

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
Рожкова Ирина Владимировна Кандидат биологических наук
Научный консультант: **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 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.

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* МА1, *L. lactis* АМ1, *L. lactis subsp. diacetylactis* dLA, *Streptococcus thermophilus* 16t, *S. thermophilus* 163, *S. thermophilus* 159, *Lacticaseibacillus paracasei* АВК, *L. paracasei* МА2, *L. paracasei* МА3, *L. paracasei* КF1, *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.

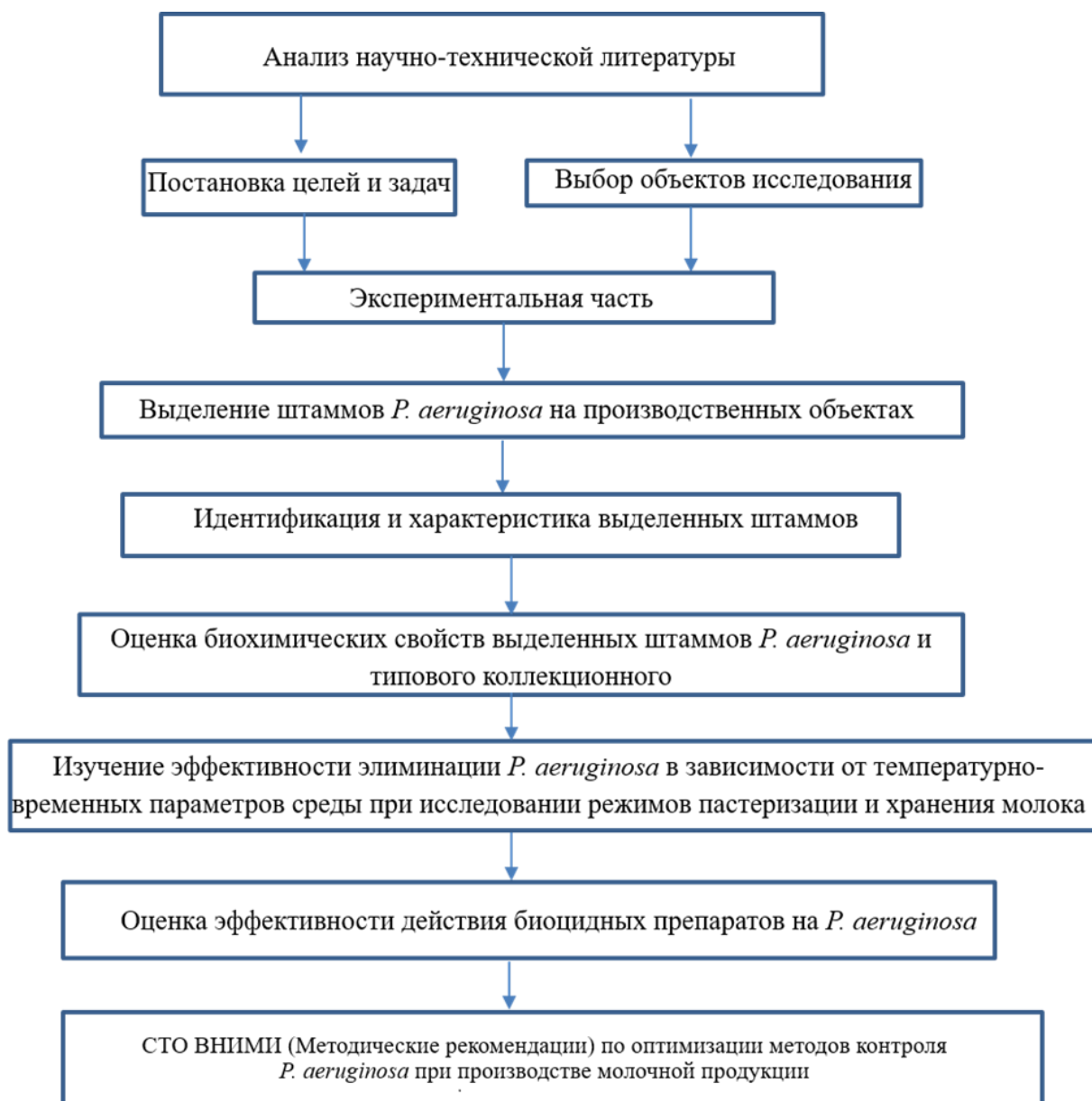


Рисунок 1 – Схема проведения исследований

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 $(37\pm 1)^\circ\text{C}$ отмечались визуальные отличия в характере роста штаммов, что возможно связано с отличиями в работе их ферментов (рис. 3).

