

Д. А. ВАСИЛЬЕВ, А. В. АЛЕШКИН, С. Н. ЗОЛОТУХИН, Н. А. ФЕОКТИСТОВА,
А. В. МАСТИЛЕНКО, Э. Р. ЗУЛЬКАРНЕЕВ, И. А. КИСИЛЁВА,
А. Г. ШЕСТАКОВ, Е. В. СУЛЬДИНА

РАЗРАБОТКА БАКТЕРИОФАГОВЫХ БИОПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ДЕКОНТАМИНАЦИИ МИКРОФЛОРЫ, ВЫЗЫВАЮЩЕЙ ПОРЧУ МЯСНОГО, РЫБНОГО СЫРЬЯ И ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ (БИОПРОЦЕССИНГ)

МОНОГРАФИЯ



УЛЬЯНОВСК
2017

НАУЧНАЯ МОНОГРАФИЯ

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Д. А. Васильев, А. В. Алешкин, С. Н. Золотухин,
Н. А. Феоктистова, А. В. Мاستиленко, Э. Р. Зулькарнеев,
И. А. Кисилёва, А. Г. Шестаков, Е. В. Сульдина

**РАЗРАБОТКА
БАКТЕРИОФАГОВЫХ БИОПРЕПАРАТОВ
ДЛЯ ДЕКОНТАМИНАЦИИ
МИКРОФЛОРЫ, ВЫЗЫВАЮЩЕЙ
ПОРЧУ МЯСНОГО, РЫБНОГО СЫРЬЯ
И ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ
(БИОПРОЦЕССИНГ)**

НАУЧНАЯ МОНОГРАФИЯ



Ульяновск
2017

УДК 579.01:578

ББК 28.4

Разработка бактериофаговых биопрепаратов для деконтаминации микрофлоры, вызывающей порчу мясного, рыбного сырья и готовой продукции (биопроессинг) / Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, А. В. Алешкин, Н. А. Феоктистова, А. В. Мاستиленко, Э. Р. Зилькарнеев, И. А. Киселева, А. Г. Шестаков, Е. В. Сульдина. – Ульяновск, 2017. – 416 с.

ISBN 978-5-9500951-8-4

В монографии представлены результаты научно-исследовательской работы, выполняемой высшим учебным заведением, подведомственным Министерству сельского хозяйства Российской Федерации, УлГАУ, за счет средств федерального бюджета по заказу Министерства сельского хозяйства Российской Федерации в 2017 году по теме: «Разработка бактериофаговых биопрепаратов для деконтаминации микрофлоры, вызывающей порчу мясного, рыбного сырья и готовой продукции (биопроессинг)». Проведенные исследования по выделению селекции и изучению биологических свойств бактериофагов, специфичных для бактерий *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, и разработанный алгоритм промышленного фаг-опосредованного биопроессинга позволили сформировать теоретические предпосылки по созданию нового для Российской Федерации класса технологических вспомогательных средств на основе бактериофагов – продукта для деконтаминации пищевого сырья и продуктов питания.

Рецензент: Щербаков Анатолий Анисимович, д.б.н., профессор кафедры микробиологии, вирусологии и биотехнологии ФГБОУ ВО Саратовский государственный аграрный университет им. Н. Н. Вавилова

© ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, 2017

В основу предлагаемой монографии положен отчёт по результатам НИР, выполненных коллективом кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы УлГАУ в 2017 году. Тематика исследований была финансирована и проведена по заданию МСХ РФ на тему «Разработка бактериофаговых биопрепаратов для деконтаминации микрофлоры вызывающей порчу рыбного и мясного сырья и готовой продукции». Целью этих исследований являлась разработка средств и методов фаг-опосредованного биопроцессинга (обработка бактериофагами пищевого сырья и готовой продукции, способствующая увеличению сроков хранения), позволяющих элиминировать патогенные микроорганизмы с поверхности рыбной и мясной продукции. Проведенные исследования и разработанный алгоритм промышленного фаг-опосредованного биопроцессинга позволили сформировать теоретические предпосылки по созданию нового для Российской Федерации класса технологических вспомогательных средств на основе бактериофагов – продукта для деконтаминации пищевого сырья и продуктов питания поражённых бактериями вызывающими пищевые инфекции и порчу еды.

Структура монографии построена по схеме подготовленной рукописи отчёта для МСХ РФ, что обусловлено необходимостью в кратчайшие сроки предоставить заказчику требуемые по договору материалы выполнения работы.

В авторах монографии представлен коллектив исследователей, работавших по заданной тематике биопроцессинга.

Научные исследования проводились при финансовой поддержке государства в лице МСХ РФ за 2017 год.

Д. А. Васильев.

