

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

МОСКВА – 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» (ФГАНУ «ВНИМИ»)

Научный руководитель: Кандидат технических наук
Научный консультант: Рожкова Ирина Владимировна Кандидат биологических наук Фоменко Олег Юрьевич

Официальные оппоненты: Свириденко Галина Михайловна
доктор технических наук
Федорова Татьяна Васильевна
кандидат технических наук,
ведущий научный сотрудник, заведующий
лабораторией молекулярных основ
биотрансформаций Института биохимии им.
А.Н. Баха ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные
основы биотехнологии» Российской академии
наук»
Ведущая организация: Воронежский государственный университет
инженерных технологий (ВГУИТ) университет
инженерных технологий (ВГУИТ)

Защита состоится **«16» апреля 2026 г. в 10 часов 00 минут** на заседании совета по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук 24.1.515.01 при ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» по адресу: 115093, г. Москва, ул. Люсиновская, д. 35, корп.7, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности». Полный текст диссертации размещен в сети Интернет на официальном сайте ФГАНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт молочной промышленности» <http://www.vnimi.org>.

Автореферат разослан «____» 2026 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат технических наук

Т.С. Бычкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, является не только причиной порчи молочных продуктов, но и угрозой общественному здоровью – 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 ее роль в контаминации пищевых, в том числе молочных продуктов, постоянно нарастает, что связано с общим ухудшением экологической ситуации, укрупнением производств и повсеместным внедрением механического доения. Пороки, вызываемые *P. aeruginosa*, 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 совершенствование санитарно - гигиенических процедур и системы контроля качества, *P. aeruginosa* остается серьезной проблемой как для молочной промышленности, вызывая разнообразные признаки порчи продукции, так и для здоровья людей.

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 высокие адаптационные способности и метаболическая пластичность, быстрая воспроизводимость, 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 и сравнить их со свойствами 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 химических антимикробных агентов;
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.

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

Установлена перспективность применения грибковой кефирной закваски и молочнокислых культур, как дополнительного барьера против *P. aeruginosa*.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Определены зависимости выживаемости штаммов *P. aeruginosa* от температурно-временных параметров при исследовании режимов пастеризации и хранения молока; выявлена вариабельность 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* и важность мониторинга реактивации *P. aeruginosa* при хранении; перспективность применения грибковой кефирной закваски и молочнокислых культур как дополнительного барьера против *P. aeruginosa*; необходимость подтверждения эффективности рабочих концентраций используемых дезинфицирующих средств и их ротации для предотвращения 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 антимикробным агентам;
3. Результаты исследования механизмов антимикробного действия штамма *Lactobacillus 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 хранения 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 конференция 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.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационная работа соответствует пп. 3 и 26 паспорта специальности 4.3.5 «Биотехнология продуктов питания и биологически активных веществ» и пп. 16, 17 паспорта специальности 4.3.3 «Пищевые системы».

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных 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.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, сформулированы концепция, цель и задачи исследования, изложены научная новизна, практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, представлены степень достоверности, методология, результаты публикационной активности, апробации и данные по структуре и объему диссертации.

В первой главе представлен анализ научно-технической литературы по теме исследования. Показано, что биологические характеристики делают *P. aeruginosa* универсальным микробным патогеном. Персистенция данного микроорганизма на молочном производстве приводит к экономическим потерям и представляет реальную угрозу здоровью человека. В доступной литературе нет достаточных данных о вариабельности свойств штаммов

P. aeruginosa, циркулирующих на молочных производствах, их способности противостоять санитарным процедурам и технологическим воздействиям при пастеризации молока.

На основании литературных данных подтверждена актуальность выбранной темы диссертационной работы и необходимость проведения исследований по поиску и разработке средств для противодействия бактерии *P. aeruginosa* и выявлению критических точек для предотвращения рисков контаминации молочной продукции.

Во второй главе «Организация работы, объекты и методы исследований» приведена организация работы, описаны объекты и методы, представлена схема проведения исследований (рис. 1). Объектами исследований служили:

- молоко, контаминированное штаммами *P. aeruginosa* и подвергнутое обработке при различных температурно-временных параметрах при испытании технологически значимых режимов пастеризации молока;

- исследуемые образцы молока в хранении;

- штаммы *P. aeruginosa*, выделенные при мониторинге санитарно-гигиенического состояния на молочных производствах и контрольный штамм *P. aeruginosa* 25668, полученный в Государственной коллекции микроорганизмов и клеточных культур;

- штаммы молочнокислых бактерий (МКБ) *Lactobacillus helveticus* АК, *L. helveticus* 14вв, *L. helveticus* 2вв, *L. helveticus* 5вв, *L. helveticus* Ббн4, *L. helveticus* NK1, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MA1, *L. lactis* AM1, *L. lactis* subsp. *diacetylactis* dLA, *Streptococcus thermophilus* 16t, *S. thermophilus* 163, *S. thermophilus* 159, *Lacticaseibacillus paracasei* ABK, *L. paracasei* MA2, *L. paracasei* MA3, *L. paracasei* KF1, *Lacticaseibacillus rhamnosus* F и грибковая кефирная закваска из коллекции молочнокислых и пробиотических микроорганизмов ФГАНУ «ВНИМИ».

При проведении экспериментальной части были использованы микробиологические и биохимические методы; выделение и идентификацию *P. aeruginosa* проводили согласно действующим НД.

Обработку полученных экспериментальных данных осуществляли с помощью пакета программ «Microsoft Office» по результатам 3-х повторностей.

