отсутствовало. Количество клеток *P. aeruginosa* 47 при сокультивировании составило $1,9 \times 10^7$ КОЕ/см³ по сравнению с $2,1 \times 10^7$ КОЕ/см³ в контроле. На вторые сутки сокультивирования antagonистический эффект *L. rhamnosus* F возрастал и количество клеток *P. aeruginosa* 47 снижалось на 4 порядка.

Анализ полученных данных показал различия в степени подавление роста *P. aeruginosa* 47 при сокультивировании с *L. helveticus* NK1, *L. rhamnosus* F и грибковой кефирной закваской как через 24, так и через 48 часов инкубирования, что подтверждает штаммоспецифичность antagonистического действия на патоген.

Известна способность лактобацилл проявлять избирательную активность в отношении различных видов патогенных бактерий. Исследования *L. rhamnosus* F при совместном культивировании с бактерией группы кишечной палочки *Klebsiella pneumoniae* продемонстрировали наличие в его секретоме большого спектра липидических ферментов (трансгликозилаз) [147,148], действие которых на клеточную стенку грамотрицательных бактерий сходно с действием бактериофагов (лизис). Возможны и другие механизмы, дающие этому штамму возможности ингибировать широкий круг патогенов. Эти данные дали основания предположить значительную антимикробную эффективность штамма *L. rhamnosus* F также относительно представителей *P. aeruginosa*.

Однако, полученные результаты показали, что наибольшее ингибирующее действие на выделенные штаммы синегнойной палочки оказывал штамм *L. helveticus* NK1, причем в случае с *P. aeruginosa* 47 подавление роста было практически 100%. Есть данные об антимикробной активности пептидов, образующихся в результате действия протеаз молочнокислых бактерий на казеин – основной белок молока [149]. В проведенном ранее исследовании антагонистической активности штаммов *L. rhamnosus* F и *L. helveticus* NK1 относительно *Klebsiella pneumoniae* в зависимости от питательной среды культивирования методом диффузии в агар показано, что при инкубировании на бульоне MRS зона ингибирования *L. rhamnosus* F превышает зону ингибирования патогена штаммом *L. helveticus* NK1 почти в 2 раза, а при культивировании на молоке различия практически отсутствовали [146].

Оценка характера роста на молоке чистой культуры *P. aeruginosa* 47, и при совместном культивировании *P. aeruginosa* 47 с *L. rhamnosus* F, *L. helveticus* NK1 и грибковой кефирной закваской представлена на рисунке 31.

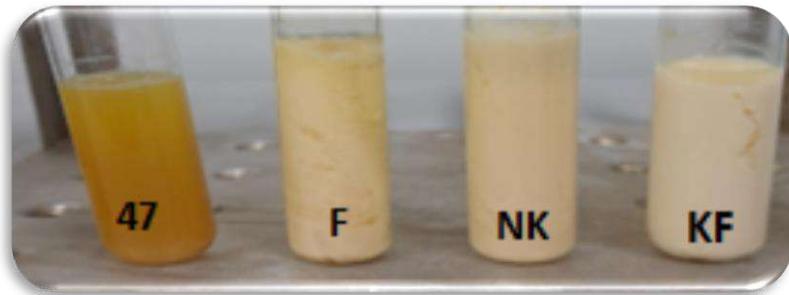


Рисунок 31 – Изменения среды культивирования (молока) при росте монокультуры *P. aeruginosa* 47 и сокультивировании с *L. rhamnosus* F, *L. helveticus* NK1 и грибковой кефирной закваской KF через 48 часов.

На основе полученных данных можно судить о корреляции визуальных изменений среды инкубирования (молока) с антагонистическим действием культур. В монокультуре отмечаются видимые признаки порчи – изменение цвета молока с поверхностным пленочным ростом *P. aeruginosa* 47.

При сокультивировании с *L. rhamnosus* F наблюдали незначительное расслоение и изменение цвета молока. При совместном инкубировании с *L. helveticus* NK1 и грибковой кефирной закваской, проявивших более высокую антимикробную активность, заметных визуальных изменений в молоке не наблюдалось, что подтверждает высокую степень подавления синегнойной палочки. Полученные данные подтверждают вариабельность свойств штаммов *P. aeruginosa*, циркулирующих одновременно на одном предприятии.

Выраженная антагонистическая активность штамма *L. helveticus* NK1 при инкубировании на молоке косвенно подтверждает предположение о его способности образовывать пептиды с антимикробным действием в ответ на стрессовое условие – присутствие в ростовой среде бактерий другого вида. Многочисленные исследования различных видов лактобацилл показали, что у отдельных штаммов при стрессовых воздействиях могут включаться специфические метаболические пути, что приводит к изменениям в составе их секретомов [175]. Ингибирующее действие *L. helveticus* BbN4 обусловлено синтезом органических кислот, а также может быть связано с присутствием в его

метаболоме антимикробных пептидов или бактериоцинов, позволяющих эффективно подавлять рост *P. aeruginosa*.

Возможны 2 вида антагонизма МКБ по отношению к патогенам – неспецифический – за счет образования молочной кислоты; и специфический – за счет минорных соединений. Исходя из подтвержденной высокой антагонистической активности штамма *L. helveticus* NK1, представляло интерес изучение возможных механизмов его ингибирующего действия на *P. aeruginosa*. Для этого был проведен сравнительный протеомный и метаболомный анализ образцов среды культивирования через 24 и 48 ч – монокультуры *L. helveticus* NK1 и при сокультивировании с *P. aeruginosa* 25668.

Обнаружены различия в белковых и метаболитных профилях монокультуры и при сокультивировании с *P. aeruginosa* 25668 (среда MRS). В присутствии *P. aeruginosa* увеличивалось образование белков, участвующих в биогенезе и ремоделировании клеточной стенки лактобациллы (N-ацетилмурамидаза, N-ацетилглюкозаминкиназа и др.), усиливалась продукция белков энергетического обмена (пируваткиназа, 6-фосфофруктокиназа, L-лактатдегидрогеназа и др.), а также белков, участвующих в протеолизе (СЕР протеаза prtH, пептидазы PepX и др.), метаболизме жирных кислот (аминотрансфераза и др.) и аминокислот (аспартатаминонтрансфераза, цистеинсинтаза, и др.).

Увеличение секреции таких ферментов как PLP-зависимая аминотрансфераза и L-лактатдегидрогеназа в присутствии *P. aeruginosa* свидетельствует о возможном синтезе *L. helveticus* NK1 3-фенилмолочной и 4-гидроксифенилмолочной кислот, обладающих мощной антимикробной активностью. Фенилаланин и тирозин дезаминируются аминотрансферазой, образуя фенилпировиноградную кислоту и 4-гидроксифенилпировиноградную кислоту соответственно. Затем кетокислоты восстанавливаются лактатдегидрогеназой с образованием 3-фенилмолочной и 4-гидроксифенилмолочной кислот.

Усиливалась секреция некоторых белков S-слоя. Некоторые белки этой группы были уникальными – их секреция штаммом *L. helveticus* NK1 обнаружена

только при сокультивировании с *P. aeruginosa*. Так через 48 часов сокультивирования выявлен белок MBU5980144.1. Он содержит на С-конце два домена SLAP, отвечающих за присоединение к клеточной стенке бактерий, и на N-конце домен пептидогликангидролазы. Возможно, данный белок может осуществлять гидролиз клеточной стенки патогенной бактерии при ко-агрегации с клетками *L. helveticus*. Наличие в структуре молекулы SLAP-домена характерено также для N-ацетилмурамидазы (MCT3413553.1), поэтому можно предположить, что обнаруженный в ходе исследований белок способен осуществлять гидролиз пептидогликанов клеточных стенок патогенной микрофлоры, проявляя лизоцимоподобное действие. Протеомный анализ также показал наличие уникального белка *L. helveticus* NK1 (MBU5981525) в со-культуратах с *P. aeruginosa* – УДФ-глюкозо-4-эпимеразы GALE, являющегося ключевым ферментом синтеза полисахаридов у бактерий.

Сравнение метаболитных профилей культуральной среды, инокулированной монокультурой *L. helveticus* NK1 и при сокультивировании с *P. aeruginosa* 25668 представлено в виде тепловой карты иерархической кластеризацией (рис. 32).

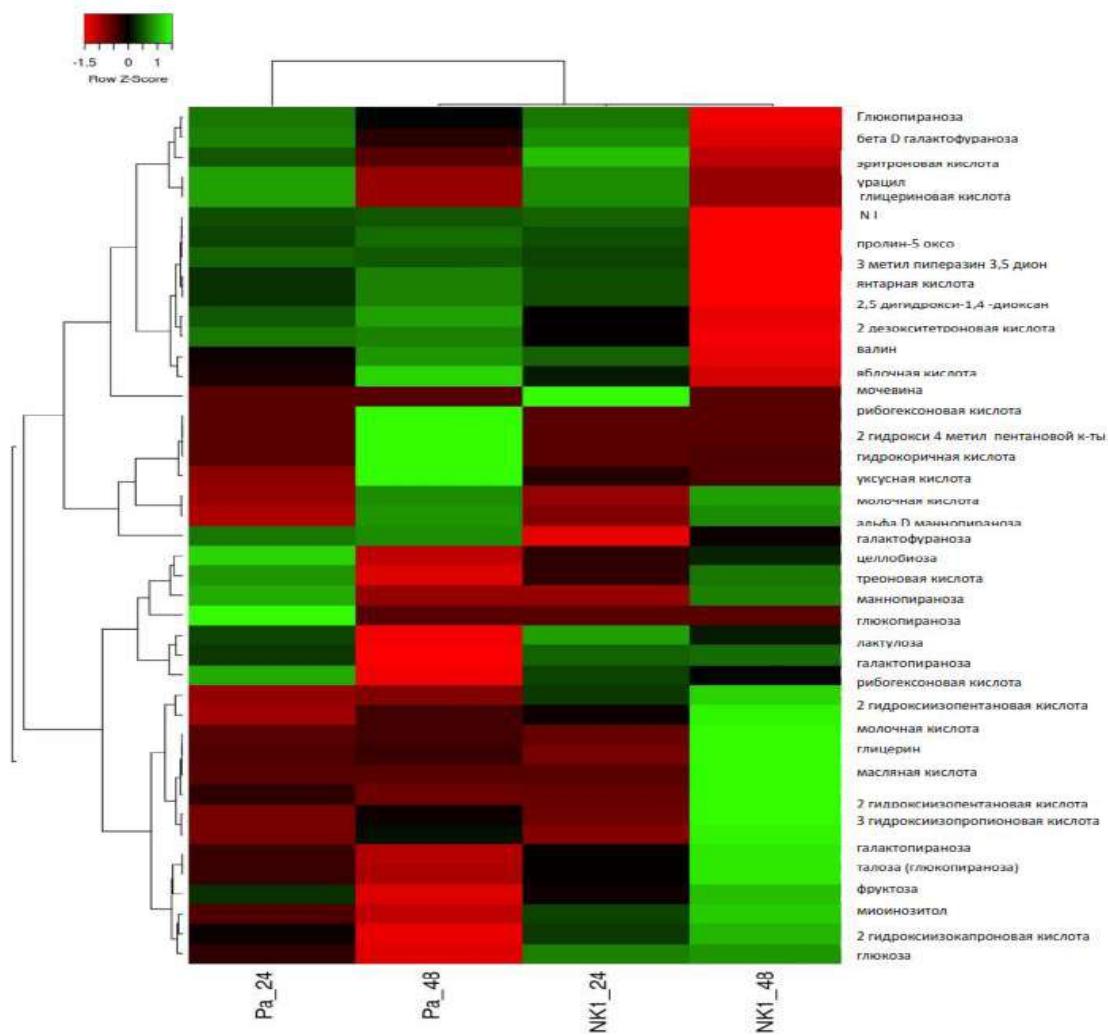


Рисунок 32 – Метаболитные профили культуральных сред, инокулированных монокультурой *L. helveticus* NK1 и при сокультивировании с *P. aeruginosa* 25668

Примечание: NK1_24 и NK1_48 – КЖ монокультуры *L. helveticus* NK1 через 24 и 48 часов культивирования; Pa_24 и Pa_48 КЖ при сокультивировании *L. helveticus* NK1 и *P. aeruginosa* 25668 через 24 и 48 часов

При сокультивировании в течение 24 ч в ростовой среде обнаружено увеличение относительного содержания различных углеводов – маннопиранозы, галактопиранозы, глюкофуранозы, целлобиозы и др., по сравнению с монокультурой *L. helveticus* NK1, что может говорить об усилении синтеза ЭПС в присутствии *P. aeruginosa*. Через 48 ч возрастало содержания органических кислот, в том числе малата, сукцинат, рибоновой, арабиновой, гидрокоричной кислот. Увеличение доли интермедиатов цикла Кребса, таких как малат и сукцинат, в ростовой среде свидетельствует об усилении метаболической

активности *L. helveticus* NK1 в присутствии конкурента. Обнаруженная гидрокоричная (бета-фенилпропионовая) кислота играет ключевую роль в ответных реакциях на стресс, включая присутствие конкурента, обладает антимикробными и антиоксидантными свойствами.

Были идентифицированы такие органические кислоты как лактат и ацетат, однако их относительное содержание было сопоставимым как в монокультуре *L. helveticus*, так и при сокультивировании с синегнойной палочкой. Также при сокультивировании в среде обнаружено более высокое содержание валина и 2-гидроксизовалериановой, 2-гидроксизокапроновой и 2-гидрокси-3-метилвалериановой кислот, которые образуются в результате метаболизма L-валина, L-изолейцина и L-лейцина в клетках МКБ и оказывают ингибирующее действие на рост патогенных грамотрицательных бактерий, стимулируя при этом рост *Lactobacillaceae* и *Bifidobacteriaceae*, причем, согласно литературным данным, 2-гидроксизовалериановая кислота обладает более выраженным стимулирующим эффектом [176, 177]. Самое высокое относительное содержание 2-гидроксизовалериановой и 2-гидроксизокапроновой кислот отмечено через 48 ч сокультивирования.

Таким образом, в присутствии *P. aeruginosa* у штамма *L. helveticus* NK1 активно синтезировались белки, вовлеченные в защиту от стресса и ассоциированные с клеточной стенкой, усиливались метаболические пути, позволяя усиливать клеточный рост, что подтверждает снижение рисков развития *P. aeruginosa* при использовании заквасочных микроорганизмов.