1

ВВЕДЕНИЕ

За рубежом и в России регистрируется рост пищевых инфекций. По информации ВОЗ ежегодно в мире острыми кишечными инфекциями (ОКИ) болеют 2 млрд. человек, а от диареи умирает более 3 миллионов человек (В. П. Сергиев, Н. Н. Филатов 2016). Причиной этих заболеваний служат содержащие патогенны пища и вода. Социально и экономически развитые страны не являются исключением и в них ежегодно до 30 % населения становятся жертвами пищевых отравлений (WHO, 2002). Проиллюстрировать данное положение можно на примере наиболее развитого региона Северной Америки – США, где выявляется около 76 миллионов случаев пищевых инфекций, что приводит к 325 тысячам госпитализаций и 5 тысячам летальных исходов ежегодно. Однако, этиологическая причина заболевания устанавливается только у 14 миллионов больных, т.е. в 20 % случаев, остальные 62 миллиона пищевых инфекций остаются не расшифрованными (Mead P.S et al., 1999). Ежегодный экономический ущерб от пищевых инфекций в США на начало 2000 годов оценивался в 35 миллиардов долларов (WHO, 2002).

В России, из более чем 5 млн. случаев ОКИ, зарегистрированных за период с 1989 по 1999 гг, этиология половины (55,6 %) не установлена (Равилов и др., 1999). Одной, из причин этого является то, что диагностические и профилактические бактериологические исследования предусматривают поиски и выделение лишь ограниченного числа патогенных микроорганизмов – возбудителей кишечных инфекций. Однако, этиологическое значение могут приобретать самые разнообразные оппортунистические микробы. Проблема профилактики пищевых инфекций приобретает всё возрастающее значение и пути её решения достаточно разнообразны.

Впервые возможность использования бактериофагов в профилактике и лечении инфекционных заболеваний была продемонстрирована в 1917 г., когда среди ученых-микробиологов распространилась сенсационная новость, что Феликс д'Эрелль открыл вирусы, «пожирающие бактерии», и на их основе ему удалось разработать препараты для лечения солдат, заразившихся дизентерией.

Бактериофаги – это вирусы, характеризующиеся специфической способностью к избирательному инфицированию бактериальных клеток, с последующим лизисом (разрушением) клетки-хозяина (вирулентные фаги) или образованием лизогенов (умеренные фаги).

Более восьмидесяти лет в бывшем Советском Союзе, а позднее и в Российской Федерации в филиалах НПО «Микроген» производятся лекарственные средства, как на основе отдельных видов бактериофагов, так и их комбинаций, для лечения и профилактики острых кишечных инфекций и декомпенсированных форм дисбактериоза, а также гнойно-воспалительных заболеваний бактериального генеза.

Длительное время выпускаются в нашей стране и диагностические тест-системы на основе бактериофагов, позволяющие идентифицировать патогенные микроорганизмы, вызывающие листериоз, сибирскую язву, чуму, псевдотуберкулез, холеру и т.д.

Развитие в конце XX – начале XXI века новых знаний, как о молекулярной биологии, так и о биологических взаимоотношениях бактериофагов и их хозяев, а также все более широкое распространение в биосфере антибиотикорезистентных микроорганизмов, актуализировали своего рода второе рождение интереса к вирусам бактерий (бактериофагов). Существенно возросшее количество персистирующих антибиотикорезистентных патогенных микроорганизмов, утяжеляющих клиническое течение патологических состояний и ухудшающих показатели инфекционной заболеваемости во многих странах мира, связано, как с бесконтрольным и некорректным применением антибиотиков в лечении ряда заболеваний и профилактики инфекций, так и с массовым

применением консервантов и бактерицидных препаратов в пищевой промышленности, а также сельском хозяйстве.

Переход на потребление экологически чистых, необработанных антибактериальными средствами химической природы продуктов питания подразумевает поиск новых и возрождение известных ранее форм и методов консервации пищевой продукции.

Цель – разработка средств (коктейля бактериофагов) и методов фаг-опосредованного биопроцессинга (обработка бактериофагами пищевого сырья и готовой продукции, способствующая увеличению сроков хранения), позволяющих элиминировать (разрушить) патогенные микроорганизмы с поверхности рыбной и мясной продукции.

Под поставленную цель были сформулированы следующие задачи.

1.2. Задачи:

– Изучить биологические свойства выделенных штаммов фагов (литическую активность, спектр литического действия, специфичность бактериофагов, изменение литической активности при хранении, морфологию корпускул фагов, урожайность бактериофагов, степень влияния физических и химических факторов на бактериофаги, молекулярно-генетические свойства), активных в отношении бактерий: *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*

– Используя фенотипическую и молекулярно-генетическую оценку штаммов бактериофагов, активных в отношении бактериальных патогенов, вызывающих порчу мясного и рыбного сырья и готовых продуктов питания, сформировать коллекцию производственно-перспективных штаммов бактериофагов, активных в отношении бактерий: *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*

– Разработать рецептуру и пилотную технологию получения вспомогательного технологического средства (бактериофагов),

а также алгоритм фаг-опосредованного биопроцессинга мясного и рыбного сырья и готовых продуктов питания в лабораторных условиях. Определить срок годности и условия хранения фагосодержащего средства.