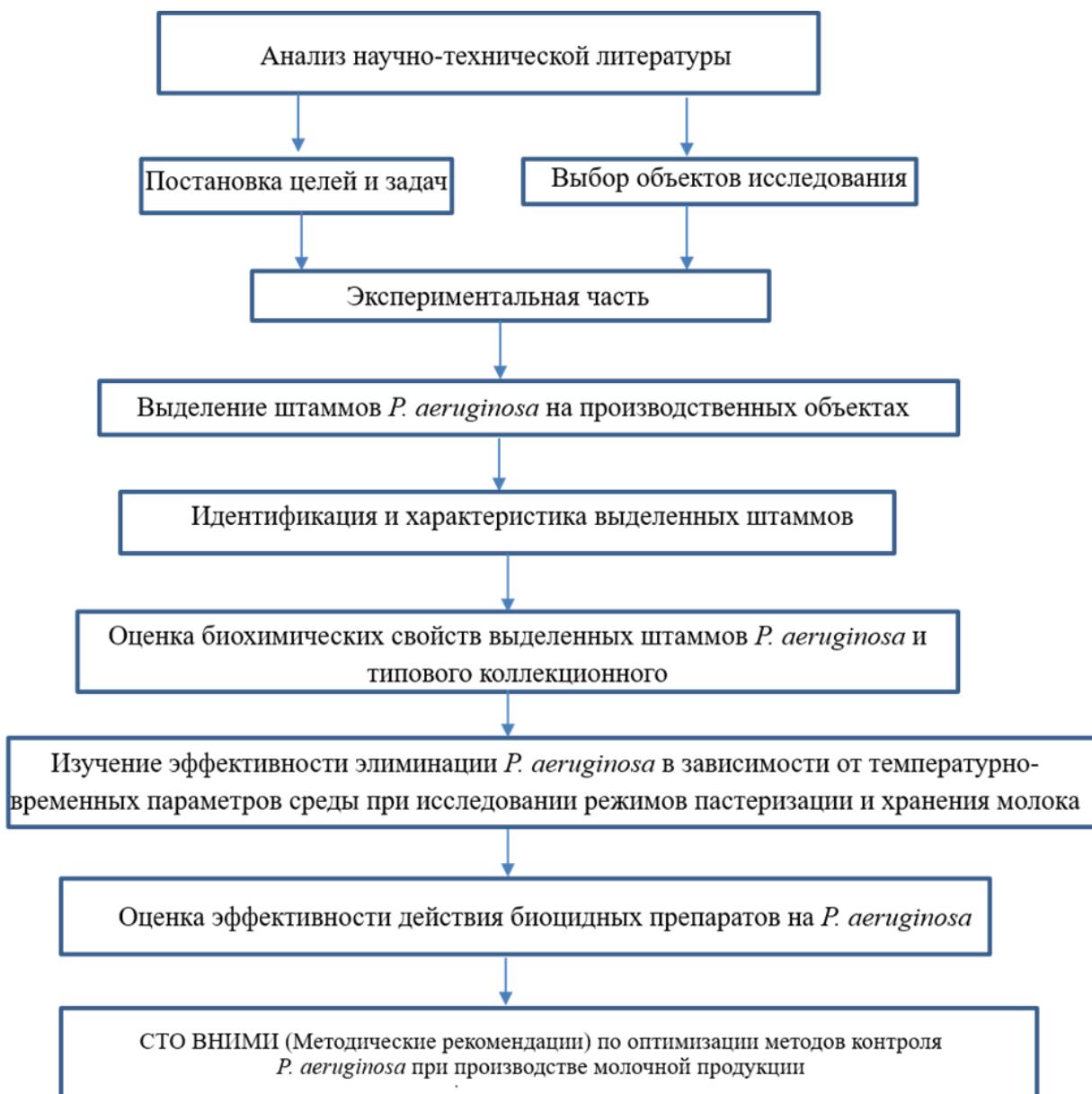


Рисунок 1 – Схема проведения исследований

В третьей главе «Экспериментальная часть» приведены результаты проведенных исследований.

Проведен мониторинг санитарного состояния ряда молочных предприятий. Исследовали смывы с оборудования, воду, используемую на производстве, пробы сырого молока и готовой продукции, корма, растворы дезинфицирующих средств, смывы с рук и одежды персонала. Выделено 4 штамма, идентифицированные как *P. aeruginosa*. Им присвоены рабочие номера: *P. aeruginosa* 42, *P. aeruginosa* 47, *P. aeruginosa* M1, *P. aeruginosa* B2. Изучены морфологические, культуральные, биохимические свойства выделенных штаммов; выявлен более высокий уровень пигментообразования. (рис. 2). При культивировании на стерильном обезжиренном молоке при температуре $(37\pm1)^\circ\text{C}$ отмечались визуальные отличия в характере роста штаммов, что возможно связано с различиями в работе их ферментов (рис. 3).

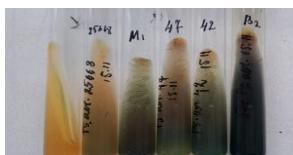


Рисунок 2 – Образование штаммами пигмента на среде СПА: контроль среды; *P. aeruginosa* 25668; M1; 47; 42; B2 (слева направо)

Исходя из предполагаемой корреляции пигmentообразования с вирулентностью, сравнили чувствительность выделенных штаммов и типового *P. aeruginosa* 25668 к ряду антибиотиков (табл.1).

Таблица 1 – Чувствительность к антибиотикам штаммов *P. aeruginosa* (диско-диффузионный метод)

| штамм <i>P. aeruginosa</i> | Зона подавления роста, мм | | | | | |
|----------------------------|---------------------------|-------------|------------|--------------|-------------|------------|
| | ампициллин | азитромицин | гентамицин | тетрациклины | левомицетин | линкомицин |
| 25668 | R | 22±1 | 20±1 | 11±1 | 12±1 | R |
| 42 | R | 22±1 | 22±1 | 12±1 | 12±1 | R |
| 47 | R | 20±1 | 20±1 | 7±1 | 10±1 | R |
| M1 | R | 20±1 | 20±1 | 11±1 | 10±1 | R |
| B2 | R | 23±1 | 20±1 | 8±1 | 12±1 | R |

R – резистентный

У всех штаммов наблюдалась устойчивость к линкомицину и ампициллину, *P. aeruginosa* 47 и B2 показали самую высокую устойчивость к тетрациклину. 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*.

Результаты исследования ферментативной активности с использованием системы API®ZIM представлены в табл. 2.

Таблица 2 – 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-фосфогидролаза | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 4,5 | 3,5 |
| Эстераза (C4) | 3,5 | 4,0 | 3,5 | 4,0 | 4,0 | Липаза | 3,0 | 3,0 | 3,5 | 4,0 | 2,0 |
| Эстераза-липаза (C8) | 3,0 | 4,0 | 4,5 | 4,0 | 4,0 | Лейцин ариламида | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 |

Все штаммы демонстрировали активность эстеразы, эстеразы-липазы, лейцин-ариламида и нафтол-AS-BI-фосфогидролазы, что согласуется с

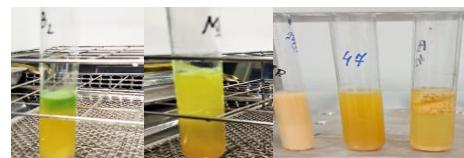


Рисунок 3 – Характер роста на молоке штаммов *P. aeruginosa*: B2, M1, 25668; 47, 42 (слева направо)

литературным данными. Эти ферменты обеспечивают *P. aeruginosa* высокую выживаемость в неблагоприятных условиях и влияют на формирование биопленок. Активность ферментов, синтезируемых исследуемыми штаммами, была различна: *P. aeruginosa* 47, M1, B2, 42 проявляли высокую активность эстеразы-липазы, *P. aeruginosa* M1 – лейцин-ариламидазы, липазы и нафтол-AS-BI-фосфогидролазы; *P. aeruginosa* B2 – лейцин-ариламидазы. *P. aeruginosa* M1, B2 и 47 синтезировали щелочную фосфатазу, в то время как у *P. aeruginosa* 25668 и 42 отсутствовала выраженная активность данного фермента. В целом, у выделенных штаммов ферментативная активность была выше. У всех штаммов протеолитическая активность наблюдалась при температуре $(37\pm1)^\circ\text{C}$, оптимальной для роста *P. aeruginosa*. При $(20\pm1)^\circ\text{C}$ она была более выражена у *P. aeruginosa* 47, 42 и 25668, а у *P. aeruginosa* M1 и B2 была незначительна. При $(6\pm1)^\circ\text{C}$ незначительная протеолитическая активность наблюдалась у штаммов 42 и M1. Изучение протеолитической активности при различных температурах культивирования показало, что её проявление является как штаммо-, так и температурозависимым. Метаболическая активность при низких температурах подтверждает риски снижения хранимоспособности, связанные с психротрофностью *P. aeruginosa*.

Ряд исследователей рассматривает возможность использования бактериофагов, как эффективных и экологически безопасных биоцидных средств. При изучении действия антимикробных биологических агентов на рост *P. aeruginosa* исследовали литическое действие синегнойного бактериофага (табл. 3).

Таблица 3 – Чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к бактериофагу синегнойной палочки (капельный метод)

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

Примечание: (4+) – сливной лизис; (3+) – полусливной лизис, рост культуры в зоне лизиса; (1+) – наличие в месте нанесения фага от 20 до 50 колоний фага; (+/-) – наличие менее 20 колоний фага; (-) – отсутствие лизиса.

Показано, что бактерии *P. aeruginosa*, в том числе циркулирующие на одном предприятии, обладают разным фаготипом. Чувствительность к литическому действию бактериофага штамма M1 была низкой. Самая высокая чувствительность выявлена у *P. aeruginosa* 47 и B2. Штамм 42 к действию бактериофага был практически устойчив (рис. 4).