Известно, что *P. aeruginosa* способна продуцировать сидерофоры – низкомолекулярные вещества, способные связывать железо и солюбилизировать его [1]. Лактобациллы, в отличие от большинства микроорганизмов, не нуждаются в железе для роста, и сидерофоры *P. aeruginosa* не представляют угрозы их развитию. При этом органические кислоты, являющиеся основными метаболитами МКБ, обладают хелатирующими свойствами и способны связывать из субстрата железо, необходимое для роста *P. aeruginosa* [178]. Кроме того, антимикробное действие бактерий рода *Lactobacillus* может быть связано с

индукцией ферментов, разрушающих пептидогликан клеточной стенки грамотрицательных бактерий [150]. Микроскопические исследования продемонстрировали, что реакция патогенов на ингибирующее действие лактобацилл при совместном культивировании проявляется в возрастании доли лизированных и покоящихся клеток, разрушении клеточных органелл. У самих лактобацилл при этом наблюдалось увеличение толщины клеточной стенки и образование на ее поверхности дополнительных слоев [179].

В результате исследований показана различная степень антагонистической активности представителей коллекционных производственно-значимых МКБ по отношению к штаммам *P. aeruginosa* коллекционного и дикого типа. Подтверждена высокая антагонистическая активность грибковой кефирной закваски, коллекционных лактобацилл *L. helveticus* Ббн4, *L. helveticus* NK1, и их метаболитов относительно условно-патогенных бактерий *P. aeruginosa*, как коллекционного типового штамма, так и выделенных штаммов. Результаты исследования позволяют рассматривать МКБ и грибковую кефирную закваску в качестве перспективных antimикробных агентов относительно такого сложного патогена, как *P. aeruginosa*, в том числе для разработки продуктов функционального питания.

3.4 Изучение эффективности элиминации *P. aeruginosa* в зависимости от температурно-временных параметров среды при исследовании режимов пастеризации и хранения молока.

*3.4.1 Изучение эффективности элиминации штаммов *P. aeruginosa* при режиме пастеризации молока (76±2) °C 20 сек*

Исследование проводили для коллекционного штамма *P. aeruginosa* и выделенных штаммов *P. aeruginosa* 47 и *P. aeruginosa* 42. Исходное количество клеток до термического воздействия соответствовало $5,3 \times 10^3$ - $7,1 \times 10^3$ КОЕ/см³.

Как показали проведенные исследования, сразу после термической обработки образцов для всех изученных штаммов при высефе на питательную среду бактериальный рост отсутствовал. Однако, через 7 и 14 суток холодильного хранения, в опытных образцах были обнаружены жизнеспособные клетки синегнойной палочки. Изменение количества жизнеспособных клеток у штаммов *P. aeruginosa* в хранении показано на рисунке 33.

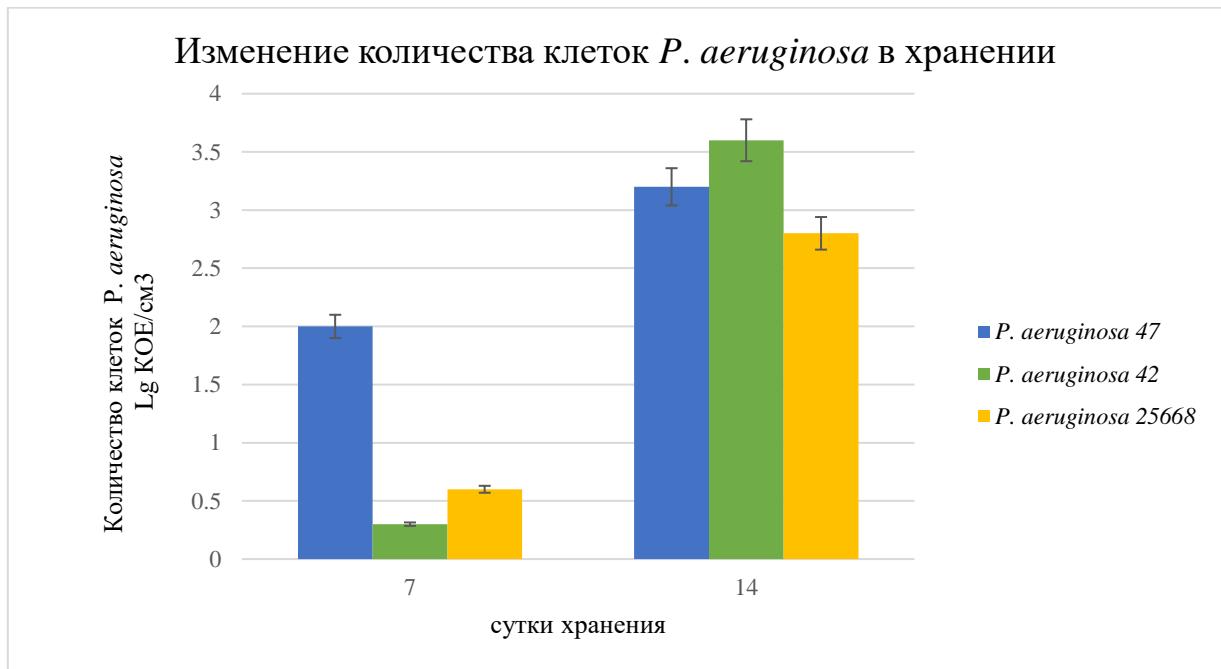


Рисунок 33 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* после термической обработки (76 ± 2) °C на 7-е и 14-е сутки хранения

Через 7 суток холодильного хранения штамм *P. aeruginosa* 47 показал рост колоний в количестве $7,6\times10^1$ КОЕ/см³, с дальнейшим увеличением количества клеток к 14 суткам – до $4,8\times10^3$ КОЕ/см³. После термической обработки молока, контаминированного *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* 25668 через 7 суток холодильного хранения обнаруживались единичные колонии. Через 14 суток количество жизнеспособных клеток возрастало до $3,1\times10^3$ КОЕ/см³ для *P. aeruginosa* 42 и $2,8\times10^2$ КОЕ/см³ для *P. aeruginosa* 25668. Таким образом, при данном режиме термической обработки, часть клеток *P. aeruginosa* утратила способность к росту непосредственно после термошока, но сохранила

жизнеспособность и способность к реактивации и росту при холодильном хранении.

Количество клеток, образующих колонии к 14 суткам холодильного хранения, у обоих выделенных штаммов было примерно одинаково. При этом для штамма *P. aeruginosa* 42 можно констатировать более длительный восстановительный период по сравнению с *P. aeruginosa* 47. В проведенных ранее исследованиях, штамм *P. aeruginosa* 47 показал большую устойчивость к антибиотикам по сравнению с коллекционным штаммом и изолятом *P. aeruginosa* 42 [145], а также продемонстрировал сохранение жизнеспособности при воздействии сильных дезинфицирующих средств – анолита с добавлением ПАВ окиси дециламина и окиси алкилдиметиламина [74]. У *P. aeruginosa* 47 можно также предположить большую термотолерантность, так как восстановительный постстрессовый период у него был менее продолжительным. Результаты, полученные для коллекционного штамма *P. aeruginosa* 25668, очень похожи на результаты для *P. aeruginosa* 42, с той разницей, что к 14 суткам количество жизнеспособных клеток *P. aeruginosa* 25668 было на 1 порядок меньше, чем у диких штаммов, что может говорить о меньшей термотолерантности у типового коллекционного штамма в сравнении с изолятами дикого типа.

Таким образом, показано, что даже при незначительном уровне исходной контаминации молока *P. aeruginosa* ($N \times 10^3$ КОЕ/см³), режим термической обработки (76±2) °C 20 секунд не гарантировал полной элиминации бактериальных клеток. Через 7 суток холодильного хранения у всех трех культур *P. aeruginosa* отмечена реактивация некультивируемых клеток с восстановлением способности к росту и дальнейшим увеличением титра к 14 суткам холодильного хранения. Из трех изученных штаммов, *P. aeruginosa* 47 наиболее быстро восстанавливал способность к образованию колоний на плотных средах, что позволяет высказать предположение об эффективно работающих белках теплового шока; требующее, однако, дальнейшего подтверждения.

Для определения временных параметров эффективной элиминации *P. aeruginosa* при температуре (76±2) °C, молоко, контаминированное штаммами *P.*

aeruginosa, подвергалось термическому воздействию в течение 5 минут, 10 минут и 15 минут. Увеличение времени воздействия до 5 минут и более, при температуре (76 ± 2) °C, привело к эффективной элиминации штаммов – на 7 и 14 сутки холодильного хранения рост не наблюдался. Таким образом, к эффективной элиминации *P. aeruginosa* при (76 ± 2) °C привело значительное увеличение времени воздействия – до 5 минут и более.

3.4.2 Изучение эффективности элиминации штаммов *P. aeruginosa* при режиме пастеризации молока (72 ± 2) °C.

Эффективность элиминации *P. aeruginosa* при температуре (72 ± 2) °C определяли при времени выдержки 20, 40, 60 сек; 5, 10 и 15 мин. Результаты изучения эффективности пастеризации молока при температуре (72 ± 2) °C, при времени выдержки 20, 40 и 60 секунд, контаминированного штаммом *P. aeruginosa* 47, представлены на рисунках 34, 35.

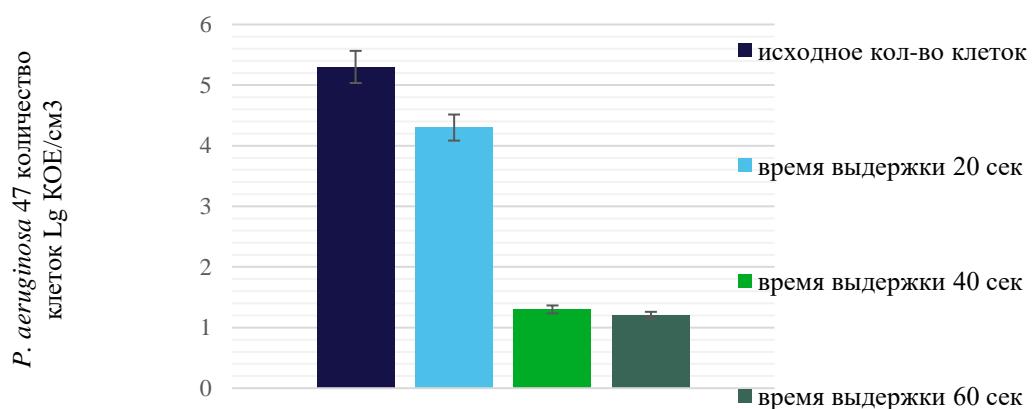


Рисунок 34 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 47 после термической обработки (72 ± 2) °C

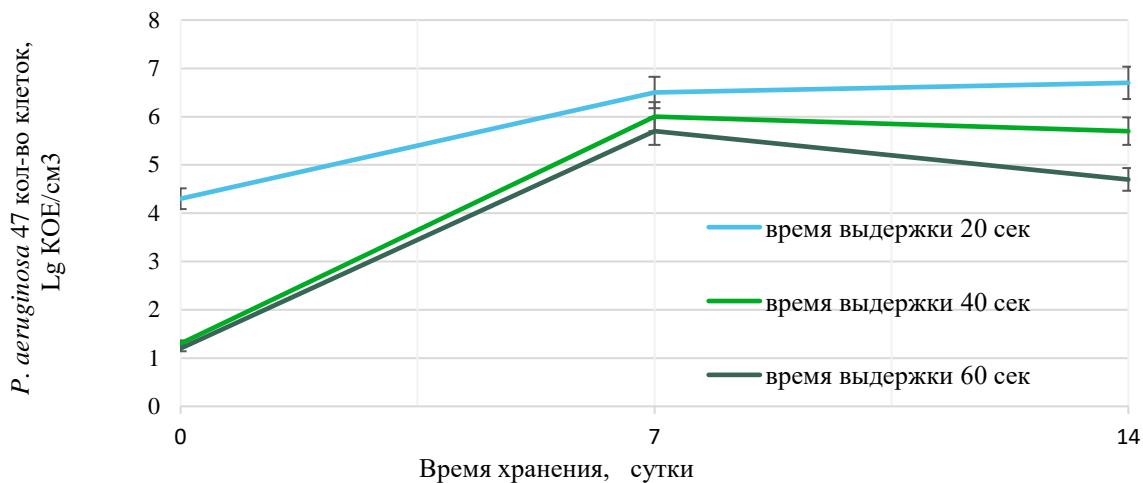


Рисунок 35 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 47 после термической обработки (72±2) °C в хранении

Как показали проведенные исследования, жизнеспособные клетки, образующие колонии на питательном агаре при исходном количестве $1,8 \times 10^5$ КОЕ/см³ были выявлены сразу при всех трех периодах выдержки при температуре (72±2) °C. Наименее эффективным для элиминации патогена был режим (72±2) °C 20 секунд – количество клеток штамма *P. aeruginosa* 47 снизилось только на 1 порядок: с $1,8 \times 10^5$ КОЕ/см³ до $1,9 \times 10^4$ КОЕ/см³. Через 7 суток холодильного хранения наблюдалось увеличение количества клеток – до $3,5 \times 10^6$ КОЕ/см³, с незначительным возрастанием до $5,4 \times 10^6$ КОЕ/см³ к 14 суткам.

При времени выдержки 40 секунд и 60 секунд, количество клеток снизилось на 4 порядка и составило в обоих вариантах $1,8 \times 10^1$ КОЕ/см³. На 7-е сутки холодильного количества клеток увеличилось – до $3,0 \times 10^6$ КОЕ/см³ и $5,7 \times 10^5$ КОЕ/см³ при 40 и 60 секундах выдержки, соответственно. Таким образом, ни при одном из данных режимов не происходило полной элиминации *P. aeruginosa* 47; при 20-секундной выдержке снижение количества клеток было самым незначительным. На 7 сутки холодильного хранения во всех вариантах наблюдалось существенное нарастание количества клеток – до значений, превышающих исходный, с постепенным выходом на плато к 14 суткам, что подтверждает возможность порчи готовой продукции в хранении.

Результаты изучения эффективности пастеризации молока, контаминированного выделенным штаммом *P. aeruginosa* 42, при температуре (72 ± 2) °С и времени выдержки 20, 40 и 60 секунд, представлены на рисунках 36,37.