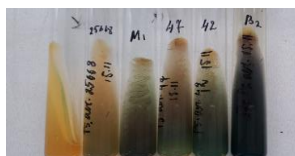


Рисунок 2 – Образование штаммами пигмента на среде СПА: контроль среды; *P. aeruginosa* 25668; M1; 47; 42; B2 (слева направо)

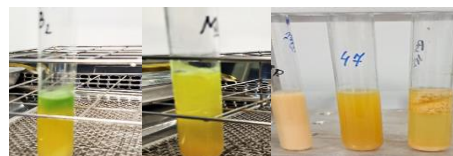


Рисунок 3 – Характер роста на молоке штаммов *P. aeruginosa*: B2, M1, 25668; 47, 42 (слева направо)

Исходя из предполагаемой корреляции пигментообразования 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	тетрациклин	левомецетин	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 ариламидаза	3,0	3,0	3,0	4,0	5,0

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

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)

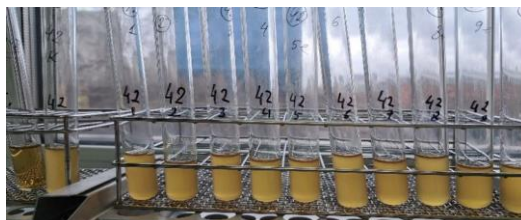
штамм	Разведения бактериофага			
	исх	3-е	6-е	9-е
25668	++++	+/-	-	-
42	+/-	-	-	-
47	++++	+++	-	-
M1	+	-	-	-
B2	++++	+++	+/-	-

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).



а



б

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 сокультивирования 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).

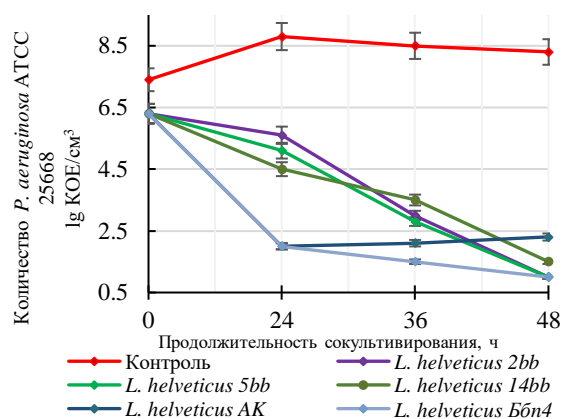


Рисунок 5 – Антимикробная активность *L. helveticus* по отношению к *P. aeruginosa* 25668

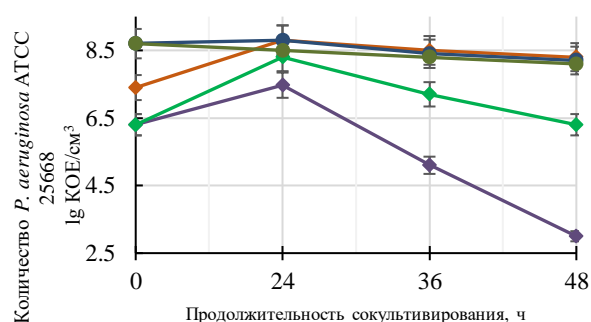


Рисунок 6 – Антимикробная активность *L. paracasei* по отношению к *P. aeruginosa* 25668

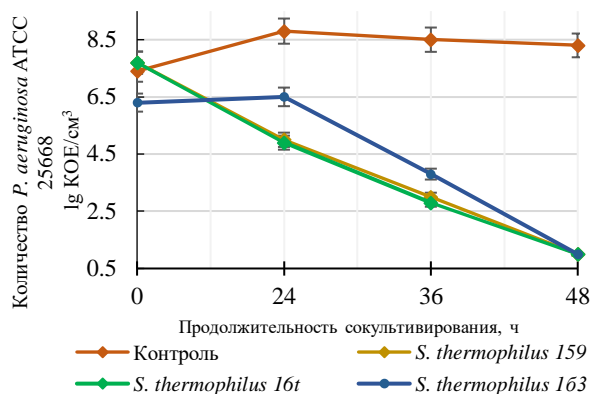


Рисунок 7 – Антимикробная активность *S. thermophilus* по отношению к *P. aeruginosa* 25668