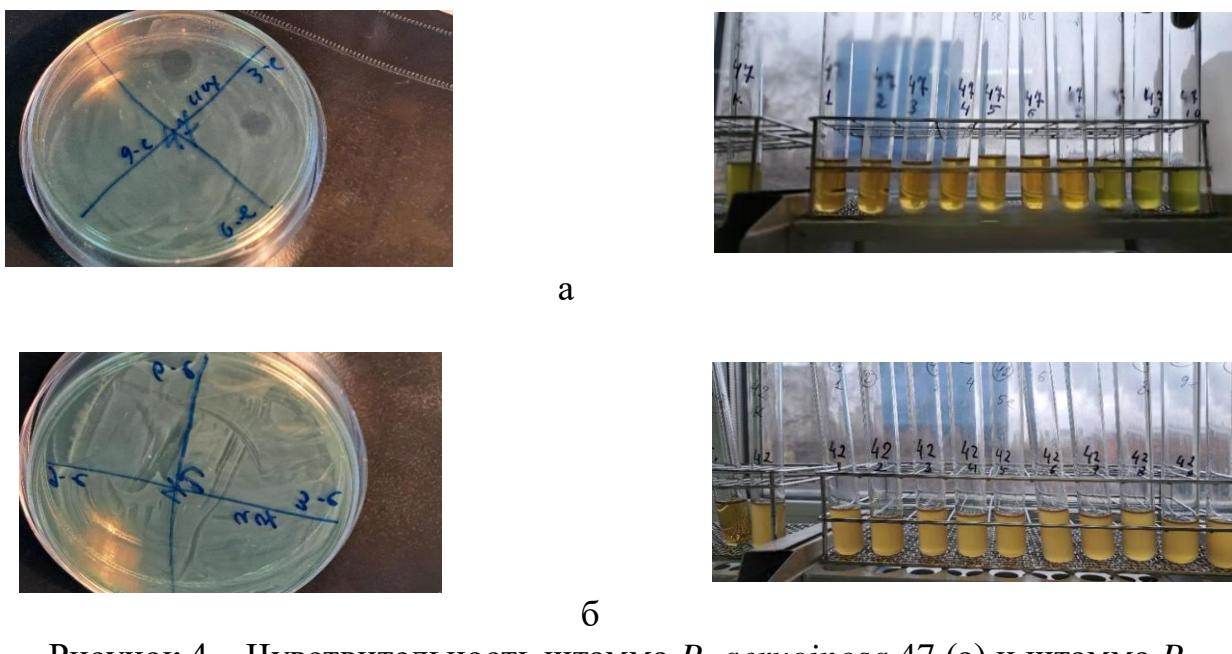


Рисунок 4 – Чувствительность штамма *P. aeruginosa* 47 (а) и штамма *P. aeruginosa* 42 (б) к препарату бактериофага синегнойного и его разведениям

Таким образом, применение данного фага для предотвращения развития выделенных штаммов *P. aeruginosa* нецелесообразно. Процедуры элиминации *P. aeruginosa* с использованием бактериофагов требуют всякий раз оценки эффективности препарата, с учетом возможной циркуляции на одном предприятии штаммов разного фаготипа, вплоть до резистентности.

Для оценки возможности снижения рисков развития *P. aeruginosa* при производстве ферментированных молочных продуктов изучено антагонистическое действие МКБ разных групп на *P. aeruginosa* в молоке методом сокульттивирования при температурах оптимальных для МКБ. Контролем являлся рост монокультуры *P. aeruginosa*. Сначала антагонистическую активность определяли по отношению к типовому штамму *P. aeruginosa* 25668 (рис. 5,6,7,8).

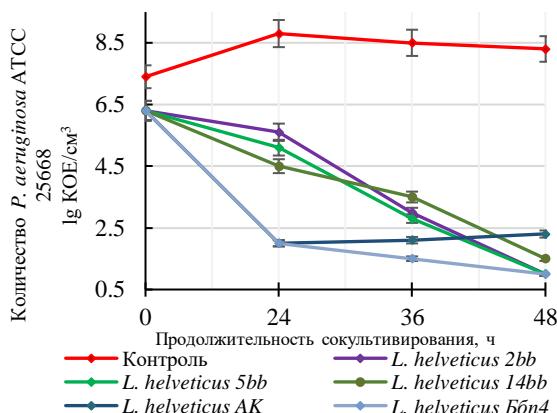


Рисунок 5 – Антимикробная активность *L. helveticus* по отношению к *P. aeruginosa* 25668

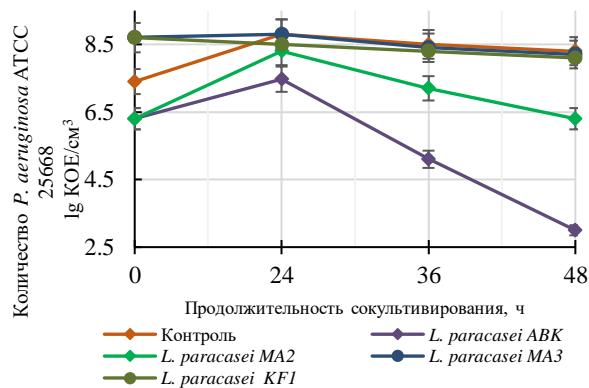


Рисунок 6 – Антимикробная активность *L. paracasei* по отношению к *P. aeruginosa* 25668

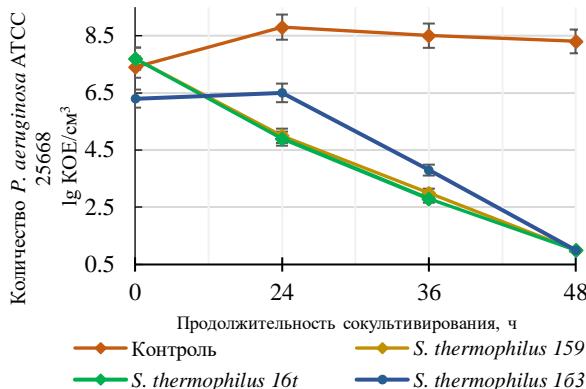


Рисунок 7 – Антимикробная активность *S. thermophilus* по отношению к *P. aeruginosa* 25668

Ингибирующее действие *L. helveticus* и *S. thermophilus* на типовой штамм *P. aeruginosa* 25668 было более выражено по сравнению с *L. paracasei* и *L. lactis*. Для подтверждения ингибирующих свойств относительно выделенных штаммов были выбраны *S. thermophilus* 16t и *L. helveticus* Ббн4.

Подтверждена высокая антимикробная активность *L. helveticus* Ббн4 по отношению к *P. aeruginosa* 47. Количество клеток *P. aeruginosa* через 24 ч снизилось на 5 порядков, с дальнейшим снижением к 48 ч сокульттивирования до $2,0 \times 10^3$ КОЕ/см³, по сравнению с $1,0 \times 10^9$ КОЕ/см³ в контроле. Ингибирующее действие *S. thermophilus* 16t на *P. aeruginosa* 47 было крайне незначительно, можно предположить наличие у него устойчивости к метаболитам *S. thermophilus* 16t (рис.9).

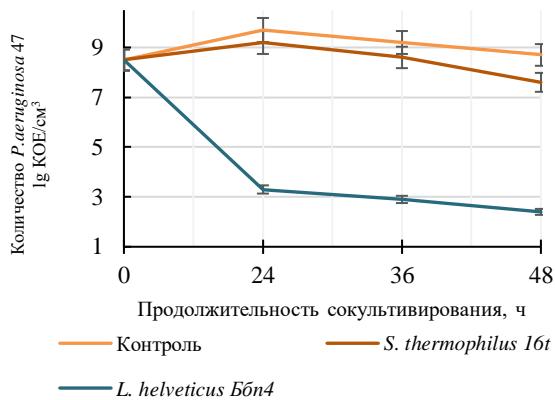


Рисунок 9 – Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* 47

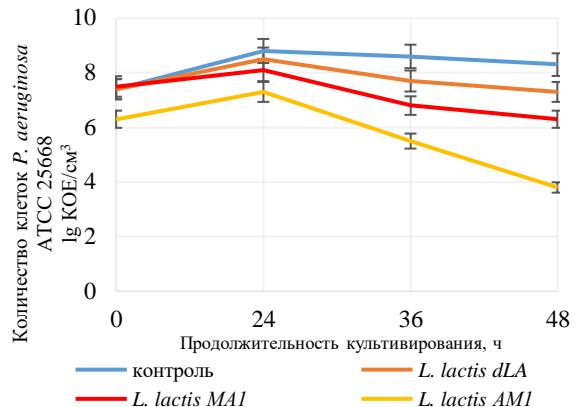


Рисунок 8 – Антимикробная активность *L. lactis* по отношению к *P. aeruginosa* 25668

Ингибирующее действие *L. helveticus* и *S. thermophilus* на типовой штамм *P. aeruginosa* 42 через 24 ч сокульттивирования было выражено в 5-6 раз, по сравнению с контролем (рис.10).