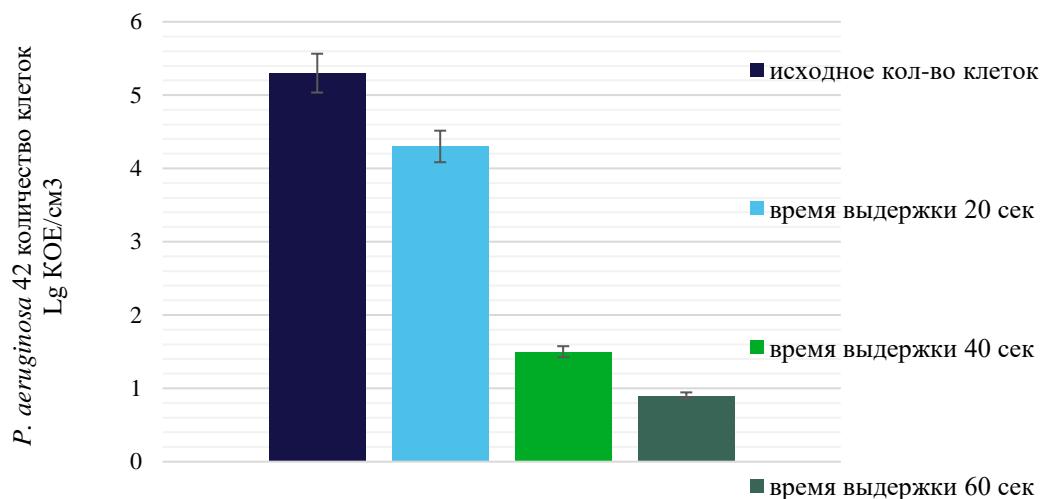


Рисунок 36 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 42 после термической обработки (72 ± 2) °С

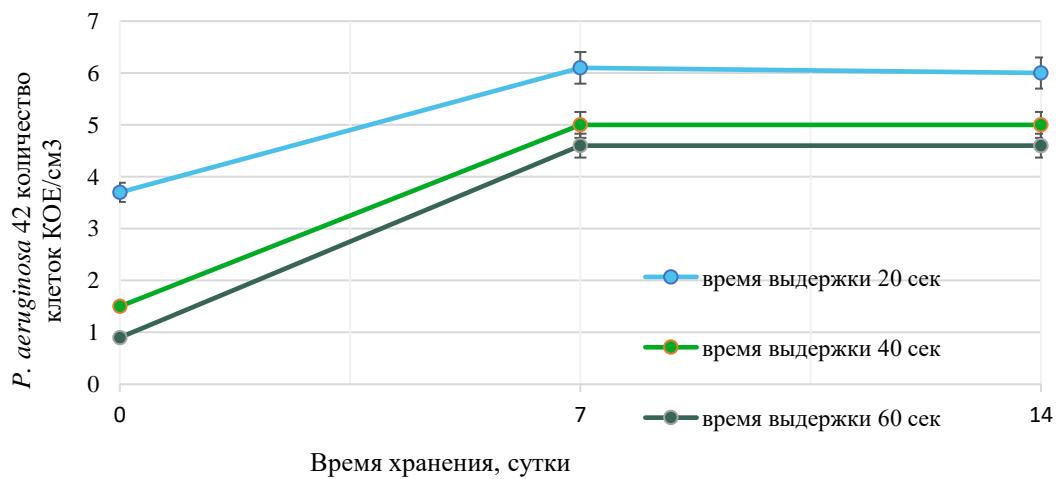


Рисунок 37 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 42 после термической обработки (72 ± 2) °С в хранении

У штамма *P. aeruginosa* 42 обнаружен рост сразу после термического воздействия (72 ± 2) °C. При времени выдержки 20 секунд количество клеток снизилось с $2,2\times10^5$ до $5,0\times10^4$ КОЕ/см³. 40 секундная выдержка снизила количество клеток на 4 порядка – до $2,8\times10^1$ КОЕ/ см³. При 60-секундной выдержке обнаруживался рост единичных колоний. К 7 суткам количество клеток увеличивалось и составило $1,3\times10^6$ КОЕ/ см³, $1,0\times10^5$ КОЕ/см³, $3,7\times10^4$ КОЕ/см³ при времени выдержки 20, 40 и 60 секунд соответственно, с выходом на плато к 14 суткам холодильного хранения ($1,3\times10^6$, $1,4\times10^5$, $3,6\times10^4$ КОЕ/см³ при времени выдержки 20, 40 и 60 секунд, соответственно).

Результаты изучения эффективности пастеризации молока, контаминированного коллекционным штаммом *P. aeruginosa* 25668, при температуре (72 ± 2) °C и времени выдержки 20, 40 и 60 секунд, представлены на рисунках 38, 39.

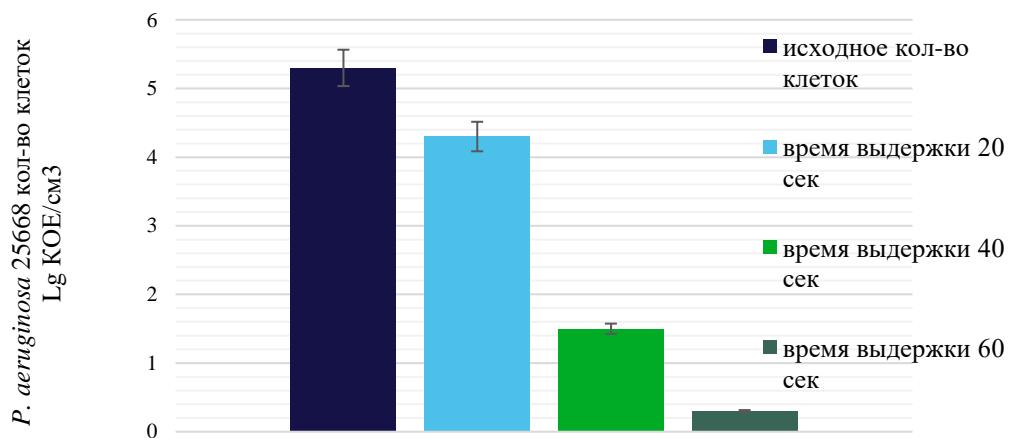


Рисунок 38 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 25668 после термической обработки (72 ± 2) °C

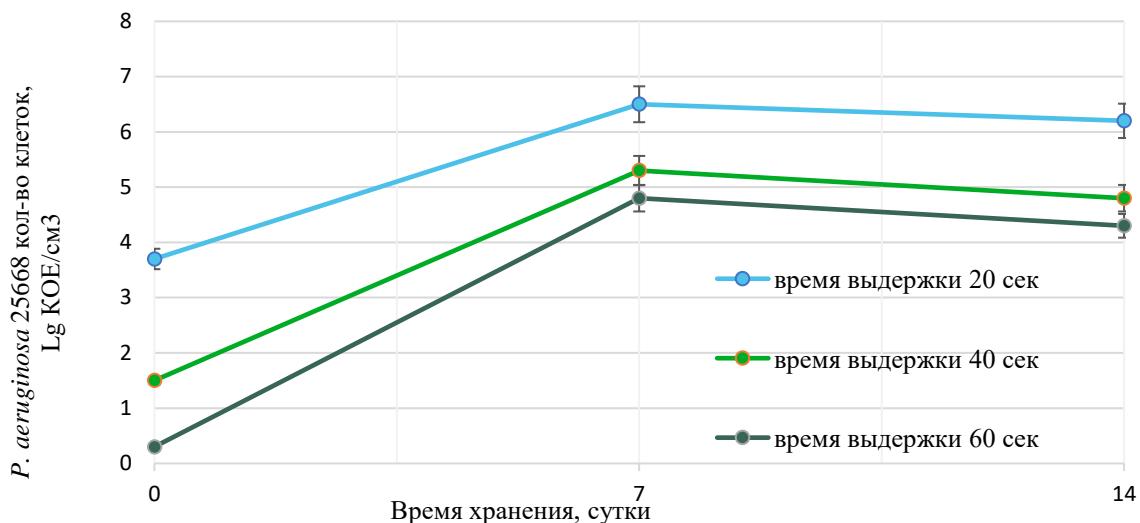


Рисунок 39 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 25668 после термической обработки (72 ± 2) °C в хранении

У типового штамма *P. aeruginosa* 25668 также наблюдался рост сразу после термического воздействия. При времени выдержки 20 секунд, количество клеток снизилось с $1,9 \times 10^5$ до $5,3 \times 10^4$ KOE/cm³. 40 секундная выдержка снизила количество клеток на 4 порядка – до $1,8 \times 10^1$ KOE/cm³. При 60-секундной выдержке обнаруживался рост единичных колоний. К 7 суткам холодильного хранения количество клеток увеличилось и составило $3,3 \times 10^6$ KOE/cm³, $1,8 \times 10^5$ KOE/cm³, $7,7 \times 10^4$ KOE/cm³ при времени выдержки 20, 40 и 60 секунд соответственно, с выходом на плато и некоторым снижением количества клеток к 14 суткам холодильного хранения ($1,7 \times 10^6$, $3,4 \times 10^5$, $1,6 \times 10^4$ KOE/cm³).

К 14 суткам холодильного хранения в опытных пробирках наблюдались визуальные признаки порчи – изменение цвета, пленочный рост (рисунок 40).

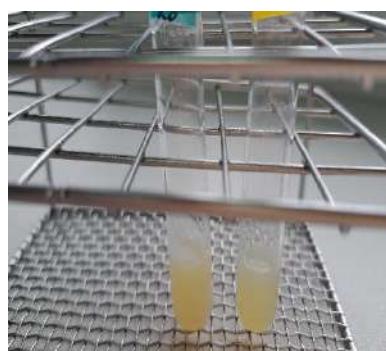


Рис. 40 – Визуальные признаки порчи молока на 14 сутки холодильного хранения при режиме обработки (72 ± 2) °C 60 сек

Таким образом, термическая обработка при (72 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ при кратковременной выдержке (20, 40 и 60 секунд) была недостаточно эффективна для элиминации *P. aeruginosa* – жизнеспособные клетки выявлялись сразу после обработки.

Для определения временных параметров эффективной элиминации *P. aeruginosa* при температуре (72 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ молоко, контаминированное штаммами *P. aeruginosa*, подвергалось термическому воздействию в течение 5, 10 и 15 минут. Режим воздействия 5 и 10 минут при данной температуре не исключал сохранение единичных жизнеспособных форм (1–3 КОЕ/см³) и способности их к реактивации в течение срока хранения 14 суток. Таким образом, критическим параметром эффективности стало время: 15-минутная выдержка при (72 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ обеспечивала полную элиминацию *P. aeruginosa*.

3.4.3 Изучение эффективности элиминации штаммов *P. aeruginosa* при режиме пастеризации молока (85 ± 2) $^{\circ}\text{C}$

Для определения временных параметров эффективной элиминации *P. aeruginosa* при температуре (85 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ молоко, контаминированное штаммами *P. aeruginosa* 25668, *P. aeruginosa* 47, *P. aeruginosa* 42 подвергалось термическому воздействию в течение 20 сек, 10 мин и 15 минут. Сразу после термического воздействия рост бактерии не обнаруживался. Однако, на 7 и 14 сутки холодильного хранения у всех трех штаммов выявлялись единичные жизнеспособные колонии. Таким образом, кратковременная (20 сек) выдержка при (85 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ не исключала сохранения единичных жизнеспособных форм, способных восстанавливаться при холодильном хранении.

При 10 мин и 15 мин выдержке при данной температуре жизнеспособные формы обнаружены не были в течение всего срока хранения. Таким образом, можно предположить, что при принятых режимах термической обработки молока, время выдержки оказывает большее значение на элиминацию *P. aeruginosa*, чем температура.

Согласно литературным данным по изучению выживаемости *P. aeruginosa* при термическом воздействии, прогрев молока в течение 30 минут при

температуре 63,5 °C, при исходной контаминации синегнойной палочки $5,8 \times 10^5$ КОЕ/см³, снижал количество клеток на 4 логарифмические единицы, при этом значительная часть клеток оставалась метаболически активной, не будучи при этом способна образовывать колонии на плотной среде [180]. 30% штаммов *P. aeruginosa*, выделенных из молока и мягкого сыра в Багдаде, после термического воздействия (72±2) °C в течение 16 сек восстанавливали свою жизнеспособность уже через 24 ч [16].

При режимах низкотемпературной и высокотемпературной пастеризации (72±2) °C и (80±2) °C с выдержкой 10–20 сек, единичные клетки *P. aeruginosa* сохраняли способность к делению и реактивации после термической обработки при высокой дозе заражения (более 10⁶ КОЕ/см³) [109]. Наши данные показали более высокую скорость восстановления клеток у штамма дикого типа *P. aeruginosa* 47, по сравнению с типовым коллекционным штаммом, что показывает вероятность наличия более высокого уровня термотолерантности у данного штамма, циркулирующего на производстве. Развитие адаптивного ответа на термический стресс, вероятно, является штаммоспецифическим признаком, и большая термотолерантность у *P. aeruginosa* 47 может предположительно определяться способностью к накоплению большего количества белков теплового шока. Таким образом, подтверждаются имеющиеся в литературе данные о способности отдельных клеток синегнойной палочки выдерживать тепловую обработку, предусмотренную технологическими режимами (72±2) °C 20 сек, 40 сек, 60 сек, 5 мин и 10 мин; (76±2) °C 20 сек, (85±2) °C 20 сек [180].

В целом, любая реакция на стрессорные факторы, в том числе тепловой шок, у бактерий приводит к схожим результатам адаптации – переходу клеток в состояние покоя [113]. Бактерии замедляют свой метаболизм, что выражается в остановке роста и деления клеток, а также в снижении экспрессии генов, отвечающих, в том числе, за биосинтез факторов вирулентности, в пользу выживания. Для представителей рода *Pseudomonas* показано образование покоящихся форм цистоподобного типа [181]. После прогрева клеточных суспензий *P. aeruginosa* при 70 °C в течение 5 мин развивались точечные

микроколонии (мКОЕ) с $d \leq 0,5$ мм, трудно поддающиеся учету и выявляющиеся при пролонгированной инкубации (7–14 суток, в ряде случаев до 1 месяца). Эффективность реверсии микроколоний к нормальному фенотипу при пересевах на агаризованные среды составляла не больше 20% [182,183].

В нашем опыте после термического стресса на плотной среде рост культуры был также представлен в основном беспигментными точечными колониями.