– Провести оценку безопасности вспомогательного технологического средства (бактериофагов) в испытаниях на лабораторных животных.

– Изучить эффективность вспомогательного технологического средства (биопрепарата на основе бактериофагов) в соответствии с разработанным алгоритмом фаг-опосредованного биопроцессинга в опытах по деконтаминации мясных и рыбных полуфабрикатов.

1.3. Новизна научных исследований

Впервые в РФ на основе изолированных из объектов окружающей среды и охарактеризованных с фенотипической и молекулярно-генетической точки зрения штаммов бактериофагов, обладающих литической активностью в отношении бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, вызывающих порчу пищевых продуктов и появление у человека инфекций, передаваемых пищевым путем, сконструировано эффективное средство бактериальной деконтаминации пищевых продуктов.

Сформирована и адаптирована многоступенчатая схема контрольноиспытательных мероприятий новой категории биоконсервантов – технологическое вспомогательное средство на основе бактериофагов.

Усовершенствована пилотная технология получения поливалентных фаговых коктейлей, позволяющая нарабатывать средство деконтаминации продуктов питания с высоким титром фаговых частиц и низким содержанием эндо- и экзотоксинов.

1.4. Теоретическая и практическая значимость

Проведенные исследования, и алгоритм промышленного фаг-опосредованного биопроцессинга позволили сформировать теоретические предпосылки для создания нового для Рос-

сийской Федерации класса технологических вспомогательных средств на основе бактериофагов – продукта для деконтаминации пищевого сырья и продуктов питания, поражённых бактериями, вызывающими пищевые инфекции и порчу еды.

Созданный алгоритм оценки безопасности и эффективности фагов, как биоконсервантов, позволит разработать регистрационную процедуру для нового класса технологических вспомогательных средств, содержащих бактериофаги.

Профилактическое использование вспомогательного технологического средства, продукта на основе бактериофагов позволит снизить риск возникновения спорадических случаев и вспышек кишечных инфекций, а также продлит сроки реализации пищевого сырья и продуктов питания.

2

СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В 2006 г. важной вехой в истории использования бактериофагов в пищевой промышленности была регистрация Управлением по продовольствию и медикаментам США (US FDA) фагосодержащей пищевой добавки (технологического вспомогательного средства – processing aid) на основе поливалентного листериозного коктейля фагов ListShield (Intralytix, США) «*Listeria monocytogenes* Specific Phage Preparation», включающего 6 различных фагов, к которому чувствительны 170 штаммов *L. monocytogenes*, позволяющего производить обработку готового к употреблению мяса домашних животных и птиц. Позднее были зарегистрированы:

- EcoShield™ – натуральный, не содержащий химических добавок препарат, состоящий из 3 вирулентных бактериофагов, лизирующих *Escherichia coli* O157:H7, производящийся компанией Intralytix Inc. USA;

- SalmoFresh™ – натуральный, не содержащий химических добавок препарат литических бактериофагов, активных в отношении *Salmonella enterica*, производящийся компанией Intralytix Inc. USA;

- Listex™ – натуральный препарат, содержащий бактериофаг P100, активный в отношении *Listeria monocytogenes*;

- SALMONELEX™ – натуральный препарат, содержащий бактериофаги, активные в отношении ряда серотипов сальмонелл;

- AgriPhage™ – биопестицид, содержащий коктейль вирулентных фагов, лизирующих *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* и *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, поражающих плоды томата и перца. Производится компанией OmniLytics Inc. USA.

Бактериофаговый биопроцессинг – это применение бактериофагов для деконтаминации овощей, фруктов, мяса, рыбы и т.д. в процессе их заводской переработки перед упаковкой готовой

к употреблению продукции. За рубежом для деконтаминации пищевых продуктов используют фагосодержащие пищевые добавки (биопрепараты на основе комплектов вирулентных бактериофагов), которые с успехом применяются для биодеструкции микробиологического роста, т.е. сохранения исходной микробиологической чистоты продуктов питания.