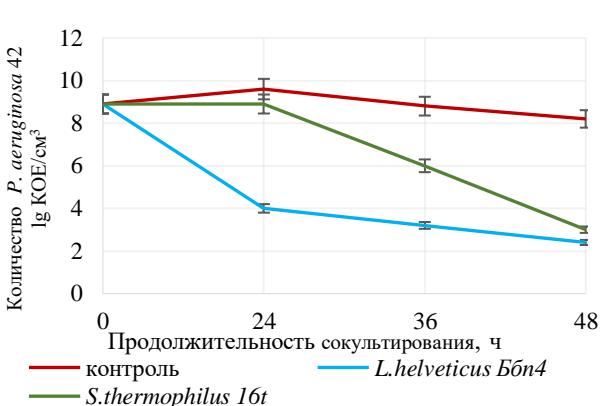


Рисунок 10 – Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* 42

При сокульттивировании *L. helveticus* Ббн4 и *P. aeruginosa* 42 через 24 ч количество клеток *P. aeruginosa* составило $1,0 \times 10^4$ КОЕ/см³, а через 48 ч – $2,0 \times 10^2$ КОЕ/см³ (рис.10). Ингибирующего действия *S. thermophilus* 16t на *P. aeruginosa* 42 через 24 ч не обнаружено; через 48 ч оно присутствовало, но было менее выражено по сравнению с *L. helveticus* Ббн4 – $1,5 \times 10^3$ КОЕ/см³.

Оба штамма МКБ оказывали значительное ингибирующее действие на *P. aeruginosa* M1 (рис.11), снижая количество клеток на 5,5-6 порядков через

48 ч, что согласуется с данными для типового штамма; действие *L. helveticus* Ббн4 было чуть более выраженным.

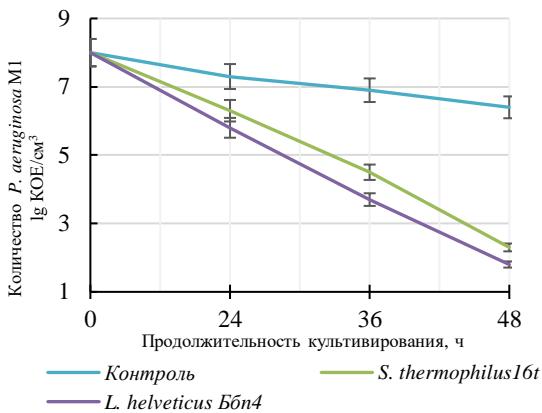


Рисунок 11 – Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* M1

При сокультивировании *L. helveticus* Ббн4 и *P. aeruginosa* B2 (рис.12), через 24 ч количество клеток *P. aeruginosa* снизилось на 2,5 порядка, а через 48 ч – ещё на 3 порядка до $1,7 \times 10^2$ КОЕ/см³. При сокультивировании с *S. thermophilus* 16t количество клеток *P. aeruginosa* B2 через 48 ч составило $4,5 \times 10^4$ КОЕ/см³; ингибирующее действие *L. helveticus* Ббн4 было сильнее.

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, и типовой *P. aeruginosa* 25668. Данные по антагонистической активности при сокультивировании типового штамма *P. aeruginosa* 25668 и лактобацилл *L. helveticus* NK1, *L. rhamnosus* F и грибковой кефирной закваски представлены на рисунке 13.

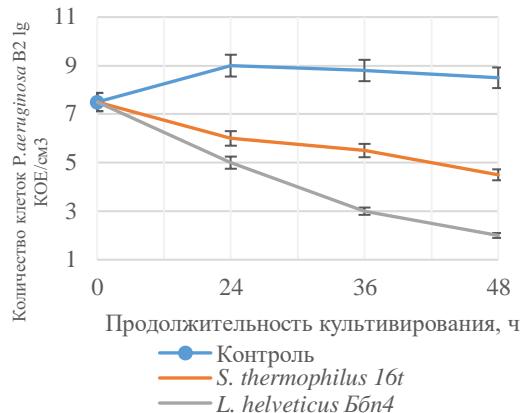


Рисунок 12 – Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* B2

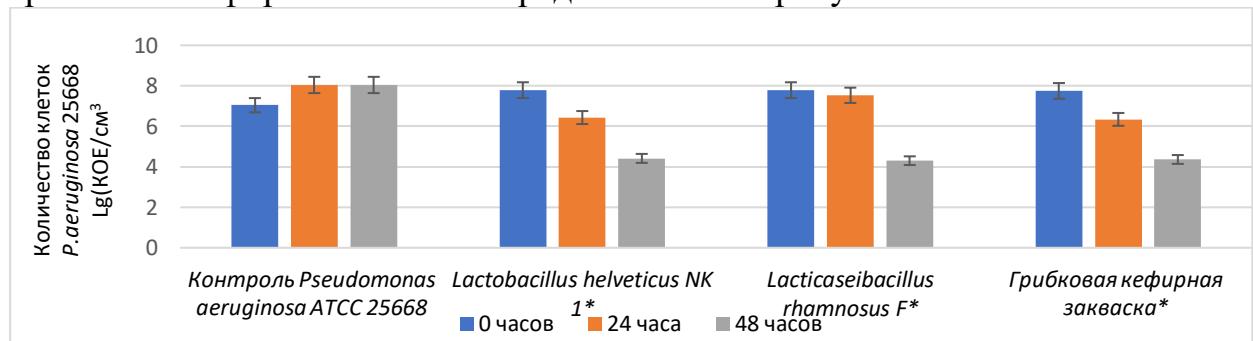


Рисунок 13 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 25668 в монокультуре и при сокультивировании* с лактобациллами и грибковой кефирной закваской

Подавление роста *P. aeruginosa* 25668 при сокультивировании со штаммом *L. helveticus* NK1 и грибковой кефирной закваской через сутки было примерно одинаково, снижаясь на 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. Через 48 ч сокультивирования во всех трех вариантах ингибирующее действие было примерно одинаковым: число клеток снижалось на три порядка.

Данные по антагонистической активности при совместном культивировании штамма *P. aeruginosa* 42, лактобацилл и грибковой кефирной закваски представлены на рисунке 14.

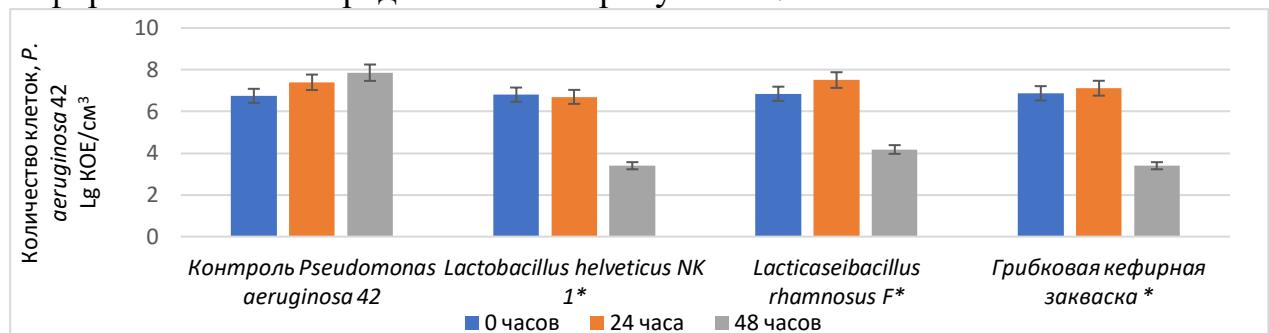


Рисунок 14 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 42 в монокультуре и при сокультивировании с лактобациллами и грибковой кефирной закваской

Ингибирующее действие МКБ через 24 ч сокультивирования практически отсутствовало. Через 48 ч количество клеток *P. aeruginosa* 42 снижалось на 3 порядка при сокультивировании с *L. helveticus* NK1 и с грибковой кефирной закваской и на 2 порядка – с *L. rhamnosus* F.

При сокультивировании *P. aeruginosa* 47 с *L. helveticus* NK1 через 24 ч количество клеток снижалось на 4 порядка и еще на 2 порядка через 48 ч (рис. 15).