При влиянии различных стрессовых факторов, исследователи констатируют наличие сходных морфологических изменений микробных клеток, которые обеспечивают их функциональную полноценность и являются универсальными признаками механизмов адаптации [184, 185].

При микроскопии клеток *P. aeruginosa* после воздействия высокой температуры отмечается нетипично удлиненная форма клеток, иногда с образованием цепочек, что может свидетельствовать о наличии белков, стимулирующих термотолерантность [186]. Наши исследования также показали изменение морфологии клеток после термического воздействия (удлинение клеток) (рисунок 41), по сравнению с исходными культурами синегнойной палочки (рисунок 42).



Рисунок 41 – Клетки *P. aeruginosa* 47 после воздействия термической обработки $(72 \pm 2)^\circ\text{C}$ 60 сек

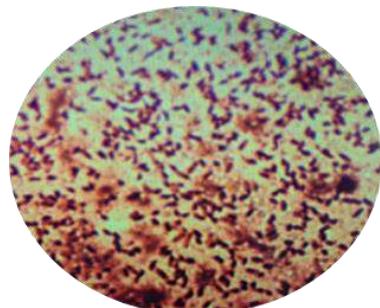


Рисунок 42 – Клетки *P. aeruginosa* 47 без термической обработки

Ответом на термический стресс у бактерий является способность синтезировать так называемые белки теплового шока – клеточные дезагрегазы, способные солюбилизировать и репарировать поврежденные агрегированные белки, тем самым повышая термотолерантность микроорганизмов [114].

У бактерий наиболее известны две дезагрегазы, защищающие клетки от разрушительного действия высоких температур – ClpB и ClpG. ClpG оказывает более сильное репарирующее действие и способна обеспечить повышенную термостойкость бактерий. У *P. aeruginosa* уровень ClpG повышается во время стационарной фазы роста [187]. Возможно, именно ClpG дезагрегаза позволяет *P. aeruginosa* выживать при температуре пастеризации (72 ± 2) °С. Приобретение дополнительной дезагрегазы – ClpG_{GI} – способствовало широкому распространению в мире популяции клона *P. aeruginosa* C, у которого она была выявлена [46]. ClpG_{GI}, по-видимому, не является видоспецифичным белком, и присутствует в изолятах неродственных представителей грамотрицательных бактерий, что позволяет предположить его недавнее приобретение *P. aeruginosa*, что может усилить терморезистентность данного микроорганизма, особенно его природных форм [114]. Показано, что кодирующие ClpG гены передаются горизонтальным переносом, вследствие чего возможно быстрое распространение резистентности к экстремальным температурам в микробной среде, что может представлять угрозу установленным процедурам термических обработок, в том числе применяемым в пищевой промышленности [113].

В результате проведенных исследований подтверждаются литературные данные о способности отдельных клеток синегнойной палочки выдерживать тепловую обработку, предусмотренную отдельными технологическими режимами [180].

Возможность *P. aeruginosa* противостоять режимам пастеризации молока необходимо учитывать при разработке и коррекции температурно-временных параметров термической обработки на молочных производствах, особенно при

существовании риска контаминации технологических цепочек *P. aeruginosa*. Наиболее высокие риски существуют для сырodelия – температура (72±2)°С недостаточно эффективна для элиминации *P. aeruginosa*; а психротрофность позволяет ей развиваться в условиях холодильного хранения. Менее значимы риски при производстве кисломолочных продуктов.

3.5 Изучение эффективности действия биоцидных препаратов на элиминацию штаммов *P. aeruginosa*

В качестве высокоэффективных хлорактивных дезинфициантов на молочных предприятиях достаточно широко используют средства на основе дихлоризоциануата натрия (ДХЦН) или натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты, обладающие широким спектром антимикробного действия, оцениваемые порой на производствах как «образцовые» биоциды [126]. Концентрации растворов ДХЦН также контролируются по активному хлору (АХ) и рекомендованы к применению органами Роспотребнадзора на предприятиях молочной промышленности в следующих режимах: содержание АХ не менее 150 мг/дм³ (0,015 %); экспозиция не менее 10 минут; температура (20-40) °С.

При оценке *in vitro* чувствительности штаммов *P. aeruginosa* к действию дезинфицирующего средства (нейтральный анолит), в том числе с добавлением ПАВ, обнаружены различия в эффективности действия дезинфицирующих растворов на штаммы *P. aeruginosa*.

Так, для коллекционного тест-штамма *P. aeruginosa* 25668 и выделенного штамма *P. aeruginosa* 42 во всех вариантах наблюдалась отсутствие роста, что подтверждает эффективность используемых дезинфицирующих растворов. Однако, штамм *P. aeruginosa* 47, ранее проявивший самую высокую чувствительность к действию бактериофага, показал большую жизнеспособность при воздействии анолита с добавлением поверхностно-активного вещества (ПАВ) окиси дециламина и окиси алкилдиметиламина, а после третьего пассажа обнаружил рост как после воздействия чистого анолита, так и растворов ДХЦН с содержанием АХ 150 мг/дм³. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Ингибирующее действие дезинфицирующих растворов на рост штамма *P. aeruginosa* 47

Дезинфицирующий раствор	Наличие/отсутствие роста		
	1 пассаж	2 пассаж	3 пассаж
Анолит	-	-	+
анолит + окись дециламина	-	+	+
анолит + окись алкилдиметиламина	-	+	+
ДХЦН 150 мг/дм ³	-	-	+
ДХЦН 585 мг/дм ³	-	-	-

Примечание: «+» наличие роста «-» отсутствие роста

Эффективное биоцидное действие отмечено только при воздействии анолита с добавлением натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты (ДХЦН) повышенной концентрации 585 мг/дм³. После воздействия окиси дециламина (№2-3) при пересеве на твердую питательную среду отмечался типичный для псевдомонад хороший рост, рост штамма после 3-го пересева в вариантах №1-3 («чистый» анолит) и 3-3 (р-р ДХЦН 150 мг/дм) был слабее, со сниженной пигментацией. Можно предположить, что увеличение времени воздействия или концентрации действующего вещества могло бы усилить эффективность препарата, что подтверждается эффективным действием р-ра ДХЦН с концентрацией 585 мг/дм³.

Исходя из результатов исследования действия растворов с добавлением ПАВ на рост штамма *P. aeruginosa* 47, мы сравнили способность коллекционного и выделенных штаммов *P. aeruginosa* сохранять жизнеспособность непосредственно в растворе ПАВ аминоксида (0,03 % о.в.) через 24, 48 часов, 5 суток и 60 суток. Результаты по выживаемости представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Выживаемость штаммов *P. aeruginosa* в растворе ПАВ (КОЕ/см³)

Штамм \ Период	Количество клеток КОЕ/см ³				
	0 часов	24 часа	48 часов	5 суток	60 суток
<i>P. aeruginosa</i> 25668	$1,2 \times 10^7$	$1,3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
<i>P. aeruginosa</i> 47	$1,4 \times 10^7$	$2,0 \times 10^4$	$9,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	$2,6 \times 10^6$
<i>P. aeruginosa</i> 42	$2,2 \times 10^7$	$7,8 \times 10^4$	$5,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^7$	$2,9 \times 10^5$

Все штаммы сохраняли жизнеспособность в ПАВ без добавления каких-либо дополнительных питательных веществ до 60 суток. Количество жизнеспособных клеток коллекционного штамма через 24 часа снижалось на 1 порядок и при дальнейшем культивировании сохранялось примерно на одном уровне. У выделенных штаммов количество жизнеспособных клеток через 24 часа инкубации в ПАВ снижалось на 3 порядка – до 10^4 .

Через 48 часов количество клеток выделенных штаммов выросло и было даже несколько выше, чем у контрольного, увеличиваясь на порядок к 5-м суткам. Через 60 суток у выделенных штаммов дикого типа незначительно снижалось количество клеток – до 10^6 у *P. aeruginosa* 47 и 10^5 у *P. aeruginosa* 42, не изменяясь у коллекционного штамма.

Были отмечены культуральные и морфологические изменения изученных штаммов в процессе адаптации к культивированию в ПАВ. На рисунке 43 представлен вид колоний *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* 47 через 24 ч инкубирования в ПАВ.

Рисунок 43 – Колонии *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* 47 через 24 часа инкубирования в ПАВ

При посеве на твердую питательную среду наблюдали колонии необычной формы – для штамма *P. aeruginosa* 47 - слипшиеся по две, для *P. aeruginosa* 42 – деформированные в форме иероглифов, что подтверждает данные о фенотипических изменениях, сопровождающих процессы адаптации к неблагоприятным условиям. У коллекционного штамма изменений формы колоний не наблюдалось (рисунок 44).



Рисунок 44 – Колонии *P. aeruginosa* 25668 через 24 часа инкубирования в ПАВ

При посеве на вторые сутки, при увеличении титра клеток, колонии *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* 47 приобрели нормальную форму, что может свидетельствовать о быстрой адаптации к изменившимся условиям культивирования.

Через 48 ч инкубирования при посеве разведений *P. aeruginosa* 25668 на плотную питательную среду мы наблюдали выраженное слизеобразование, с его дальнейшим усилением к 60-м суткам. Вид колоний *P. aeruginosa* 25668 через 60 суток инкубирования в ПАВ представлен на рисунке 45.



Рисунок 45 – Вид колоний *P. aeruginosa* 25668 на агаре для псевдомонад через 60 суток инкубирования в ПАВ

К 60 суткам у штамма *P. aeruginosa* 25668 наблюдалось усиление как пигментации, так и слизеобразования, колонии были окружены выраженной слизистой капсулой.

Колонии *P. aeruginosa* 42 представлены на рисунке 46.



Рисунок 46 – Вид колоний *P. aeruginosa* 42 на агаре для псевдомонад через 60 суток инкубирования в ПАВ

У *P. aeruginosa* 42 колонии были окружены слизистой капсулой, и фенотипически были схожи с колониями контрольного штамма, но пигментирование было несколько слабее.

На рисунке 47 представлены колонии штамма *P. aeruginosa* 47 на агаре для псевдомонад после 60 суток инкубирования в ПАВ.



Рисунок 47 – Вид колоний *P. aeruginosa* 47 на агаре для псевдомонад через 60 суток инкубирования в ПАВ

У штамма *P. aeruginosa* 47 слизистая капсула была более выражена, чем у *P. aeruginosa* 42. У *P. aeruginosa* 47 снизилась пигментация, наблюдался рост множества мелких колоний, объединенных слизистыми капсулами, напоминающими матрикс биопленки. Надо отметить, что снижение пигментации данный штамм показал и после воздействия «чистого» анолита и раствора дихлорцианурата с содержанием активного хлора 150 мг/дм³.

В результате стрессовых воздействий, адаптируясь к неблагоприятным условиям инкубирования, синегнойная палочка демонстрирует изменение культуральных и морфологических свойств, в том числе уменьшение размеров колоний, что предположительно связано с изменением питательных потребностей, усиление слизеобразования [188]. Описано округление клеток и уменьшение их размеров, или наоборот, увеличение продольных и поперечных размеров клеток почти в 2 раза [179]. На рисунке 48 представлены морфологические изменения клеток *P. aeruginosa* 47, по сравнению с контролем (рисунок 49).

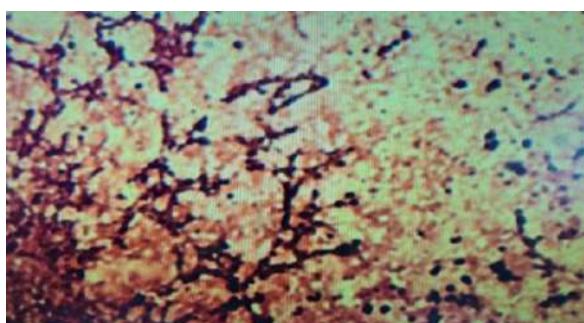


Рисунок 48 – Морфология клеток *P. aeruginosa* 47 после 60 суток инкубирования в ПАВ

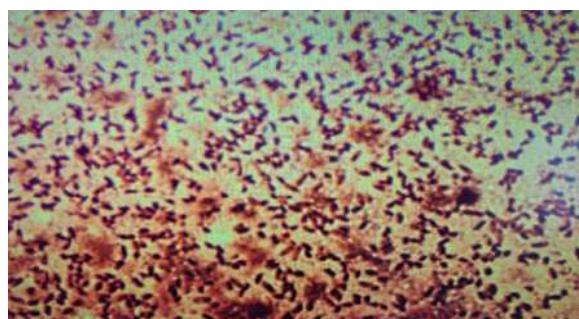


Рисунок 49 – Морфология клеток *P. aeruginosa* 47 после инкубирования в питательном бульоне

По литературным данным, при микроскопии клеток *P. aeruginosa* после воздействия высокой температуры, являющейся мощным фактором стресса, отмечалась их нетипичная удлиненная форма, с образованием цепочек, что может свидетельствовать о наличии белков, стимулирующих термотолерантность [179]. При микроскопии колоний *P. aeruginosa* после 60 суток культивирования в ПАВ также обнаружены морфологические изменения, причем наиболее

выраженные у штамма *P. aeruginosa* 47 - клетки имели нетипичную форму с тенденцией к увеличению в размерах и образованию цепочек.

Известно, что для *P. aeruginosa* характерна природная резистентность к ряду антимикробных субстанций. Приобретенные механизмы устойчивости являются штаммоспецифичными и, как правило, возникают в результате изменения структуры и функций существующих в клетке белков или синтеза новых [101]. На предприятии, откуда были выделены штаммы псевдомонад, регулярно проводилась мойка и дезинфекция оборудования с применением дезинфицирующих, в т.ч. на основе ДХЦН. Возникновение устойчивых форм среди циркулирующих штаммов весьма вероятна, особенно исходя из способности *P. aeruginosa* использовать в качестве источников питания широкий круг веществ - четвертичные аммониевые, фенолсодержащие соединения, формальдегид, фурацилин и детергенты [1], что позволяет ей сохранять жизнеспособность в растворах дезинфицирующих средств. Зачастую устойчивость микроорганизмов к дезинфицирующим средствам возникает в результате нарушения рекомендаций по применению, в частности, занижения концентраций при приготовлении рабочих растворов или использования препаратов с истекшим сроком годности [189].