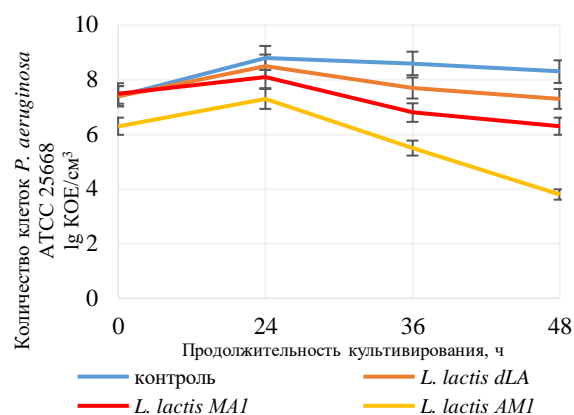


Рисунок 8 – Антимикробная активность *L. lactis* по отношению к *P. aeruginosa* 25668

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 *P. aeruginosa* 47. Количество клеток *P. aeruginosa* через 24 ч снизилось на 5 порядков, с дальнейшим снижением к 48 ч сокультивирования 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).

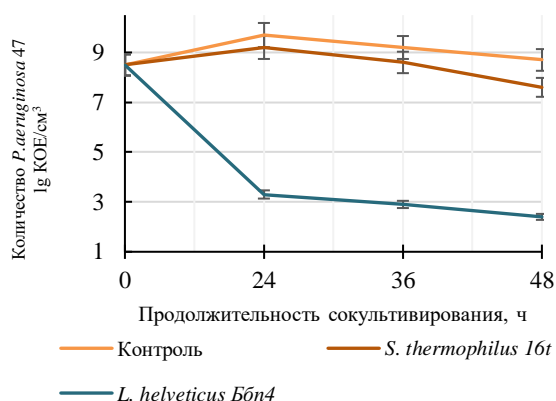


Рисунок 9 – Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* 47

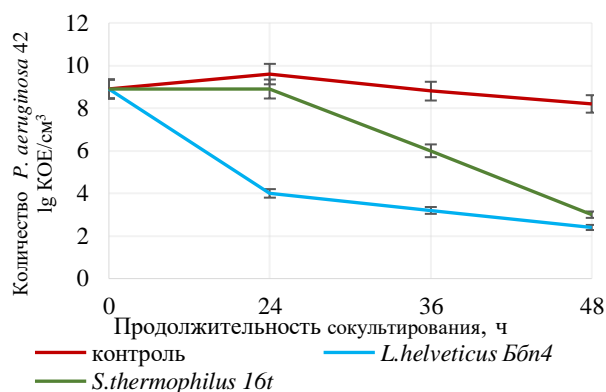


Рисунок 10 – Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa*

При сокультивировании *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.

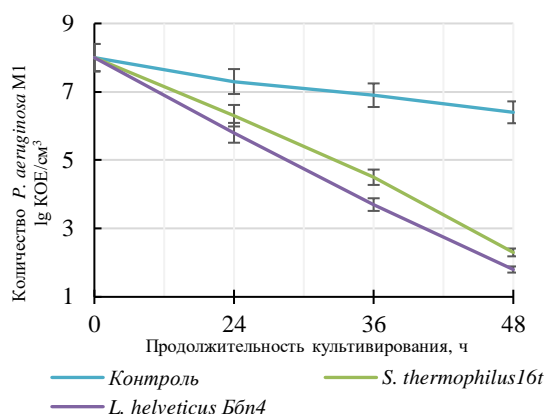


Рисунок 11 – Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* M1

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.

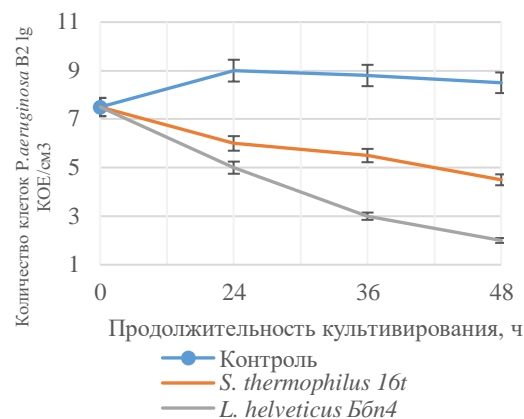


Рисунок 12 – Антимикробная активность штаммов МКБ по отношению к *P. aeruginosa* B2