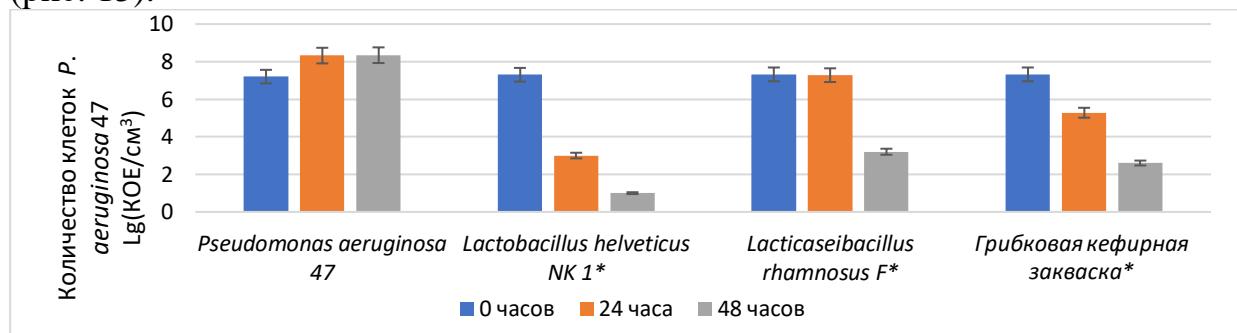


Рисунок 15 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 47 в монокультуре и при сокультивировании* с лактобациллами и грибковой кефирной закваской

Ингибирующий эффект грибковой кефирной закваски был менее заметным – количество клеток *P. aeruginosa* 47 снижалось на 5 порядков через 48 ч сокультивирования. Влияние *L. rhamnosus* F через 24 ч практически отсутствовало; через 48 ч антагонистический эффект возрастал – количество клеток *P. aeruginosa* 47 снижалось на 4 порядка. Таким образом, подтверждена высокая антагонистическая активность лактобацилл *L. helveticus* Ббн4, *L. helveticus* NK1, грибковой кефирной закваски и их метаболитов относительно условно-патогенных бактерий *P. aeruginosa*, как типового, так и выделенных штаммов. Причем *L. helveticus* NK1 при сокультивировании с *P. aeruginosa* 47 подавлял рост патогена практически полностью. Оценка характера роста на молоке через 48 ч монокультуры *P. aeruginosa* 47, и при сокультивировании с *L. rhamnosus* F, *L. helveticus* NK1 и грибковой кефирной закваской выявила корреляцию визуальных изменений молока с антагонистическим действием культур (рис. 16).

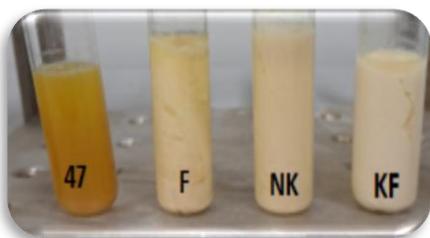


Рисунок 16 – выраженные признаки порчи молока при росте монокультуры *P. aeruginosa* 47; незначительные признаки при сокультивировании с *L. rhamnosus* F; отсутствие визуальных признаков порчи при сокультивировании с *L. helveticus* NK1 и грибковой кефирной закваской KF.

Возможны 2 вида антагонизма МКБ по отношению к патогенам – неспецифический – за счет образования молочной кислоты; и специфический – за счет минорных соединений. Исходя из установленной высокой антагонистической активности штамма *L. helveticus* NK1, представляло интерес изучение возможных механизмов его ингибирующего действия на *P. aeruginosa*. Сравнительный протеомный и метаболомный анализ образцов монокультуры *L. helveticus* NK1 и при сокультивировании с *P. aeruginosa* 25668 (среда MRS) через 24 и 48 ч показал различия в белковых и метаболитных профилях. В присутствии патогена увеличивалось образование белков биогенеза и ремоделирования клеточной стенки лактобациллы (N-ацетилмурамидаза и др.), усиливалась продукция белков энергетического обмена (пируваткиназа, L-лактатдегидрогеназа и др.), участвующих в протеолизе, метаболизме жирных и аминокислот. 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.

Усиливалась секреция некоторых белков S-слоя. При сокультивировании с *P. aeruginosa* обнаружен уникальный белок, показавший высокую степень гомологии с SLAP-доменом содержащим белком (MBU5980144.1). Он содержит на С-конце два SLAP-домена, отвечающих за присоединение к клеточной стенке бактерий, и на N-конце домен пептидогликангидролазы. 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.

Сравнение метаболитных профилей культуральной среды, инокулированной монокультурой *L. helveticus* NK1 и при сокультивировании с *P. aeruginosa* 25668 представлено в виде тепловой карты с иерархической кластеризацией (рис.17).

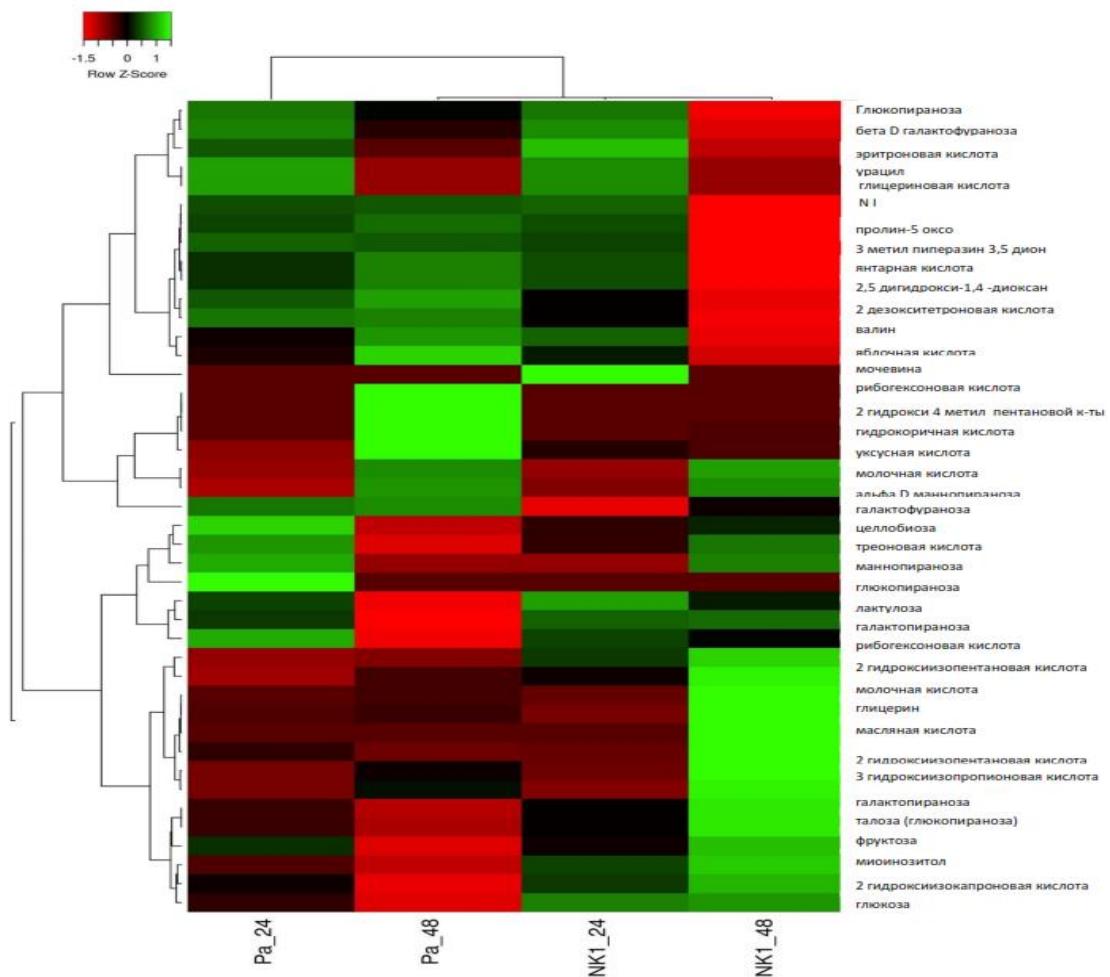


Рисунок 17 – Метаболитные профили культуральных сред, инокулированных монокультурой *L. helveticus* NK1 (NK1_24 и NK1_48) и при сокультивировании с *P. aeruginosa* 25668 (Pa_24 и Pa_48)

При сокультивировании в течение 24 ч в ростовой среде обнаружено увеличение содержания углеводов (маннопиранозы, галактопиранозы и др.), в сравнении с монокультурой *L. helveticus* NK1, что может говорить об усилении синтеза ЭПС в присутствии *P. aeruginosa*. Через 48 ч возрастало содержание органических кислот – малата, сукцината, гидрокоричной и др. Увеличение доли интермедиатов цикла Кребса свидетельствует об усилении метаболической активности *L. helveticus* NK1 в присутствии конкурента. Обнаруженная гидрокоричная кислота играет ключевую роль в реакциях на стресс, включая присутствие конкурента, обладая антимикробными свойствами. Также при сокультивировании обнаружено повышение содержания валина и 2-гидроксизовалериановой, 2-гидроксизокапроновой, 2-гидрокси-3-метилвалериановой кислот, образующихся в результате метаболизма L-валина, L-изолейцина и L-лейцина в клетках МКБ и ингибирующих рост патогенных грамотрицательных бактерий. 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.