Под действием сниженных концентраций действующих биоцидных веществ происходит ускоренная селекция устойчивых форм, с возможностью возникновения перекрестной резистентности к биоцидным агентам другого класса [188]. Кроме того, степень устойчивости к антимикробным препаратам возрастает при увеличении численности популяции, что можно объяснить существованием механизма кворум-сенсинга. Добавление ПАВ к биоцидным средствам можно считать оптимизированной процедурой деконтаминации, позволяющей снизить поверхностное натяжение, улучшить смачивающую способность, обеспечивая более полный контакт действующих веществ с поверхностью, клеточными стенками микроорганизмов и легче удалять органические, неорганические и микробные загрязнения с технологического оборудования [79].

Однако с учетом возможной циркуляции на производстве псевдомонад, данная процедура может иметь неоднозначный эффект, с учетом высокого адаптивного потенциала бактерий данного вида, включая способность выживать и даже размножаться в растворах детергентов [179].

Таким образом, штаммы *P. aeruginosa*, выделенные на одном предприятии, отличались по чувствительности к действию дезинфектанта на основе нейтрального анолита с добавлением амфотерных ПАВ. Показана их высокая выживаемость в растворе ПАВ - аминоксида, сопровождающаяся изменениями в характере роста и морфологии клеток. Исследования эффективности дезинфицирующих средств, как правило, проводятся путем воздействия на тест-штаммы микроорганизмов. Применительно же к *P. aeruginosa* необходимо учитывать изменения метаболизма данной бактерии и возможность одновременной циркуляции на одном предприятии форм с различной чувствительностью к антимикробным факторам, вплоть до возможной резистентности. Важна разработка профилактических мероприятий, прежде всего использование эффективных систем очистки воды, с целью недопущения проникновения синегнойной палочки на предприятия, а также создание системы контроля эффективности используемых дезинфицирующих средств и их ротации для недопущения селекции устойчивых форм.

На основании проведенных исследований разработан СТО ВНИМИ (МР) № 00419785-084-2025 «Оптимизация контроля *Pseudomonas aeruginosa* при производстве молочной продукции». Предложен дополнительный контроль критических точек при риске контаминации *P. aeruginosa* (табл. 9).

Таблица 9 – Дополнительные рекомендуемые показатели при проведении микробиологического производственного контроля

Показатели, определяемые согласно существующим ДС	Дополнительные показатели при риске контаминации <i>P. aeruginosa</i>
Контроль используемой на производстве воды	
КМАФАнМ и БГКП (МУК 4.2.3963-23)	<i>P. aeruginosa</i> – не реже 1 раза в неделю. При получении результатов, подтверждающих присутствие в воде <i>P. aeruginosa</i> , после проведения санитарных мероприятий – ежедневный контроль в течение 2 недель, для подтверждения эффективности принятых мер
Контроль сырого молока	
В зависимости от объема принимаемого молока в соответствии с требованиями производственного контроля КМАФАнМ (ГОСТ 32901-2014) – показывает общую бактериальную обсемененность	<i>P. aeruginosa</i> – не влияет на величину показателя КМАФАнМ, но является значимой для качества молочных продуктов - способна размножаться при холодильном хранении и вырабатывать термостойкие ферменты
Контроль молока и сливок пастеризованных	
КМАФАнМ и БГКП – не реже 1 р/5 дней; стафиллококк – не реже 1 р/10 дней; сальмонеллы – не реже 1 р/месяц	<i>P. aeruginosa</i> – не реже 1 р/10 дней при подозрении на персистенцию бактерии на производстве
Эффективность пастеризации молока (после секции охлаждения)	
КМАФАнМ и БГКП КМАФАнМ и БГКП – контроль каждой партии, но не реже 1 раза в декаду	<i>P. aeruginosa</i> – не реже 1 раза в декаду
Контроль санитарно-гигиенического состояния участка фасовки и упаковки	
БГКП, плесневые грибы, дрожжи	<i>P. aeruginosa</i> – смывы с поверхностей
Контроль санитарно-гигиенического состояния помещений	
БГКП, плесневые грибы – в соответствии с программой производственного контроля	<i>P. aeruginosa</i> – смывы с поверхностей
Контроль санитарно-гигиенического состояния оборудования	
БГКП, КМАФАнМ (при наличии требований), плесени, дрожжи, термоустойчивые молочно-кислые палочки	<i>P. aeruginosa</i> – смывы с поверхностей, особое внимание уделяя труднодоступным участкам и шероховатым поверхностям, с учетом

	способности бактерии активно образовывать биопленки
Контроль образцов готовой продукции при холодильном хранении в течение рекомендуемого срока годности	
В соответствии с программой производственного контроля	<i>P. aeruginosa</i> – при подозрении на персистенцию бактерии на производстве
Контроль рабочих растворов моющих и дезинфицирующих средств	
Требования отсутствуют	<i>P. aeruginosa</i> – при подозрении на персистенцию бактерии на производстве – контроль рабочих растворов. Рекомендована ротация дезинфицирующих средств для недопущения селекции устойчивых форм. Комбинированные средства с совмещенными моюще-дезинфицирующими свойствами не рекомендованы, с учетом способности <i>P. aeruginosa</i> выживать и размножаться в растворах детергентов.
Контроль технологической одежды и рук персонала	
БГКП	<i>P. aeruginosa</i> – при подозрении на персистенцию бактерии на производстве

ВЫВОДЫ

1. Проведен обзор научно-технической литературы, освещающий вопросы метаболизма *P. aeruginosa*, персистенции бактерии на молочных производствах и в природных объектах, методических принципов идентификации *P. aeruginosa* и методов ее контроля;
2. Проведен мониторинг санитарно-гигиенического состояния молочных производств. Выделены и идентифицированы штаммы *P. aeruginosa*, персистирующие на предприятиях;
3. Изучены морфологические, культуральные и биохимические свойства исследованных штаммов. Показан более высокий уровень ферментативной активности у выделенных штаммов по сравнению с типовым. Установлена зависимость проявления протеолитической активности как от температуры инкубации, так и от штамма. Наименьшая протеолитическая активность определялась при температуре $(6\pm1)^0\text{C}$, наибольшая – при температуре $(37\pm2)^0\text{C}$.
4. Определена чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к действию биологических antimикробных агентов. Показана разная чувствительность к литическому действию синегнойного бактериофага и установлена нецелесообразность применения данного фага для предотвращения развития выделенных штаммов *P. aeruginosa*.

Подтверждена высокая антагонистическая активность *L. helveticus* Ббн4, *L. helveticus* NK1, грибковой кефирной закваски и их метаболитных комплексов относительно *P. aeruginosa*, как коллекционного, так и выделенных штаммов, что позволяет рассматривать данные штаммы и грибковую кефирную закваску в качестве перспективных antimикробных агентов.

Изучены возможные механизмы ингибирующего действия *L. helveticus* NK1 на *P. aeruginosa*. Показаны изменения в белковых и метаболитных профилях *L. helveticus* NK1 в присутствии в среде культивирования *P. aeruginosa*.

5. Изучена эффективность элиминации *P. aeruginosa* в зависимости от температурно-временных параметров среды при исследовании режимов пастеризации и хранения молока. Установлена эффективность элиминации клеток *P. aeruginosa* при температуре $(72\pm2)^\circ\text{C}$ и выдержке 15 мин. При выдержке 20, 40 и 60 секунд жизнеспособные клетки выявлялись сразу после обработки с нарастанием их количества при холодильном хранении. Доказана эффективность элиминации клеток *P. aeruginosa* при температуре $(76\pm2)^\circ\text{C}$ с выдержкой 5 минут и более. Показана возможность реактивации покоящихся форм *P. aeruginosa* при холодильном хранении при режиме пастеризации $(76\pm2)^\circ\text{C}$ 20 сек. Показана эффективность элиминации клеток *P. aeruginosa* при температуре $(85\pm2)^\circ\text{C}$ и выдержке 10 мин. Кратковременное (20 сек) воздействие при $(85\pm2)^\circ\text{C}$ не исключало сохранения единичных жизнеспособных форм, способных восстанавливаться при холодильном хранении.

6. Определена чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к действию биоцидных препаратов. Установлена разная чувствительность штаммов к средствам на основе ДХЦН. Эффективное биоцидное действие отмечено только при повышенной концентрации ДХЦН 585 мг/дм³. Показана высокая выживаемость клеток *P. aeruginosa* в растворе ПАВ – аминоксида.

7. На основании проведенных исследований разработан СТО ВНИМИ (МР) № 00419785-084-2025 «Оптимизация контроля *Pseudomonas aeruginosa* при производстве молочной продукции».

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лазарева А. В. и др. *Pseudomonas aeruginosa*: патогенность, патогенез и патология // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2015. – Т. 17. – №. 3. – С. 170-186.
2. Pang Z. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies // Biotechnology advances. – 2019. – Т. 37. – №. 1. – С. 177-192. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>.
3. Шепелин А. П., Сергеева А. Б., Полосенко О. В. Определение специфической активности питательных сред для *Pseudomonas aeruginosa* // Бактериология. – 2017. – Т. 2. – №. 1. – С. 54-60.
4. Егорова О. Н., Брусина Е. Б., Григорьев Е. В. Эпидемиология и профилактика синегнойной инфекции. – 2010.
5. Чеботарь И. В., Бочарова Ю. А., Маянский Н. А. Механизмы резистентности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам и их регуляция // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19. – №. 4. – С. 308-319.
6. Pirnay J. P. et al. Global *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river // Environmental microbiology. – 2005. – Т. 7. – №. 7. – С. 969-980. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00776.x>.
7. Behzadi P., Baráth Z., Gajdács M. It's not easy being green: a narrative review on the microbiology, virulence and therapeutic prospects of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* // Antibiotics. – 2021. – Т. 10. – №. 1. – С. 428.
8. Brüggemann H. et al. Comparative genomics of nonoutbreak *Pseudomonas aeruginosa* strains underlines genome plasticity and geographic relatedness of the global clone ST235 // Genome Biology and Evolution. – 2018. – Т. 10. – №. 7. – С. 1852-1857. <https://doi.org/10.1093/gbe/evy139>.
9. Crone S. et al. The environmental occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* // Apmis. – 2020. – Т. 128. – №. 3. – С. 220-231. <https://doi.org/10.1111/apm.13010>.
10. Xu Z. et al. Polymicrobial interaction and biofilms between *Staphylococcus*

aureus and *Pseudomonas aeruginosa*: an underestimated concern in food safety // Current opinion in food science. – 2019. – Т. 26. – С. 57-64. <https://doi:10.1016/j.cofs.2019.03.006>.

11. Visca P., Imperi F., Lamont I. L. Pyoverdine siderophores: from biogenesis to biosignificance // Trends in microbiology. – 2007. – Т. 15. – №. 1. – С. 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.11.00424.28>.

12. Chang G. et al. Characterization of *Pseudomonas spp.* contamination and in situ spoilage potential in pasteurized milk production process // Food Research International. – 2024. – Т. 188. – С. 114463. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2024.114463>.

13. Custovic A. et al. Epidemiological surveillance of bacterial nosocomial infections in the surgical intensive care unit / /Materia socio-medica. – 2014. – Т. 26. – №. 1. – С. 7.<https://doi.org/10.5455/msm.2014.26.7-11>.

14. Gao X. et al. Research advances on biogenic amines in traditional fermented foods: Emphasis on formation mechanism, detection and control methods // Food Chemistry. – 2023. – Т. 405. – С. 134911.doi: 10.1016/j.foodchem.2022.134911.

15. Токарева Д. Н., Худеева К. А. Стимулирование продукции пиоцианина бактерией *Pseudomonas aeruginosa* // Высокие технологии в современной науке и технике: сборник научных трудов IV Международной научно-технической конференции молодых ученых, аспирантов и студентов, г. Томск, 21-24 апреля 2015 г.– Томск, 2015. – 2015.

16. Al-Shammary A. H. A. The effect of heat treatment, pH and osmotic pressure on viability of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from raw dairy products in Baghdad // IJAR. – 2015. – Т. 3. – №. 3. – С. 675-681.

17. Narvhus J. A. et al. Isolates of *Pseudomonas spp.* from cold-stored raw milk show variation in proteolytic and lipolytic properties // International Dairy Journal. – 2021. – Т. 123. – С. 105049. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105049>.

18. Caldera L. et al. Identification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas spp.* isolated from different foods // Food Microbiology. – 2016. – Т. 54. – С.142-153. doi: 10.1016/j.fm.2015.10.

00302.

19. Martin N. H., Boor K. J., Wiedmann M. Symposium review: Effect of post-pasteurization contamination on fluid milk quality // *Journal of dairy science*. – 2018. – Т. 101. – №. 1. – С. 861-870. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13339>.
20. Петров А. Н. и др. Производство молочных консервов: инновации в формировании свойств сырья // *Молочная промышленность*. – 2010. – №. 5. – С. 74-77.
21. Kumaresan G. et al. Psychrotrophic spoilage of raw milk at different temperatures of storage // *Journal of Applied Sciences Research*. – 2007. – Т. 3. – №. 11. – С. 1383-1387.
22. Комзолова Н. Б. Сравнительная оценка некоторых факторов патогенности *Pseudomonas aeruginosa* // *Гигиена и санитария*. – 1991. – №. 11. – С. 68-69.
23. Пыж А. Э., Никандров В. Н. Вклад сине-зеленых пигментов *Pseudomonas aeruginosa* в гемолитическую активность культуральной жидкости. – 2011.
24. Rossi C. et al. Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas spp.* isolated from the dairy industry // *Food Control*. – 2018. – Т. 86. – С. 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.018>.
25. Шестаков А. Г. Усовершенствование методов выделения, идентификации индикации бактерий *Pseudomonas aeruginosa* // Афтореф. дис... канд. биол. наук-Саратов. – 2010.
26. Quintieri L. et al. Proteomic analysis of the food spoiler *Pseudomonas fluorescens* ITEM 17298 reveals the antibiofilm activity of the pepsin-digested bovine lactoferrin // *Food Microbiology*. – 2019. – Т. 82. – С. 177-193. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02>.
27. Cornelis P., Dingemans J., Baysse C. *Pseudomonas aeruginosa* Soluble Pyocins as Antibacterial Weapons // *Pseudomonas aeruginosa: Methods and Protocols*. – New York, NY: Springer US, 2023. – С. 125-136. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3473-8_9.
28. Michel-Briand Y., Baysse C. The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa* // *Biochimie*. – 2002. – Т. 84. – №. 5-6. – С. 499-510. <https://doi.org/10.1016/S0300->

9084(02)01422-035.