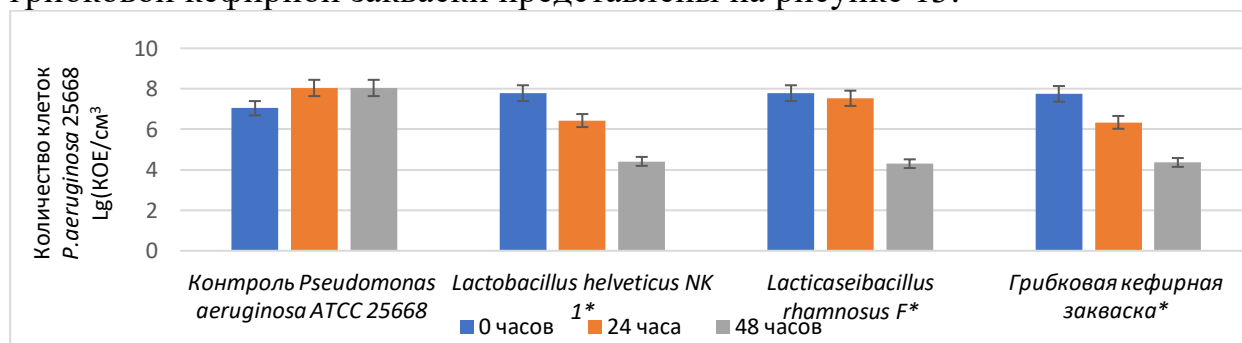


Рисунок 13 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 25668 в монокультуре и при сокультивировании* с лактобациллами и грибковой кефирной закваской

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.

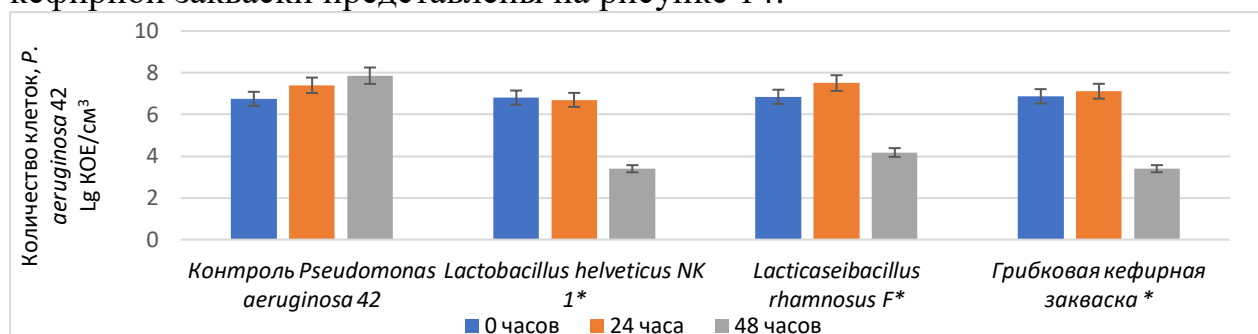


Рисунок 14 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 42 в монокультуре и при сокультивировании с лактобациллами и грибковой кефирной закваской

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).

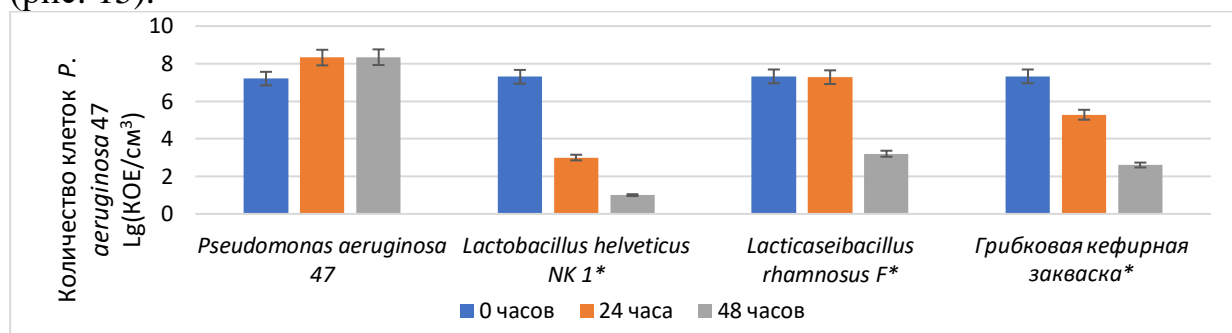


Рисунок 15 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 47 в монокультуре и при сокультивировании* с лактобациллами и грибковой кефирной закваской

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* Ббп4, *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).