Следующим этапом было изучение эффективности элиминации *P. aeruginosa* в зависимости от температурно-временных параметров среды при исследовании пастеризации и хранении молока. Изучали 3 температурных режима пастеризации молока: $(76\pm2)^\circ\text{C}$ – для питьевого молока; $(72\pm2)^\circ\text{C}$ применяемый в сыроподелии и $(85\pm2)^\circ\text{C}$ – при производстве кисломолочных продуктов. При стандартном режиме пастеризации молока $(76\pm2)^\circ\text{C}$ 20 сек исходное количество клеток *P. aeruginosa* соответствовало $5,3\times10^3$ - $7,1\times10^3$ КОЕ/см³. Сразу после термической обработки образцов у всех изученных штаммов при высеивании на питательную среду бактериальный рост отсутствовал. Однако, через 7 и 14 суток холодильного хранения при температуре $(4\pm2)^\circ\text{C}$, в опытных образцах были обнаружены жизнеспособные клетки (рис.18).

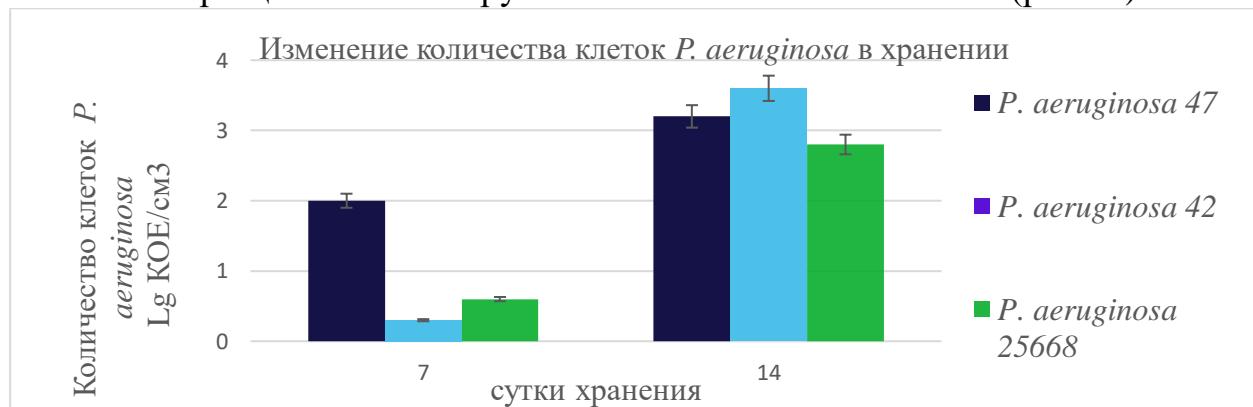


Рисунок 18 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* после термической обработки $(76\pm2)^\circ\text{C}$ на 7-е и 14-е сутки хранения

Через 7 суток холодильного хранения, штамм *P. aeruginosa* 47 показал рост колоний в количестве $7,6\times10^1$ КОЕ/см³, с увеличением количества клеток примерно на два порядка 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 обнаружены единичные колонии, с увеличением количества жизнеспособных клеток к 14 суткам 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 обработки, часть клеток *P. aeruginosa* утратила способность к росту непосредственно после термошока, но осталась жизнеспособной, показав способность к реактивации и росту при холодильном хранении. Количество клеток, образующих колонии к 14 суткам холодильного хранения, у обоих выделенных штаммов было примерно одинаково. У *P. aeruginosa* 47 можно предположить большую термотолерантность, исходя из более короткого периода восстановления. К эффективной элиминации привело значительное увеличение времени воздействия – до 5 минут и более.

Эффективность элиминации *P. aeruginosa* при температуре $(72\pm2)^\circ\text{C}$ определяли при времени выдержки 20, 40, 60 сек; 5, 10 и 15 мин. Результаты эффективности элиминации штамма *P. aeruginosa* 47 при температуре $(72\pm2)^\circ\text{C}$ и времени выдержки 20, 40 и 60 сек, представлены на рис. 19-20.

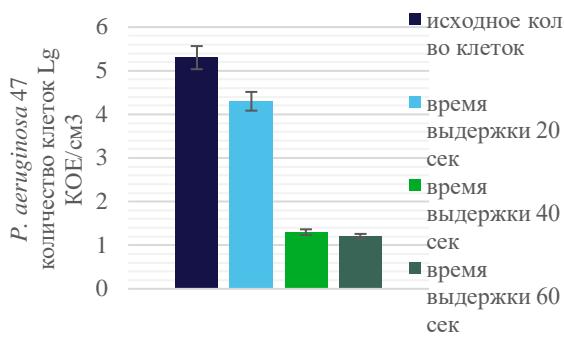


Рисунок 19 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 47 после термической обработки $(72\pm2)^\circ\text{C}$

Жизнеспособные клетки, образующие колонии при исходном количестве $1,8\times10^5$ КОЕ/см³ выявлены сразу при всех трех периодах выдержки. Наименее эффективным был режим $(72\pm2)^\circ\text{C}$ 20 сек – количество клеток штамма *P. aeruginosa* 47 снизилось только на 1 порядок: с $1,8\times10^5$ КОЕ/см³ до $1,9\times10^4$ КОЕ/см³. Через 7 суток холодильного хранения опытных образцов количество клеток увеличивалось – до $3,5\times10^6$ КОЕ/см³; и к 14 суткам – до $5,4\times10^6$ КОЕ/см³. При времени выдержки 40 сек и 60 сек, количество клеток снизилось на 4 порядка в обоих вариантах – до $1,8\times10^1$ КОЕ/см³. На 7-е сутки холодильного хранения количество клеток увеличилось до $3,0\times10^6$ КОЕ/см³ и $5,7\times10^5$ КОЕ/см³ при 40 и 60 сек выдержки, соответственно, что подтверждает возможность порчи готовой продукции в хранении.

У штамма *P. aeruginosa* 42 также обнаружен рост сразу после термического воздействия $(72\pm2)^\circ\text{C}$ (рис. 21). При выдержке 20 сек количество клеток снизилось с $2,2\times10^5$ до $5,0\times10^4$ КОЕ/см³. При выдержке 40 сек количество клеток снизилось на 4 порядка – до $2,8\times10^1$ КОЕ/см³. При выдержке 60 сек обнаружен рост единичных колоний. К 7 суткам количество клеток увеличилось до $1,3\times10^6$ КОЕ/см³, $1,0\times10^5$ КОЕ/см³, $3,7\times10^4$ КОЕ/см³ при времени выдержки 20, 40 и 60 сек соответственно, с выходом на плато к 14 суткам хранения (рис.22).