29. MacDonald I. A., Kuehn M. J. Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa* // Journal of bacteriology. – 2013. – Т. 195. – №. 13. – С. 2971-2981.<https://doi.org/10.1128/jb.02267-1236>.
30. Фоминых С. Г. Раневые инфекции: значение микробиологического мониторинга при составлении больничного формуляра антимикробных препаратов // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2011. – Т. 13. – №. 4. – С. 368-375.
31. Андреева С. В., Бахарева Л. И., Нохрин Д. Ю. Видовой состав микрофлоры ожоговых ран пациентов Челябинского областного ожогового центра // Вестник Челябинского государственного университета. – 2013. – №. 7 (298). – С. 58-59.
32. Mansoor T. et al. *Pseudomonas aeruginosa* in chronic suppurative otitis media: sensitivity spectrum against various antibiotics in Karachi // J Ayub Med Coll Abbottabad. – 2009. – Т. 21. – №. 2. – С. 120-3.
33. Mittal R. et al. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: a minireview // Journal of infection and public health. – 2009. – Т. 2. – №. 3. – С. 101-111. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2009.08.003>.
34. Klockgether J., Tümmler B. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen // F1000Research. – 2017. – Т. 6. – С. 1261. doi: [10.12688/f1000research.10506.1](https://doi.org/10.12688/f1000research.10506.1).
35. Yu Y. et al. Hot tub folliculitis or hot hand-foot syndrome caused by *Pseudomonas aeruginosa* // Journal of the American Academy of Dermatology. – 2007. – Т. 57. – №. 4. – С. 596-600. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.04.004>.
36. Calhoun J. H., Murray C. K., Manring M. M. Multidrug-resistant organisms in military wounds from Iraq and Afghanistan // Clinical Orthopaedics and Related Research®. – 2008. – Т. 466. – №. 6. – С. 1356-1362. <https://doi.org/10.1007/s11999-008-0212-9>.
37. Sato H., Frank D. W. ExoU is a potent intracellular phospholipase // Molecular microbiology. – 2004. – Т. 53. – №. 5. – С. 1279-

1290.<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04194>.

38. Morlon-Guyot J. et al. Processing of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A is dispensable for cell intoxication // Infection and immunity. – 2009. – Т. 77. – №. 7. – С. 3090-3099.<https://doi.org/10.1128/IAI.01390-084439>.
39. Li X. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: A typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing // Frontiers in Microbiology. – 2023. – Т. 13. – С. 1114199. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1114199>.
40. Tackonelli E. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development. – 2017. Retrieved from <https://coilink.org/20.500.12592/khnnff>. Accessed July 15, 2024.45.
41. Breidenstein E. B. M., de la Fuente-Núñez C., Hancock R. E. W. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance // Trends in microbiology. – 2011. – Т. 19. – №. 8. – С. 419-426. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.04.005> 50.
42. Немченко У. М. и др. Влияние антимикробных препаратов на биопленкообразование *Pseudomonas aeruginosa* // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2022. – Т. 26. – №. 5. – С. 495-501.
43. Эйдельштейн М. В. и др. Антибиотикорезистентность, продукция карбапенемаз и генотипы нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон 2015-2016» // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2019. – Т. 21. – №. 2. – С. 160-170.
44. Ткачева Т. С., Гатауллина Э. Ф., Бибарцева Е. В. Механизмы резистентности *Pseudomonas aeruginosa* к антибиотикам // Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры. – 2022. – С. 4168-4175.
45. Maciá M. D. et al. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2005. – Т. 49. – №. 8. – С. 3382-3386.<https://doi.org/10.1128/aac.49.8.3382-3386.2005>.

46. Коза Н. М. Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи. Эпидемиология и профилактика (обзорная лекция) // Пермский медицинский журнал. – 2013. – Т. 30. – №. 4. – С. 135-143.
47. Тутельян А. В. и др. Образование биологических пленок микроорганизмов на пищевых производствах // Вопросы питания. – 2019. – Т. 88. – №. 3. – С. 32-43.
48. Magiorakos A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance // Clinical microbiology and infection. – 2012. – Т. 18. – №. 3. – С. 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570>.
49. Bengtsson-Palme J., Kristiansson E., Larsson D. G. J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance // FEMS microbiology reviews. – 2018. – Т. 42. – №. 1. – С. fux053. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux053>.
50. Fernandes P., Martens E. Antibiotics in late clinical development // Biochemical pharmacology. – 2017. – Т. 133. – С. 152-163. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.09.025>.
51. Yaita K. et al. Liver abscess caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* treated with colistin; a case report and review of the literature // Internal medicine. – 2013. – Т. 52. – №. 12. – С. 1407-1412. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.52.9296>.
52. Афонюшкин В. Н. и др. Роль биоплёнок в адаптации микроорганизмов к неблагоприятным факторам окружающей среды на примере *Pseudomonas aeruginosa* (обзор литературы) // Гигиена и санитария. – 2020. – Т. 99. – №. 4. – С. 379-383.
53. Hall J. P. J., Brockhurst M. A., Harrison E. Sampling the mobile gene pool: innovation via horizontal gene transfer in bacteria // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. – 2017. – Т. 372. – №. 1735. – С. 20160424. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0424>.
54. Machado S. G. et al. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant

- enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products // Frontiers in microbiology. – 2017. – Т. 8. – С. 302. doi: 10.3389/fmicb.2017.00302.
55. Marchand S. et al. Heterogeneity of heat-resistant proteases from milk *Pseudomonas* species / International Journal of Food Microbiology. – 2009. – Т. 133. – №. 1-2. – С. 68-77. <https://doi.org/10.1016/j.ijfood.2009.04.027>.
56. Лабинская А. С. Микробиология с техникой микробиологических исследований. – 2021.
57. Рахманин Ю. А., Онищенко Г. Г. Гигиеническая оценка питьевого водообеспечения населения Российской Федерации: проблемы и пути рационального их решения // Гигиена и санитария. – 2022. – Т. 101. – №. 10. – С. 1158-1166. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-10-1158-1166>.
58. Журавлëв П. В. и др. Антибиотикорезистентность бактерий, выделенных из воды открытых водоемов // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – №. 5 (266). – С. 24-26.
59. Чунг Н. Т. и др. Выделение и идентификация *Pseudomonas spp.*, производящих β-лактамазу, в готовой к употреблению столовой зелени // Анализ риска здоровью. – 2020. – №. 1. – С. 101-107. DOI: 10.21668/health.risk/2020.1.11.
60. Mao D. et al. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants // Water research. – 2015. – Т. 85. – С. 458-466. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.010>.
61. Atolani O. et al. COVID-19: Critical discussion on the applications and implications of chemicals in sanitizers and disinfectants // EXCLI journal. – 2020. – Т. 19. – С. 785. <https://doi.org/10.17179/excli2020-1386>.
62. Шевелёва С. А. Антибиотикоустойчивые микроорганизмы в пище как гигиеническая проблема (Обзорная статья) // Гигиена и санитария. 2018. Т. 97. №. 4. С. 342-354. <https://doi.org/10.18821/0016-9900-2018-97-4-342-354>.
63. Короткевич Ю. В. Анализ резистентности к антибиотикам энтеробактерий и энтерококков, выделяемых из пищевых продуктов // Вопросы питания. – 2016. – Т. 85. – №. 2. – С. 5-13.

64. Odumosu B. T. et al. Antibiotic susceptibility pattern and analysis of plasmid profiles of *Pseudomonas aeruginosa* from human, animal and plant sources // Springerplus. – 2016. – T. 5. – C. 1-7. DOI: 10.1186/s40064-016-3073.
65. Sadek M. et al. Genomic features of MCR-1 and extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriales from retail raw chicken in Egypt // Microorganisms. – 2021. – T. 9. – №. 1. – C. 195.
66. Badawy B. et al. Prevalence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy cattle, milk, environment, and workers' hands / /Microorganisms. – 2023. – T. 11. – №. 11. – C. 2775.<https://doi.org/10.3390/microorganisms1111277516>.
67. Heir E. et al. Antibiotic resistance and phylogeny of *Pseudomonas* spp. isolated over three decades from chicken meat in the Norwegian food chain // Microorganisms. – 2021. – T. 9. – №. 2. – C. 207.<https://doi.org/10.3390/microorganisms902020762>.
68. Lavilla Lerma L. et al. Antibiotic multiresistance analysis of mesophilic and psychrotrophic *Pseudomonas* spp. isolated from goat and lamb slaughterhouse surfaces throughout the meat production process // Applied and Environmental Microbiology. – 2014. – T. 80. – №. 21. – C. 6792-6806. <https://doi.org/10.1128/aem.01998-14>.
69. Verraes C. et al. Antimicrobial resistance in the food chain: a review // International journal of environmental research and public health. – 2013. – T. 10. – №. 7. – C. 2643-2669. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>.
70. Langsrud S., Sundheim G., Borgmann-Strahsen R. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp // Journal of applied microbiology. – 2003. – T. 95. – №. 4. – C. 874-882.<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02064>.
71. Meesilp N., Mesil N. Effect of microbial sanitizers for reducing biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel by cultivation with UHT milk // Food Science and Biotechnology. – 2019. – T. 28. –

№. 1. – С. 289-296. <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0448-4>.

72. Семенихина В. Ф. Научное обоснование биотехнологических процессов производства цельномолочных продуктов с целью повышения качества и гигиенической надежности: дис. – ВАСХНИЛ. Всесоюз. н.-и. и конструкторский ин-т мясной промышленности, 1991.
73. Téllez S. Biofilms and their impact on food industry // VISAVET Outreach Journal. – 2010. Retrieved from <https://www.visavet.es/en/articles/biofilms-impact-food-industry.php>. Accessed July 11, 2024.
74. Кишилова С. А., Маневич Б. В., Рожкова И. В. Оценка действия биоцидных агентов на штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные с оборудования молочной фермы // Пищевая промышленность. -2024. – №.11 – С. 71–76. <https://doi.org/10.52653/ppi.2024.11.11.013>.
75. Schauer B. et al. Tracing mastitis pathogens—epidemiological investigations of a *Pseudomonas aeruginosa* mastitis outbreak in an Austrian dairy herd // Animals. – 2021. – Т. 11. – №. 2. – С. 279. <https://doi.org/10.3390/ani11020279>.
76. Mahmoud S. F. et al. Genetic Diversity, Biofilm formation, and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cow, camel, and mare with clinical endometritis // Veterinary Sciences. – 2022. – Т. 9. – №. 5. – С. 239. <https://doi.org/10.3390/vetsci9050239>.
77. Ефимочкина Н. Р. Микробиология пищевых продуктов и современные методы детекции патогенов. – 2013. Москва, Издательство РАМН, 2013.
78. Eneroth Å., Ahrné S., Molin G. Contamination of milk with Gram-negative spoilage bacteria during filling of retail containers // International Journal of Food Microbiology. – 2000. – Т. 57. – №. 1-2. – С. 99-106. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00239](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00239).
79. Тутельян А. В. и др. Методы борьбы с биологическими пленками на пищевых производствах / /Молочная промышленность. – 2020. – №. 11. – С. 48-53.
80. Frieri M., Kumar K., Boutin A. Antibiotic resistance // Journal of infection and public health. – 2017. – Т. 10. – №. 4. – С. 369-

378.<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.08.007>.

81. Рябцева С. А. и др. Биопленки в молочной промышленности: значение, формирование, контроль // Молочная промышленность. – 2018. – №. 1. – С. 57-59.
82. Габриэлян Н. И. и др. Госпитальная микрофлора и биопленки // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2014. – Т. 14. – №. 3. – С. 83-91.
83. Monroe D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms // PLoS biology. – 2007. – Т. 5. – №. 11. – С. e307. <https://doi.org/10.1128/iai.01390-08>.
84. Mayansky A. N. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: Characteristics of the biofilm process //Molecular Genetics, Microbiology and Virology. – 2012. – Т. 27. – С. 1-6. <https://doi.org/10.3103/S08914168120100539>
85. Ghafoor A., Hay I. D., Rehm B. H. A. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture // Applied and environmental microbiology. – 2011. – Т. 77. – №. 15. – С. 5238-5246.<https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11>.
86. Coughlan L. M. et al. New weapons to fight old enemies: novel strategies for the (bio) control of bacterial biofilms in the food industry / /Frontiers in microbiology. – 2016. – Т. 7. – С. 1641. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01641>.
87. Окулич В. К., Кабанова А. А., Плотников Ф. В. Микробные биопленки в клинической микробиологии и антибактериальной терапии // Витебск: ВГМУ. – 2017. – Т. 301.
88. Hentzer M. et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function // Journal of bacteriology. – 2001. – Т. 183. – №. 18. – С. 5395-5401. <https://doi.org/10.1128/JB.183.18.5395-5401.2001>.
89. Nikolaev Y. A., Plakunov V. K. Biofilm - “City of microbes” or an analogue of multicellular organisms? // Microbiology. – 2007. – Т. 76. – С.125-138. <https://doi.org/10.1134/S0026261707020014>.
90. Echeverz M. et al. Lack of the PGA exopolysaccharide in *Salmonella* as an adaptive trait for survival in the host // PLoS genetics. – 2017. – Т. 13. – №. 5. – С. e1006816.<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006816>.

91. Akinbobola A. B. et al. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in in-vitro biofilms to high-level peracetic acid disinfection // Journal of Hospital Infection. – 2017. – Т. 97. – №. 2. – С. 162-168. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.06.02494>.
92. Billings N. et al. The extracellular matrix component Psl provides fast-acting antibiotic defense in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // PLoS pathogens. – 2013. – Т. 9. – №. 8. – С. e1003526. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003526>.
93. Ma L. et al. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix / / PLoS pathogens. – 2009. – Т. 5. – №. 3. – С. e1000354. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354>.
94. Irie Y. et al. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2012. – Т. 109. – №. 50. – С. 20632-20636. <https://doi.org/10.1073/pnas.121799310978>.
95. Jennings L. K. et al. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2015. – Т. 112. – №. 36. – С. 11353-11358. <https://doi.org/10.1073/pnas.150305811279>.
96. Marchand S. et al. Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2012. – Т. 11. – №. 2. – С. 133-147. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00183>.
97. Beena A. K., Ranjini A. R., Riya T. G. Isolation of psychrotrophic multiple drug resistant *Pseudomonas* from pasteurised milk // Veterinary World. – 2011. – Т. 4. – №. 8. – С. 349. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2011.349352>.
98. Trmčić A. et al. A standard bacterial isolate set for research on contemporary dairy spoilage // Journal of dairy science. – 2015. – Т. 98. – №. 8. – С. 5806-5817. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9490>.
99. Brown A. G., Luke R. K. J. Siderophore production and utilization by milk spoilage *Pseudomonas* species // Journal of dairy science. – 2010. – Т. 93. – №. 4. – С. 1355-1363. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2395>.