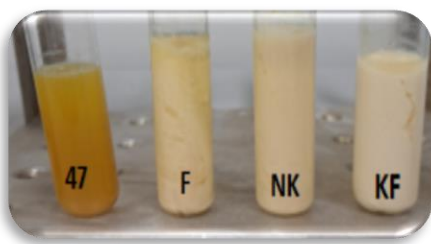


Рисунок 16 – выраженные признаки порчи молока при росте монокультуры *P. aeruginosa* 47; незначительные признаки при сокультивировании с *L. rhamnosus* F; отсутствие визуальных признаков порчи при сокультивировании с *L. helveticus* NK1 и грибковой кефирной закваской KF .

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-домен содержащим белком (MBU5980144.1). Он содержит на C-конце два SLAP-домена, отвечающих за присоединение к клеточной стенке бактерий, и на N-конце домен пептидогликангидролазы. Наличие в структуре молекулы SLAP-домена характерно 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).

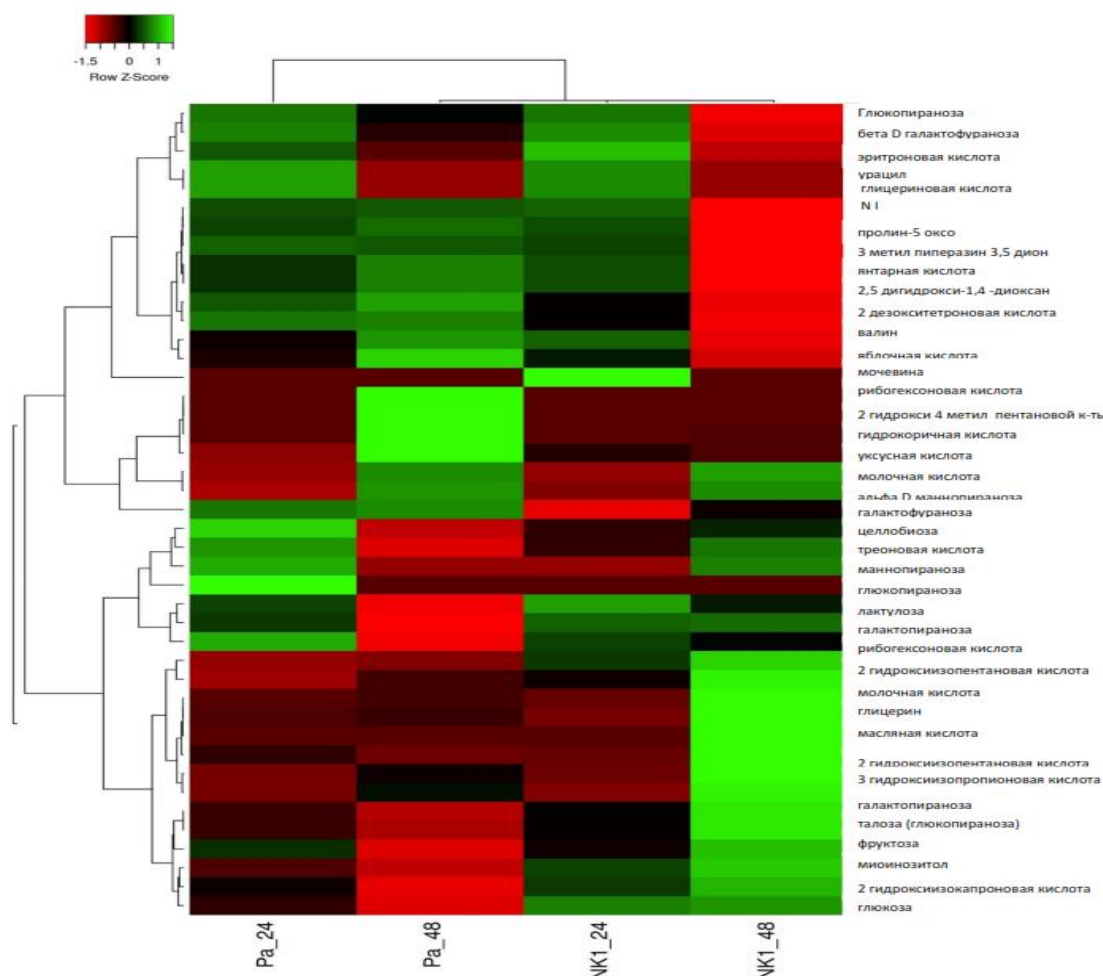


Рисунок 17 – Метаболитные профили культуральных сред, инокулированных монокультурой *L. helveticus* NK1 (NK1_24 и NK1_48) и при сокультивировании с *P. aeruginosa* 25668 (Pa_24 и Pa_48)