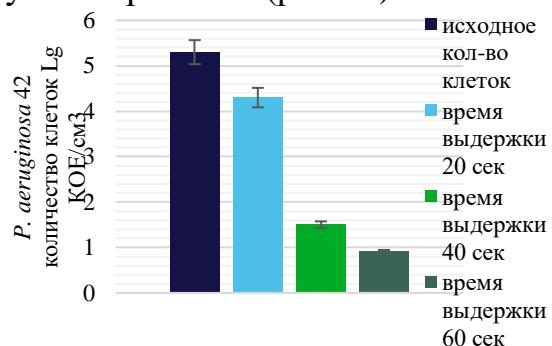


Рисунок 21 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 42 после термической обработки $(72\pm2)^\circ\text{C}$

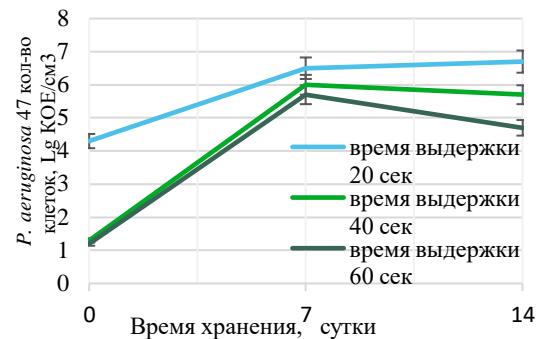


Рисунок 20 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 47 после термической обработки $(72\pm2)^\circ\text{C}$ в хранении

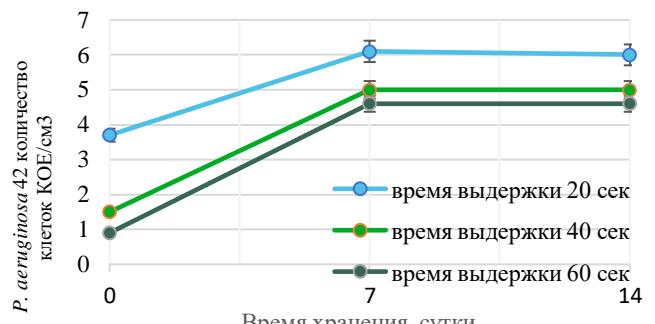


Рисунок 22 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 42 после термической обработки $(72\pm2)^\circ\text{C}$ в хранении

У типового штамма *P. aeruginosa* 25668 при $(72\pm2)^\circ\text{C}$ также наблюдался рост сразу после термического воздействия (рис.23). При выдержке 20 секунд количество клеток снизилось с $1,9\times10^5$ до $5,3\times10^4$ КОЕ/см³, 40 сек – до $1,8\times10^1$ КОЕ/см³, 60 сек – обнаруживались единичные колонии. К 7 суткам хранения количество клеток увеличилось до $3,3\times10^6$ КОЕ/см³, $1,8\times10^5$ КОЕ/см³, $7,7\times10^4$ КОЕ/см³ при выдержке 20, 40 и 60 секунд соответственно, с выходом на плато и некоторым снижением количества клеток к 14 суткам холодильного хранения (рис.24).

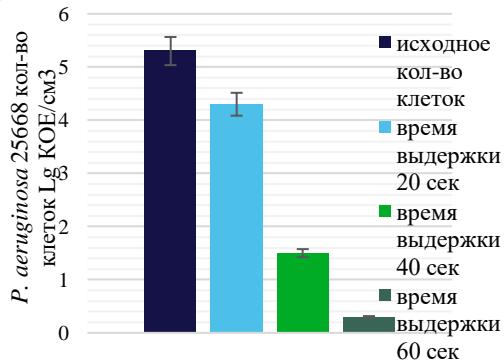


Рисунок 23 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 25668 после термической обработки $(72\pm2)^\circ\text{C}$

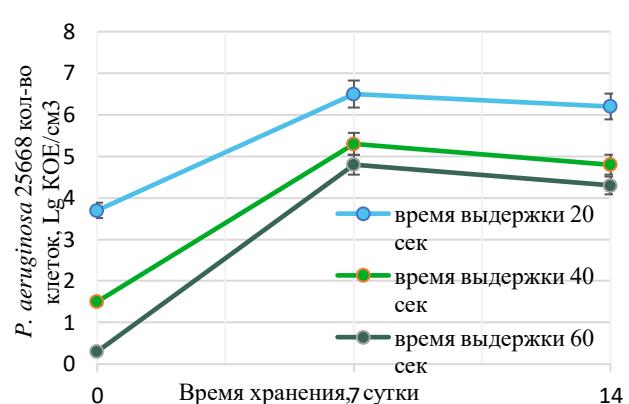


Рисунок 24 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 25668 после термической обработки $(72\pm2)^\circ\text{C}$ в хранении

К 14 суткам холодильного хранения в опытных пробирках наблюдалась визуальные признаки порчи – изменение цвета, пленочный рост. Таким образом, термическая обработка при $(72\pm2)^\circ\text{C}$ при выдержке 20, 40 и 60 секунд была недостаточно эффективна для элиминации *P. aeruginosa*.

Для определения временных параметров эффективной элиминации *P. aeruginosa* при температуре $(72\pm2)^\circ\text{C}$ контаминированное молоко подвергалось термическому воздействию в течение 5, 10 и 15 мин. Выдержка 5 и 10 мин при данной температуре не исключала сохранение единичных жизнеспособных форм ($1\text{-}3$ КОЕ/см³) и способности их к реактивации в течение срока хранения 14 суток. Роста клеток в течение 14 суток не выявлено только при 15-минутной выдержке. Таким образом, критическим параметром стало время выдержки 15 минут при 72°C . Для определения временных параметров эффективной элиминации *P. aeruginosa* при температуре $(85\pm2)^\circ\text{C}$ контаминированное молоко подвергалось термическому воздействию 20 сек, 10 и 15 мин. Сразу после термического воздействия рост бактерии не обнаруживался. На 7 и 14 сутки холодильного хранения у штаммов выявлялись единичные жизнеспособные колонии. При выдержке 10 и 15 мин рост клеток не был обнаружен в течение всего срока хранения. Таким образом, подтверждаются литературные данные о способности отдельных клеток *P. aeruginosa* выдерживать тепловую обработку, предусмотренную технологическими режимами. Наиболее высокие риски существуют для сыроделия – температура $(72\pm2)^\circ\text{C}$ недостаточно эффективна для элиминации

P. aeruginosa; а психротрофность позволяет ей развиваться при холодильном хранении. Менее значимы риски при производстве кисломолочных продуктов.

Эффективность действия биоцидных препаратов на *P. aeruginosa* изучали с использованием средств на основе дихлоризоцианурата натрия (ДХЦН), оцениваемых как «образцовые» биоциды и рекомендованных к применению в молочной отрасли и дезинфицирующего средства нейтральный анолит, в том числе с добавлением поверхностно-активных веществ (ПАВ). Для штаммов *P. aeruginosa* 25668 и 42 подтверждена эффективность дезинфицирующих растворов. Однако штамм *P. aeruginosa* 47 показал большую жизнеспособность при действии анолита с добавлением ПАВ, а после третьего пассажа обнаружил рост как после действия чистого анолита, так и растворов ДХЦН с содержанием хлора (АХ) 150 мг/дм³ (табл. 4).

Таблица 4 – Ингибирующее действие дезинфицирующих растворов на рост *P. aeruginosa* 47

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

Эффективное биоцидное действие отмечено только при повышенной концентрации ДХЦН 585 мг/дм³. На предприятии, где выделены штаммы псевдомонад, регулярно проводилась дезинфекция, в т.ч. с применением ДХЦН. Возникновение резистентности среди циркулирующих штаммов весьма вероятно. В растворах с добавлением ПАВ рост патогена обнаруживался раньше, чем без добавления. Исходя из этого, сравнили способность *P. aeruginosa* сохранять жизнеспособность непосредственно в растворе ПАВ аминоксида (0,03 % о.в.) через 24, 48 ч; 5 и 60 суток (табл. 5).

Таблица 5 – 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 | $2,2 \times 10^7$ | $7,8 \times 10^4$ | $5,6 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^7$ | $2,9 \times 10^5$ |

Штаммы сохраняли жизнеспособность в ПАВ без добавления дополнительных питательных веществ до 60 суток, со снижением количества жизнеспособных клеток на 1–2 порядка по сравнению с исходным. Адаптируясь к неблагоприятным условиям, штаммы демонстрировали уменьшение размеров колоний, возможно связанное с изменением питательных потребностей, усиление слизеобразования, изменение пигментации (рис.25).