100. Rowbury R. J. Stress responses of foodborne pathogens, with specific reference to the switching on of such responses. – 2005.
101. Fusco V. et al. Microbial quality and safety of milk and milk products in the 21st century // Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2020. – T. 19. – №. 4. – C. 2013-2049. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12568>.
102. Bukholm G. et al. An outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* associated with increased risk of patient death in an intensive care unit // Infection Control & Hospital Epidemiology. – 2002. – T. 23. – №. 8. – C. 441-446. <https://doi.org/10.1086/502082>.
103. Singh B. R. Thermotolerance and multidrug resistance in bacteria isolated from equids and their environment // Veterinary Record. – 2009. – T. 164. – №. 24. – C. 746-750. <https://doi.org/10.1136/vr.164.24.746>.
104. Nonaka G. et al. Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, σ32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress // Genes & development. – 2006. – T. 20. – №. 13. – C. 1776-1789. doi:10.1101/gad.1428206 Genes & Dev. 2006. 20: 1776-1789.
105. Elmagli A. A. O., Ibtisam E. M., Zubeir E. L. Study on the hygienic quality of pasteurized milk in Khartoum State (Sudan) // Research Journal of Animal and Veterinary Sciences. – 2006. – T. 1. – №. 1. – C. 12-17.
106. Prejit P., Nanu E., Latha C. Safety and keeping quality of pasteurized milk under refrigeration. – 2007. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/2007314982117>.
107. Mickova V., Lukasova J., Konecný S. *Pseudomonas aeruginosa* in raw and pasteurized milk // Veterinarni Medicina. – 1989. – T. 34. – №. 7. – C. 411-419. 108. Sviridenko G. M., Komarova T. V., Uskova E. E. Study of the composition of the residual microflora of milk after pasteurization // Food systems. – 2023. – T. 5. – №. 4. – C. 344-352. <https://doi.org/10.21323/2618-9771-2022-5-4-344-352>.
109. Hassani M. et al. Effect of a previous heat shock on the thermal resistance of *Listeria monocytogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* at different pHs // International journal of food microbiology. – 2007. – T. 116. – №. 2. – C. 228-238.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.010>.

110. Lee C. et al. Stand-alone ClpG disaggregase confers superior heat tolerance to bacteria // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – Т. 115. – №. 2. – С. E273-E282.
111. Mayer M. P. The Hsp70-chaperone machines in bacteria // Frontiers in Molecular Biosciences. – 2021. – Т. 8. – С. 694012. doi.org/10.3389/fmolb.2021681439.
112. Morey T. M., Houry W. A. Target-locked: A mechanism for disaggregase binding to aggregated proteins // Journal of Biological Chemistry. – 2024. – Т. 300. – № 4.
113. Lee C. et al. Protein homeostasis—more than resisting a hot bath // Current opinion in microbiology. 2016 Vol. 30. P. 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2016.02.006>.
114. Kamal S. M. FtsH protease and ClpG disaggregase confer fitness advantages to the worldwide prevalent *Pseudomonas aeruginosa* clone C: дис. – Karolinska Institutet (Sweden), 2020.
115. Katikaridis P., Römling U., Mogk A. Basic mechanism of the autonomous ClpG disaggregase // Journal of Biological Chemistry. – 2021. – Т. 296.
116. Moradali M. F., Ghods S., Rehm B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2017. – Т. 7. – С. 39. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00039>.
117. Oliver James D. The viable but nonculturable state in bacteria // Journal of microbiology. – 2005. – Т. 43. – №. spc1. – С. 93-100.
118. Деревенщикова М. И., Сыромятников М. Ю., Попов В. Н. Использование молекулярно-генетических методов для микробиологического контроля пищевой продукции // Техника и технология пищевых производств. – 2018. – Т. 48. – №. 4. – С. 87-113. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-87-113>.
119. Al-Ahmadi G. J., Roodsari R. Z. Fast and specific detection of *Pseudomonas Aeruginosa* from other pseudomonas species by PCR // Annals of burns and fire

- disasters. – 2016. – Т. 29. – №. 4. – С. 264.
120. Кузнецова М. В. и др. Опыт использования методов молекулярной генетики при идентификации клинических штаммов *Pseudomonas aeruginosa* // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – №. 3. – С. 34-37.
121. Черепушкина В. С. и др. Разработка ПЦР в режиме реального времени для детекции *P. aeruginosa* в биопленках // Ветеринарный врач. – 2021. – №. 5. – С. 64-72.
122. Маневич, Б. В., Титов, Е.Н. Электролизные растворы в санитарной обработке: прошлое и настоящее // Молочная промышленность – 2024 – Т.1. – С. 60-63. DOI: <https://www.doi.org/10.21603/1019-8946-2024-1-3>.
123. Кузина Ж. И., Маневич Б. В. Санитарно-гигиенические мероприятия на предприятиях молочной промышленности // Молоко. Переработка и хранение. – 2015. – С. 402-439. М.: Издательский дом «Типография» РАН. 2015; 402-421.
124. Ланге К. Р. Поверхностно-активные вещества: синтез, свойства, анализ, применение. – Профессия, 2007.
125. Косьяненко, Т. В. Дезинфицирующие средства на основе натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты и их антимикробная активность. // Актуальные вопросы молочной промышленности, межотраслевые технологии и системы управления качеством. – 2020. – Т. 1. – №. 1. – С. 280-287. [сб.] / [сост.: ФГАНУ «ВНИМИ»; под ред. А. Г. Галстяна]. Москва, 2020; 1:280-287. DOI: 10.37442/978-5-6043854-1-8-2020-1-280-287.
126. Кузнецов А. Л. и др. Формирование биобезопасности и экологизация производственной среды пищевых производств при использовании анолита // FOOD METAENGINEERING. – 2023. – Т. 1. – №. 2.
127. Cappello S., Guglielmino S. P. P. Interferência da temperatura de cultivo na adesão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ao poliestireno // Brazilian Journal of Microbiology. – 2006. – Т. 37. – С. 205-207. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300001>.
128. Vandervoort K. G., Brelles-Marino G. Plasma-mediated inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms grown on borosilicate surfaces under continuous

- culture system // PLoS One. – 2014. – T. 9. – №. 10. – C. e108512. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108512>.
129. Lacivita V. et al. High intensity light pulses to reduce microbial load in fresh cheese // Journal of Dairy Research. – 2018. – T. 85. – №. 2. – C. 232-237. <https://doi.org/10.1017/s0022029918000134>.
130. Lacivita V. et al. Steam-ultrasound combined treatment: A promising technology to significantly control mozzarella cheese quality // Lwt. – 2018. – T. 93. – C. 450-455. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.03.062>
131. Lacivita V. et al. Study of X-Ray irradiation applied to fresh dairy cheese // Lwt. – 2019. – T. 103. – C. 186-191. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2018.12.073>.
132. Brackman G., Coenye T. Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents // Current pharmaceutical design. – 2015. – T. 21. – №. 1. – C. 5-11. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140905114627>.
133. Donlan R. M. Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage // Trends in microbiology. – 2009. – T. 17. – №. 2. – C. 66-72. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.11.002>.
134. Issabekov S. S. et al. Prospects of bacteriophage collections in disinfectant applications // Veterinary World. – 2022. – T. 15. – №. 1. – C. 220.
135. Chen H. et al. Inhibition and eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by host defence peptides // Scientific reports. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 10446. 136. López-Cuevas O. et al. Bacteriophage applications for fresh produce food safety // International Journal of Environmental Health Research. – 2021. – T. 31. – №. 6. – C. 687-702.
137. Oechslin F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy // Viruses. – 2018. – T. 10. – №. 7. – C. 351. <https://doi.org/10.3390/v10070351>.
138. Costa M. J. et al. Bacteriophage delivery systems for food applications: Opportunities and perspectives // Viruses. – 2023. – T. 15. – №. 6. – C. 1271.
139. Hemalata V. B., Oli A. K., Virupakshaiah D. B. M. Evaluating of Phage as Bio-control Agent in Enumeration of Food Borne Pathogenic *Pseudomonas*

- aeruginosa // Journal of Pure & Applied Microbiology. – 2020. – Т. 14. – №. 3.
140. Holger D. et al. Clinical pharmacology of bacteriophage therapy: A focus on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections // Antibiotics. – 2021. – Т. 10. – №. 5. – С. 556 <https://doi.org/10.3390/antibiotics 10050556>.
141. Катаева Л. В. и др. Литическая активность бактериофагов в отношении возбудителей острых кишечных инфекций // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – №. 3 (264). – С. 39-42.
142. Colomer-Lluch M. et al. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2011. – Т. 55. – №. 10. – С. 4908-4911. <https://doi.org/10.1128/aac.00535-11>.
143. Баязитова Л. Т. и др. Мониторинг чувствительности *Pseudomonas aeruginosa* к бактериофагам // Инфекционные болезни в современном мире: эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика. – 2020. – С. 27-27.
144. Тапальский Д. В. Чувствительность госпитальных изолятов *Pseudomonas aeruginosa* к препаратам для фаготерапии // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2018. – Т. 17. – №. 2. – С. 47-54.
145. Кишилова С. А. и др. Антимикробная активность метаболитных комплексов лактобацилл в отношении *Pseudomonas aeruginosa* // Биофизика – 2024-Т. 69-№ 3 –С.324-332. <https://doi.org/10.31857/S0006302924020>.
146. Savinova O. S. et al. Exoproteome analysis of antagonistic interactions between the probiotic bacteria *Limosilactobacillus reuteri* LR1 and *Lacticaseibacillus rhamnosus* F and multidrug resistant strain of *Klebsiella pneumonia* // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Т. 22. – №. 20. – С. 10999148.
147. Рожкова И. В. и др. Антагонистическая активность *Lactobacillus spp.* в отношении госпитальных штаммов *Klebsiella spp.* // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2018. – Т. 20. – №. S1. – С. 180-180.
148. Кишилова С. А. и др. Сравнительная оценка антагонистической активности коллекционных лактобацилл в отношении полирезистентных

Klebsiella pneumoniae // Вопросы питания. – 2023. – Т. 92. – №. 6 (550). – С. 120-127.

149. Фёдорова Т. В. и др. Антагонистическая активность молочнокислых бактерий *Lactobacillus spp.* в отношении клинических изолятов *Klebsiella pneumoniae* // Прикладная биохимия и микробиология. – 2018. – Т. 54. – №. 3. – С. 264-276.
150. Zimina M. et al. Overview of global trends in classification, methods of preparation and application of bacteriocins // Antibiotics. – 2020. – Т. 9. – №. 9. – С. 553.
151. Стоянова Л. Г. Выделение и идентификация молочнокислых бактерий *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* с антимикробным действием / /Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии. – 2017. – №. 5. – С. 41-61. <https://doi.org/10.26897/0021-342x-2017-5-41-61>.
152. Jalilsood T. et al. Inhibition of pathogenic and spoilage bacteria by a novel biofilm-forming *Lactobacillus* isolate: a potential host for the expression of heterologous proteins // Microbial cell factories. – 2015. – Т. 14. – С. 1-14.
153. Valdez J. C. et al. Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment // Clinical microbiology and infection. – 2005. – Т. 11. – №. 6. – С. 472-479.
154. Shokri D. et al. The inhibition effect of lactobacilli against growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* // Probiotics and antimicrobial proteins. – 2018. – Т. 10. – №. 1. – С. 34-42.
155. Zanzan M. et al. Leveraging lactic acid bacteria biofilms and bioactive substances to counteract pathogenic biofilms in the Dairy Processing // Food and Humanity. – 2024. – С. 100448. <https://doi.org/10.1016/j.foohum.2024.100448>.
156. Сухина М. А. и др. Перспективы использования антагонистической активности лактобацилл для подавления роста *Clostridium* (*Clostridioides*) *difficile* // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – №. 12 (160). – С. 19-24. <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-160-12-19-24>.

157. Ait Ouali F. et al. Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces // International journal of food microbiology. – 2014. – T. 191. – C. 116-124. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.011>.
158. Lewies A., Du Plessis L. H., Wentzel J. F. Antimicrobial peptides: the Achilles' heel of antibiotic resistance? // Probiotics and antimicrobial proteins. – 2019. – T. 11. – C. 370-381. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9465-0>.
159. Beaudoin T. et al. Activity of a novel antimicrobial peptide against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Scientific reports. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 14728. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33016-7>.
160. Moussouni M. et al. Activity of a synthetic peptide targeting MgtC on *Pseudomonas aeruginosa* intramacrophage survival and biofilm formation // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2019. – T. 9. – C. 84. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00084>.
161. Nesse L. L., Simm R. Biofilm: a hotspot for emerging bacterial genotypes // Advances in applied microbiology. – Academic Press, 2018. – T. 103. – C. 223-246. <https://doi.org/10.bs.aambs.2018.01.003>.
162. Соколова О. В., Юшина Ю. К. Бактериальные биопленки, как микробиологический риск птицерабатывающих производств // Научно-техническое обеспечение эффективности и качества производства продукции апк. – 2019. – C. 242-245.
163. Kong H., Jang J. Synthesis and antimicrobial properties of novel silver/polyrhodanine nanofibers // Biomacromolecules. – 2008. – T. 9. – №. 10. – C. 2677-2681.
164. Dima C., Dima S. Essential oils in foods: extraction, stabilization, and toxicity // Current Opinion in Food Science. – 2015. – T. 5. – C. 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.07.003>.
165. Myszka K. et al. Inhibition of quorum sensing-related biofilm of *Pseudomonas fluorescens* KM121 by *Thymus vulgare* essential oil and its major bioactive compounds // International Biodeterioration & Biodegradation. – 2016. – T. 114. – C.

252-259.<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.07.006>.