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-гидроксиизовалериановой, 2-гидроксиизокапроновой, 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: $(76\pm 2)^{\circ}\text{C}$ – для питьевого молока; $(72\pm 2)^{\circ}\text{C}$ применяемый в сыроделии и $(85\pm 2)^{\circ}\text{C}$ – при производстве кисломолочных продуктов. При стандартном режиме пастеризации молока $(76\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 20 сек исходное количество клеток *P. aeruginosa* соответствовало $5,3\times 10^3$ – $7,1\times 10^3$ КОЕ/см³. Сразу после термической обработки образцов у всех изученных штаммов при высеве на питательную среду бактериальный рост отсутствовал. Однако, через 7 и 14 суток холодильного хранения при температуре $(4\pm 2)^{\circ}\text{C}$, в опытных образцах были обнаружены жизнеспособные клетки (рис.18).

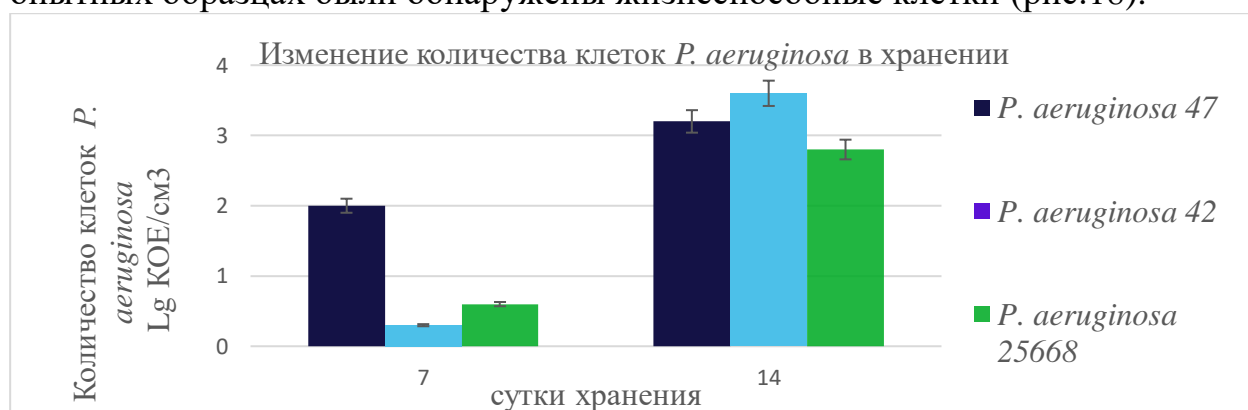


Рисунок 18 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* после термической обработки $(76\pm 2)^{\circ}\text{C}$ на 7-е и 14-е сутки хранения

Через 7 суток холодильного хранения, штамм *P. aeruginosa* 47 показал рост колоний в количестве $7,6\times 10^1$ КОЕ/см³, с увеличением количества клеток примерно на два порядка к 14 суткам – до $4,8\times 10^3$ КОЕ/см³. После термической обработки молока, загрязненного *P. aeruginosa* 42 и *P. aeruginosa* 25668 через 7 суток холодильного хранения обнаружены единичные колонии, с увеличением количества жизнеспособных клеток к 14 суткам до $3,1\times 10^3$ КОЕ/см³ для *P. aeruginosa* 42 и $2,8\times 10^2$ 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 $(72\pm 2)^{\circ}\text{C}$ определяли при времени выдержки 20, 40, 60 сек; 5, 10 и 15 мин. Результаты эффективности элиминации штамма *P. aeruginosa* 47 при температуре $(72\pm 2)^{\circ}\text{C}$ и времени выдержки 20, 40 и 60 сек, представлены на рис. 19-20.