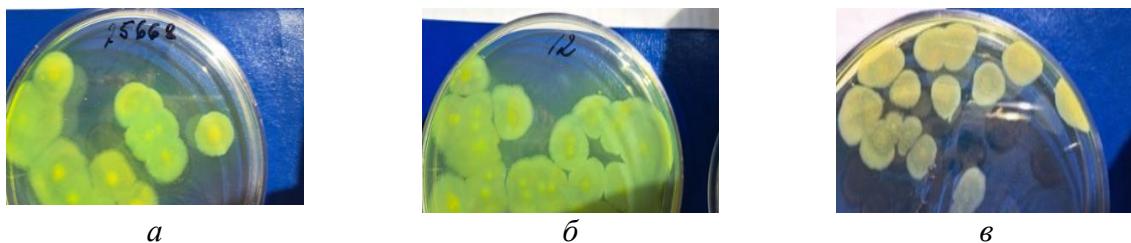


Рисунок 25 – Колонии *P. aeruginosa* через 60 суток культивирования в ПАВ

При микроскопии *P. aeruginosa* после 60 суток культивирования в ПАВ обнаружены морфологические изменения - клетки имели нетипичную форму с тенденцией к увеличению в размерах и образованию цепочек (рис 26).



Рисунок 26 – Морфология клеток *P. aeruginosa* 47: а – до культивирования в ПАВ и б – после 60 суток культивирования в ПАВ

Добавление ПАВ к биоцидным средствам считают оптимальной процедурой деконтаминации, обеспечивающей более полный контакт действующих веществ с поверхностью и клеточными стенками микроорганизмов. Однако, с учетом возможной циркуляции на производстве псевдомонад, данная процедура может иметь неоднозначный эффект, за счет изменения метаболизма и возможности циркуляции на предприятии форм с различной чувствительностью к антимикробным агентам, вплоть до резистентности.

По результатам исследования 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. 6).

Таблица 6 – 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 | |

Социально-экономическое значение работы заключается в повышении качества и безопасности молочных продуктов, за счет усовершенствования микробиологического контроля при их производстве и предотвращения попадания *P. aeruginosa* в пищевые цепочки человека. Работа предлагает

комплексный подход к обеспечению безопасности молочных продуктов, сочетающий биологический контроль и оптимизацию температурно-временных параметров обработки молока.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ:

1. Проведен обзор научно-технической литературы, освещающий вопросы метаболизма *P. aeruginosa*, персистенции бактерии на молочных производствах и в природных объектах, методических принципов идентификации и методов её 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 $(6\pm1)^\circ\text{C}$, наибольшая – при температуре $(37\pm2)^\circ\text{C}$.
4. Определена чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к действию биологических антимикробных агентов. Показана разная чувствительность к лизическому действию синегнойного бактериофага и установлена нецелесообразность применения данного фага для предотвращения развития выделенных штаммов *P. aeruginosa*.

Подтверждена высокая антагонистическая активность *L. helveticus* Ббп4, *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 антимикробных 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 работ, опубликованных автором по теме диссертации
Статьи в журналах, входящих в международные реферативные базы
данных и системы цитирования Web of Science и Scopus

1. **Kishilova, S. A.** The Antimicrobial Activity of Metabolite Complexes of Lactobacilli against *Pseudomonas aeruginosa* / S. A. Kishilova, A. Y. Kolokolova, I. V. Rozhkova // Biophysics. – 2024. – Vol. 69, No. 2. – P. 278-284. – DOI: 10.1134/S0006350924700337.
2. Irina Rozhkova et al. Microbial persistence in pasteurized milk: Biocontrol and heat treatment optimization. / Irina Rozhkova, **Svetlana Kishilova**, Natalia Pryanichnikova, Victoria Leonova, Elena Illarionova, Andrey Petrov // APPLIED FOOD BIOTECHNOLOGY. – 2025. – V. 12 (1): e15. DOI: 10.22037/afb.v12i1.48596.
3. **Кишилова С. А.** Сравнительная оценка антагонистической активности коллекционных лактобацилл в отношении полирезистентных *Klebsiella pneumoniae* / С. А. Кишилова, И. В. Рожкова, Р. П. Терехова, Е. А. Юрова // Вопросы питания. – 2023. – Т. 92. – №. 6 (550). – С. 120-127. DOI: 10.33029/0042-8833-2023-92-6-120-127.
4. **Кишилова С. А.** Проблемы общественного здоровья и санитарии, связанные с бактерией *Pseudomonas aeruginosa* / С. А. Кишилова, И. В. Рожкова, О. Ю. Фоменко // Пищевые системы – 2025. – Т. 8 – №1. – С.49-57. DOI: 10.21323/2618-9771-2025-8-1-49-57.

Статьи в изданиях, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ (К1 и К2)

5. **Кишилова С. А.** Оценка действия биоцидных агентов на штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, выделенные с оборудования молочной фермы / С. А. Кишилова, Б. В. Маневич, И. В. Рожкова // Пищевая промышленность. – 2024. – №.11 – С. 71–76. DOI: 10.52653/PPI.2024.11.11.013.
6. **Кишилова С. А.** Оценка эффективности действия синегнойного бактериофага к штаммам *Pseudomonas aeruginosa*. / С. А. Кишилова, И. В. Рожкова // Пищевая промышленность. – 2024. – №.11. – С. 77-81. DOI: 10.52653/PPI.2024.11.11.014.

7. **Кишилова С.А.** Сравнительная оценка ферментативной активности штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных на молочных производствах / С. А. Кишилова, В. А. Леонова, И. В. Рожкова, О. Ю. Фоменко // Пищевая промышленность. – 2025. – №4. – С.140-145. DOI: 10.52653/PPI.2025.4.4.026.
8. **Кишилова С. А.** Влияние температуры пастеризации молока на выживаемость *Pseudomonas aeruginosa* / С. А. Кишилова, И. В. Рожкова, О. Ю. Фоменко // Пищевая промышленность. – 2025. – №.4 – С.129-134. DOI: 10.52653/PPI.2025.4.4.024.

Статьи в материалах конференций и журналах, индексируемых в РИНЦ

9. **Кишилова, С. А.** Перспективы использования пробиотических организмов для разработки альтернативных стратегий дезинфекции и профилактики инфекционных заболеваний / С. А. Кишилова // Пищевая метаинженерия. – 2023. – Т. 1, № 3. – С. 66-83. – DOI: 10.37442/fme.2023.3.23.
10. **Кишилова С. А.,** Леонова В. А. Сравнительная оценка антимикробной активности штаммов молочнокислых бактерий по отношению к *Pseudomonas aeruginosa* //FOOD METAENGINEERING. – 2025. – Т. 3. – №. 1. – С. 42-55. <https://doi.org/10.37442/fme.2025.1.72>
11. Колоколова, А. Ю. Проблемы безопасности пищевых продуктов, связанных с бактерией *Pseudomonas aeruginosa* / А. Ю. Колоколова, С. А. **Кишилова** // Пищевые инновации и биотехнологии: Сборник тезисов XII Всероссийской (национальной) научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, Кемерово, 16 мая 2024 года. – Кемерово: Кемеровский государственный университет, 2024. – С. 317-319.
12. **Кишилова, С. А.** Корреляция чувствительности штаммов *P. aeruginosa* к действию биоцидных веществ, метаболитных комплексов лактобацилл и синегнойному бактериофагу / С. А. Кишилова // Сборник тезисов XXIV Международной Научно-практической конференции, посвященной памяти В. М. Горбатова Москва, 4-5 декабря 2024 года. – Москва: С. 70-74.
13. **Кишилова, С. А.** Оценка чувствительности штаммов *P. aeruginosa* к биоцидным агентам / Кишилова С. А., Рожкова И. В. // Научно-практическая конференция с международным участием «Перспективы дезинфектологии. Актуальные вопросы обработок в современном пищевом производстве» Москва, 19-20 ноября 2024 года.
14. **Кишилова, С. А.** Возможность сохранения жизнеспособности *P. aeruginosa* в молоке после процедуры пастеризации / Кишилова, С. А., Алакдур М. И. // VII Международная научно-практическая конференция Поландовские чтения. Сборник материалов. ООО «Белый Ветер». – 2025 – 291. С. 140-143.

Перечень сокращений и условных обозначений:

КОЕ – колониеобразующая единица;
МКБ – молочнокислые бактерии;
ПАВ – поверхностно-активные вещества;
ДХЦН – натриевая соль дихлоризоциануровой кислоты;
АХ – активный хлор МКБ – молочнокислые микроорганизмы;
ЭПС – экзополисахариды;
МР – методические рекомендации;
НД – нормативные документы