166. Bai A J., Rai Vittal R. Quorum sensing regulation and inhibition of exoenzyme production and biofilm formation in the food spoilage bacteria *Pseudomonas psychrophila* PSPF19 // Food Biotechnology. – 2014. – Т. 28. – №. 4. – С. 293-308.<https://doi.org/10.1080/08905436.2014.963601>.
167. Майская Л. М. и др. Методика определения фагочувствительности штаммов, выделенных от больных, к препаратам бактериофагов / /Научно-практический журнал «БИО препараты». – 2003. – №. 2. – С. 22-23.
168. Харитонов В. Д. и др. Экспериментальные образцы оборудования для отработки технологических процессов в пищевой промышленности // Пищевая промышленность. 2010. №. 10. С. 14-16.
169. Koziróg A., Otlewska A., Brycki B. Viability, enzymatic and protein profiles of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cells after monomeric/gemini surfactant treatment // Molecules. – 2018. – Т. 23. – №. 6. – С. 1294.
170. Bahador N., Baserisalehi M., Alaei B. Antibiotic and Enzymatic Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Recovered from Environmental and Clinical Samples // Nature Environment and Pollution Technology. – 2017. – Т. 16. – №. 3. – С. 939.
171. Dogan B., Boor K. J. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas spp.* isolated from fluid milk products and dairy processing plants // Applied and environmental microbiology. – 2003. – Т. 69. – №. 1. – С. 130-138. 172.
- Вакарина А. А., Катаева Л. В., Степанова Т. Ф. Влияние бактериофагов на чувствительность условно патогенных бактерий к антибактериальным препаратам // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – №. 2. – С. 3-7.
173. Тапальский Д. В. Препараты бактериофагов и комбинации антибиотиков: *in vitro* активность в отношении изолятов *Pseudomonas aeruginosa* ST235 с экстремальной антибиотикорезистентностью // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2016. – Т. 18. – №. 4. – С. 242-248.
174. Асланов Б. И. и др. Эффективность применения бактериофагов против

- штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, формирующих микробные биоплёнки // Профилактическая и клиническая медицина. – 2020. – №. 4. – С. 40-45.
175. Calasso M. et al. Effects of the peptide pheromone plantaricin A and cocultivation with *Lactobacillus sanfranciscensis* DPPMA174 on the exoproteome and the adhesion capacity of *Lactobacillus plantarum* DC400 // Applied and Environmental Microbiology. – 2013. – Т. 79. – №. 8. – С. 2657-2669. <https://doi.org/10.1128/AEM.03625-12>.
176. Hwang C. H., Kim S. H., Lee C. H. Bacterial Growth Modulatory Effects of Two Branched-Chain Hydroxy Acids and Their Production Level by Gut Microbiota // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2024. – Т. 34. – №. 6. – С. 1314.
177. Fernández M., Zúñiga M. Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria // Critical reviews in microbiology. – 2006. – Т. 32. – №. 3. – С. 155-183.
178. Quintieri L., Fanelli F., Caputo L. Antibiotic resistant *Pseudomonas spp.* spoilers in fresh dairy products: An underestimated risk and the control strategies // Foods. – 2019. – Т. 8. – №. 9. – С. 372. <https://doi.org/10.3390/food58090372>.
179. Иванов М. Э., Фурсова Н. К., Потапов В. Д. Суперсемейства эффлюксных насосов *Pseudomonas aeruginosa* (обзор литературы). // Клиническая лабораторная диагностика. – 2022. – Т. 67. – №. 1. <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-53-58>.
180. Gunasekera T. S. et al. Inducible gene expression by nonculturable bacteria in milk after pasteurization // Applied and environmental microbiology. – 2002. – Т. 68. – №. 4. – С. 1988-1993. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.4.1988-1993.2002>.
181. Mulyukin A. L. et al. Structural and physiological diversity among cystlike resting cells of bacteria of the genus *Pseudomonas* // Mikrobiologiya. – 2008. – Т. 77. – №. 4. – С. 512-523185.
182. Mulyukin A. L. et al. Surviving forms in antibiotic-treated *Pseudomonas aeruginosa* // Microbiology. – 2015. – Т. 84. – С. 751-763.
183. Kirisits M. J. et al. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // Applied and environmental microbiology. – 2005. – Т. 71. – №. 8. – С. 4809-4821. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4809-4821.2005>.

184. Гаврилова И. А., Титов Л. П. Ультрамикроскопические различия в строении *Pseudomonas aeruginosa*, чувствительных и резистентных к дезинфицирующим средствам // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2013. – №. 4. – С. 13-20.
185. Пиядина А. Ю. Воздействие антибактериальных веществ на рост и развитие биопленок клинических изолятов // Фундаментальные и прикладные исследования: от теории к практике. – 2018. – С. 245-250.
186. Rowan N. J., Anderson J. G. Effects of above-optimum growth temperature and cell morphology on thermotolerance of *Listeria monocytogenes* cells suspended in bovine milk // Applied and Environmental Microbiology. – 1998. – Т. 64. – №. 6. – С. 2065-2071. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.6.2065-2071.1998>.
187. Ranaweera, C. B. (2021). *Bacterial AAA+ disaggregase ClpB: mechanism and inhibition*. Kansas State University.
188. Wang C. et al. Effects of Triclosan on the Development of Antimicrobial Resistance in the Environment: A Review // Current Pollution Reports. – 2023. – Т.9. – №. 3. – С. 454-467. <https://doi.org/10.1007/s40726-023-00270-x>.
189. Шкарин В. В. и др. Формирование устойчивости бактерий к четвертичным аммониевым соединениям в экспериментальных условиях // Медицинский альманах. – 2012. – №. 3. – С. 129-133

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А Титульный лист документа по стандартизации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ МОЛОЧНОЙ
ПРОМЫШЛЕННОСТИ»
(ФГАНУ «ВНИМИ»)

СТАНДАРТ
ОРГАНИЗАЦИИ

СТО 00419785-084-2025



УТВЕРЖДАЮ
Директор ФГАНУ «ВНИМИ»
Галстян А.Г.
2025 г.

ОПТИМИЗАЦИЯ КОНТРОЛЯ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ
МОЛОЧНОЙ ПРОДУКЦИИ

РАЗРАБОТАНО:
ФГАНУ «ВНИМИ»
Зам. заведующего лаборатории прикладной
микробиологии и геномики
микроорганизмов
И.В. Рожкова
подпись

Младший научный
сотрудник
С.А. Кишилова
подпись

Приложение Б Акты внедрения

Утверждаю

Генеральный директор

ООО «Итальянские традиции»

Демченко А.Ю.

«21» августа 2025 г.



АКТ

Мы, нижеподписавшиеся, Генеральный директор Демченко А.Ю., начальник производства Новелли Иван, технолог Бухарова С.Д. составили настоящий акт о том, что в условиях производства для проведения экстренных мероприятий для выявления и устранения причин появления порчи продукции в рамках производственного контроля была проведена оптимизация контроля *Pseudomonas aeruginosa* при производстве молочной продукции согласно СТО 00419785-084-2025. Выбор контрольных точек включал:

- Контроль используемой на производстве воды;
- Контроль сырого молока;
- Контроль санитарно-гигиенического состояния оборудования;
- Контроль санитарно-гигиенического состояния участка фасовки и упаковки;
- Контроль санитарно-гигиенического состояния цехов;
- Контроль образцов готовой продукции при холодильном хранении в течение рекомендуемого срока годности;
- Контроль технологической одежды и рук персонала;
- Контроль рабочих растворов моющих и дезинфицирующих средств;
- Контроль технологической одежды и рук персонала.

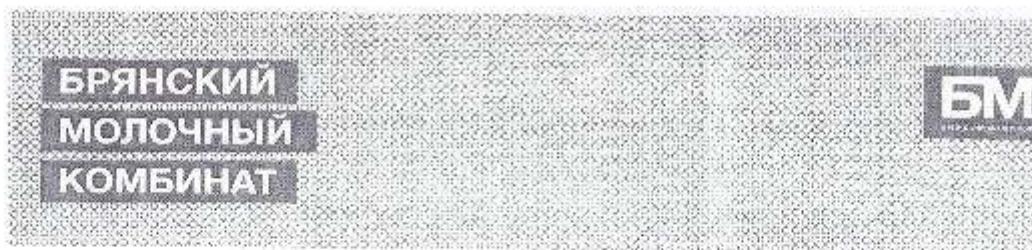
В результате проведенных согласно СТО 00419785-084-2025 контрольных мероприятий выявленные несоответствия были оперативно устранены.

Демченко А.Ю.

Новелли Иван

Бухарова С.Д.

Приложение Б Акты внедрения



«УТВЕРЖДАЮ:

Генеральный директор
ОАО «Брянский молочный комбинат»
А.Г. Рублев 

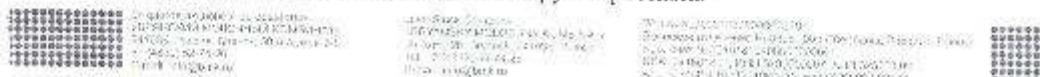
М.П.

АКТ
АПРОБАЦИИ И ВНЕДРЕНИЯ

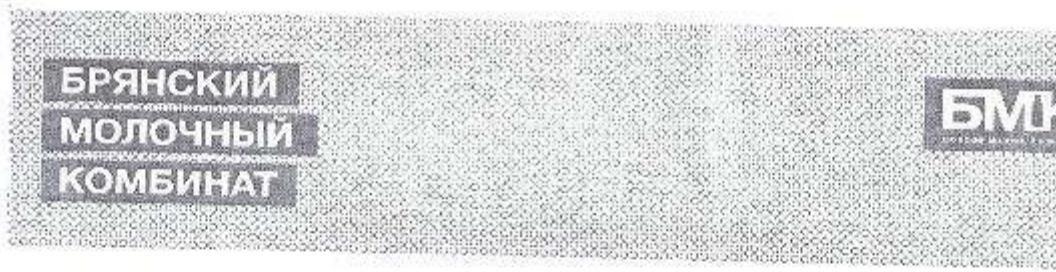
Настоящим актом подтверждаем апробацию и внедрение комплексных мероприятий для оценки рисков, возникновения и устранения причин порчи готовой продукции в рамках системы производственного контроля на ОАО «Брянский молочный комбинат» в период с 13 января 2025 года по 13 августа 2025 года.

В указанный период времени были проведены мероприятия для внедрения комплексной оценки рисков, возникновения и устранения причин порчи готовой продукции в рамках системы производственного контроля, а именно:

- Контроль используемой на производстве воды;
- Контроль сырого коровьего молока;
- Контроль санитарно-гигиенического состояния оборудования;
- Контроль санитарно-гигиенического состояния участка фасовки и упаковки;
- Контроль санитарно-гигиенического состояния производственных цехов;
- Контроль готовой продукции в течение рекомендуемого срока годности в условиях соблюдения температурных режимов хранения;
- Контроль технологической одежды и рук персонала;
- Контроль рабочих растворов моющих и дезинфицирующих средств;
- Контроль технологической одежды и рук персонала.



Приложение Б Акты внедрения



В результате внедрения комплексных мероприятий для оценки рисков и устранения причин возникновения царчи готовой продукции в рамках системы производственного контроля были ужесточены требования к применимому сырью, компонентам, водоподготовке, используемым молочным средствам как по микробиологическим показателям, так и по санитарно-гигиеническим показателям, к которым относится «*Pseudomonas aeruginosa*», что позволяет исключить наличие данного вида бактерий.

Производственный контроль по показателю «*Pseudomonas aeruginosa*» проводился согласно разработанному СТО 00419785-084-2025. Внедрение комплексных мероприятий, согласно данному СТО, позволило исключить дальнейшее появление данного вида бактерий в готовой продукции, сырье, воде и применяемых компонентах при производстве молочной продукции.

Заместитель Генерального директора
по производству

Е.Н. Павтарь

Инженер-технолог

И.Н. Прокопенко

Младший научный сотрудник
Лаборатории прикладной микробиологии
и геномики микроорганизмов

С.А. Кишигова

БРЯНСКИЙ МОЛОЧНЫЙ КОМБИНАТ
125000, г. Брянск, ул. Красногвардейская, 25
тел. (48322) 5-60-00
факс (48322) 5-60-01
E-mail: bmk@bmk.ru

ЗАО «БМК-Сервис»
125000, г. Брянск, ул. Красногвардейская, 25
тел. (48322) 5-60-00
факс (48322) 5-60-01
E-mail: bmk-serv@bmk.ru

Межрегиональное представительство
ЗАО «БМК-Сервис»
125000, г. Брянск, ул. Красногвардейская, 25
тел. (48322) 5-60-00
факс (48322) 5-60-01
E-mail: bmk-serv@bmk.ru

Приложение Б Акты внедрения



АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«ЗЕЛЕНОГРАДСКОЕ»

Адрес: 141255, Московская обл.,
Пушкинский р-н., с. Ельдигино

Эл. почта: gpzz@mail.ru
Тел. бух. 1-44-24
Тел. 496-53-1-44-37

р/с 40702810140000021739
ПАО Сбербанк
БИК 044525225
к/с 30101810400000000225
ОКПО 00 56 12 76

ОГРН 1025004906915 ИНН 5038011829 КПП 503801001

Утверждаю
Генеральный директор
АО «Зеленоградское»



Никитин Евгений Николаевич

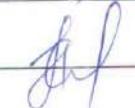
18 августа 2025г.

Акт

Мы, нижеподписавшиеся,
главный технолог Ельчугина Е.М
главный специалист по качеству Янушевская К.С.
мастер цеха переработки молока Киселева А.С.
составили настоящий акт о том, что в условиях производства были
осуществлены мероприятия в соответствии с рекомендациями СТО ВНИМИ
(МР) № 00419785-084-2025 «Оптимизация контроля *Pseudomonas aeruginosa*
при производстве молочной продукции». На основании проведённой работы
внесены дополнения в программу производственного контроля на предприятии.


Ельчугина Е.М.


Янушевская К.С.


Киселева А.С.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

МКБ – молочнокислые микроорганизмы;

КОЕ – колониеобразующие единицы;

КЖ – культуральная жидкость;

УВТ – обработка – ультравысокотемпературная обработка;

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость;

QS – система чувства кворума;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

GMP – Good Manufactory Practice;

FDR – False Discovery Rate;

PSM – Propersity Score Matching;

CIP – Clean-in-Place;

ЭПС – экзополисахариды;

ДХЦН – дихлорцианурат;

АХ – активный хлор;

ПАВ – поверхностно-активные вещества;

СПА – агар сухой питательный;

MRS бульон – de Man, Rogosa, Sharpe бульон