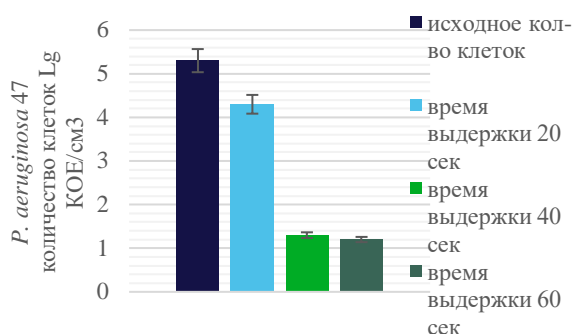


Рисунок 19 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 47 после термической обработки $(72\pm 2)^{\circ}\text{C}$

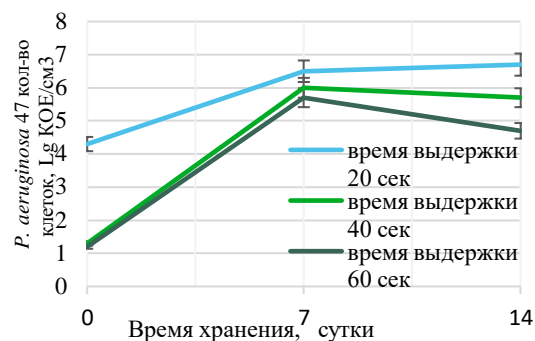


Рисунок 20 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 47 после термической обработки $(72\pm 2)^{\circ}\text{C}$ в хранении

Жизнеспособные клетки, образующие колонии при исходном количестве $1,8 \times 10^5$ КОЕ/см³ выявлены сразу при всех трех периодах выдержки. Наименее эффективным был режим $(72\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 20 сек – 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 опытных образцов количество клеток увеличивалось – до $3,5 \times 10^6$ КОЕ/см³; и к 14 суткам – до $5,4 \times 10^6$ КОЕ/см³. При времени выдержки 40 сек и 60 сек, количество клеток снизилось на 4 порядка в обоих вариантах – до $1,8 \times 10^1$ КОЕ/см³. На 7-е сутки холодильного хранения количество клеток увеличилось до $3,0 \times 10^6$ КОЕ/см³ и $5,7 \times 10^5$ 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 $(72\pm 2)^{\circ}\text{C}$ (рис. 21). При выдержке 20 сек количество клеток снизилось с $2,2 \times 10^5$ до $5,0 \times 10^4$ КОЕ/см³. При выдержке 40 сек количество клеток снизилось на 4 порядка – до $2,8 \times 10^1$ КОЕ/см³. При выдержке 60 сек обнаружен рост единичных колоний. К 7 суткам количество клеток увеличилось до $1,3 \times 10^6$ КОЕ/см³, $1,0 \times 10^5$ КОЕ/см³, $3,7 \times 10^4$ КОЕ/см³ при времени выдержки 20, 40 и 60 сек соответственно, с выходом на плато к 14 суткам хранения (рис.22).

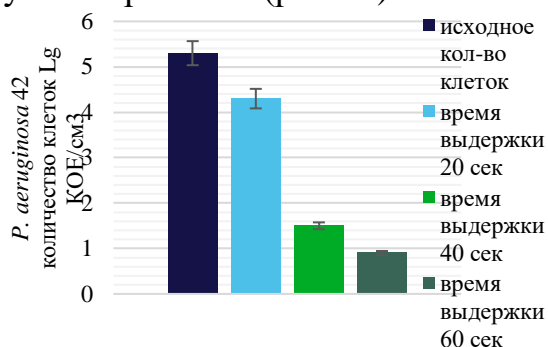


Рисунок 21 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 42 после термической обработки $(72\pm 2)^{\circ}\text{C}$

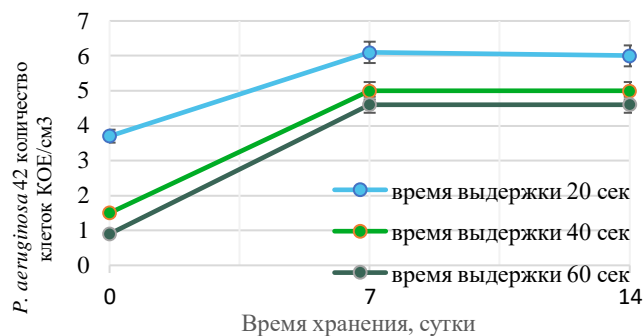


Рисунок 22 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 42 после термической обработки $(72\pm 2)^{\circ}\text{C}$ в хранении

У типового штамма *P. aeruginosa* 25668 при $(72\pm 2)^\circ\text{C}$ также наблюдался рост сразу после термического воздействия (рис.23). При выдержке 20 секунд количество клеток снизилось с $1,9\times 10^5$ до $5,3\times 10^4$ КОЕ/см³, 40 сек – до $1,8\times 10^1$ КОЕ/см³, 60 сек – обнаруживались единичные колонии. К 7 суткам хранения количество клеток увеличилось до $3,3\times 10^6$ КОЕ/см³, $1,8\times 10^5$ КОЕ/см³, $7,7\times 10^4$ 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).

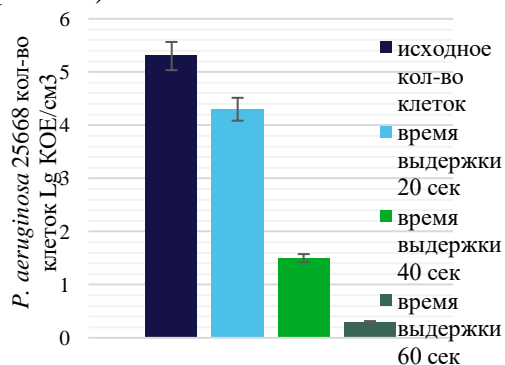


Рисунок 23 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 25668 после термической обработки $(72\pm 2)^\circ\text{C}$

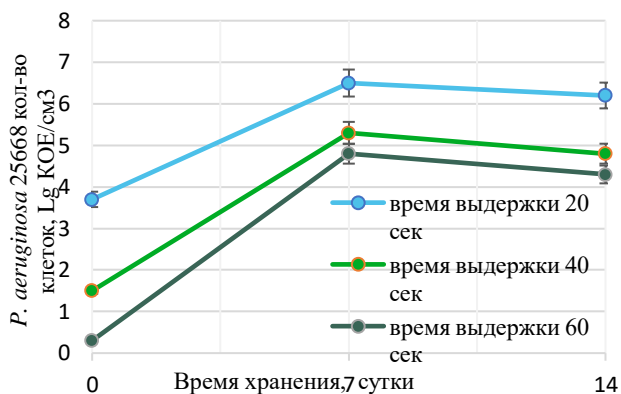


Рисунок 24 – Изменение количества клеток *P. aeruginosa* 25668 после термической обработки $(72\pm 2)^\circ\text{C}$ в хранении

К 14 суткам холодильного хранения в опытных пробирках наблюдались визуальные признаки порчи – изменение цвета, пленочный рост. Таким образом, термическая обработка при $(72\pm 2)^\circ\text{C}$ при выдержке 20, 40 и 60 секунд была недостаточно эффективна для элиминации *P. aeruginosa*.

Для определения временных параметров эффективной элиминации *P. aeruginosa* при температуре $(72\pm 2)^\circ\text{C}$ 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 ($1-3$ 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 $(85\pm 2)^\circ\text{C}$ 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 $(72\pm 2)^\circ\text{C}$ 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	1,2×10 ⁷	1,3×10 ⁶	1,2×10 ⁶	3,9×10 ⁶	1,4×10 ⁶
<i>P. aeruginosa</i> 47	1,4×10 ⁷	2,0×10 ⁴	9,2×10 ⁶	1,1×10 ⁷	2,6×10 ⁶
<i>P. aeruginosa</i> 42	2,2×10 ⁷	7,8×10 ⁴	5,6×10 ⁶	1,0×10 ⁷	2,9×10 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 слизиобразования, изменение пигментации (рис.25).



а



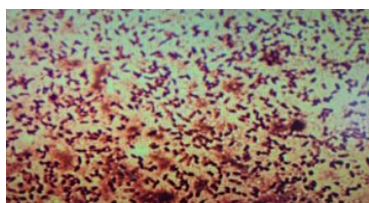
б



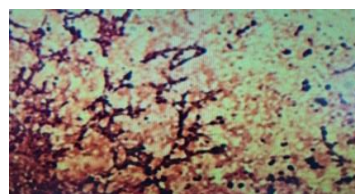
в

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).



а



б

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 деkontаминации, 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; стафилококк - 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 бактерий 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 $(6\pm 1)^{\circ}\text{C}$, наибольшая – при температуре $(37\pm 2)^{\circ}\text{C}$.

4. Определена чувствительность штаммов *P. aeruginosa* к действию биологических антимикробных 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 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 $(72\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 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 $(76\pm 2)^{\circ}\text{C}$ с выдержкой 5 минут и более. Показана возможность реактивации покоящихся форм *P. aeruginosa* при холодильном хранении при режиме пастеризации $(76\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 20 сек. Показана эффективность элиминации клеток *P. aeruginosa* при температуре $(85\pm 2)^{\circ}\text{C}$ и выдержке 10 мин. Кратковременное (20 сек)

воздействие при $(85 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ 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 (K1 и K2)

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