Рост числа спорадических случаев и вспышек инфекций, передаваемых пищевым путем, в начале 2000-х гг., в частности листериоза, стал серьезным вызовом для системы здравоохранения США и ряда стран Западной Европы, потребовавшим, наряду с все возрастающей борьбой за экологическую чистоту продуктов питания, создания новых способов борьбы с возможной контаминацией готовых к употреблению пищевых полуфабрикатов (Ready-to-eat-(RTE)-product). Так, в 2009 г. Susanne Guenther с соавт. провели эксперимент по оценке возможности использования двух бактериофагов, A511 и P100, для элиминации *L. monocytogenes* в RTE-продуктах, в которых данный возбудитель встречается достаточно часто. Пищевые образцы были искусственно контаминированы бактериями в титре 1×10^3 КОЕ/г, бактериофаги в титрах 3×10^6 БОЕ/г и 3×10^8 БОЕ/г наносили на продукты спустя 1–2 ч, чтобы дать бактериям адаптироваться, после чего закладывали образцы на хранение при 6 °C в течение 6 дней. Результаты исследования показали, что в жидких продуктах, таких как шоколадное молоко и сырный рассол, благодаря беспрепятственному перемещению фаговых частиц полная эрадикация бактерий происходила достаточно быстро. В то время как на твердых пищевых продуктах фаги также снижали уровень бактериальной обсемененности, но не более чем на 5 логарифмических единиц относительно контрольных образцов. По мнению исследователей, применение бактериофагов для деконтаминации RTE-продуктов в высоких концентрациях (3×10^8 БОЕ/г) оказывается более эффективным, чем в низких дозах (3×10^6 БОЕ/г).

Наряду с *L. monocytogenes*, в США и странах Западной Европы в этот период возросло число случаев пищевых инфек-

ций, вызванных *E. coli* O157:H7. В качестве иллюстрации возможного применения бактериофагов в борьбе с этим пищевым патогеном в 2009 г. Sharma Manan с соавт. провели исследование, в котором оценили эффективность воздействия коктейля из трех бактериофагов (ЕСР-100), активных в отношении *E. coli* O157:H7, на контаминированные этим патогеном свежесрезанных листьях капусты и кусках дыни. Листья капусты инфицировали *E. coli* O157:H7 в титре 3,76 lg (КОЕ/см²), и после подсушивания опытные образцы аэрозольно обрабатывали коктейлем бактериофагов ЕСР-100 в титре 7,98 lg (БОЕ/см²), а контрольные – фосфатносолевым буферным раствором. После деконтаминации листья хранили в течение 2 дней при температуре 4 °С. Нарезанные кусочки дыни контаминировали *E. coli* O157:H7 в титре 4,55 lg (КОЕ/мл), затем контрольные образцы обрабатывали таким же буферным раствором, а опытные – коктейлем фагов ЕСР-100 в титре 6,69 lg (БОЕ/мл). Деконтаминированные кусочки дыни хранили в течение 7 дней при температурах 4 и 20 °С. На 0, 2, 5 и 7-й день образцы дыни гомогенизировали для определения в них уровня *E. coli* O157:H7. Количество кишечной палочки на листьях капусты, обработанных бактериофагом на 0,1 и 2-й день, составляло 0,72, <0,22 и 0,58 lg (КОЕ/см²), что было существенно ниже, чем на контрольных образцах, обработанных буферным раствором: 2,64, 1,79 и 2,22 lg (КОЕ/см²), соответственно. Количество кишечной палочки в обработанных коктейлем фагов образцах нарезанной дыни, хранившихся при температуре 4 °С, на 2, 5 и 7-й день составляло 0,77, 1,28 и 0,96 lg (КОЕ/мл), что было значительно ниже, чем в контроле: 3,34, 3,23 и 4,09 lg (КОЕ/мл), соответственно. При температуре 20 °С существенных различий в обработанных и контрольных образцах не наблюдалось. В заключение авторы особо подчеркнули следующее биологическое свойство фагового коктейля: он более выраженно элиминировал кишечную палочку в продукте при холодильном хранении, чем при температуре 20 °С.

Soni в публикациях 2009 и 2010 гг. показал антилистериозную активность технологического вспомогательного средства Listex на основе бактериофага P100, эффективно лизирующего *L. monocytogenes* на поверхности охлажденного филе лосося. В своих работах он продемонстрировал возможности фаг-опосредованной контаминации в зависимости от времени контакта бактериофага с продуктом при различных температурах хранения охлажденного филе лосося. Образцы филе искусственно контаминировали смесью, содержавшей два серотипа бактериальных клеток *L. monocytogenes*, с общим титром 4,3 lg (КОЕ/г). Затем на поверхность филе наносили бактериофаг P100 в титре 2×10^7 БОЕ/мл. Уровень листериозной нагрузки снижался на 1,4–2,0 lg (КОЕ/г) при температуре хранения филе 4 °С, на 1,7–2,1 lg (КОЕ/г) при 10 °С и 1,6–2,3 lg (КОЕ/г) при комнатной температуре (22 °С). 30-минутная обработка бактериофагом контаминированного филе снижала листериозную нагрузку более чем на 1 lg (КОЕ/г), в то время как 15-минутная деконтаминация уменьшала количество листерий на поверхности филе менее чем на 1 lg (КОЕ/г). Более высокие концентрации бактериофага 10^8 БОЕ/г снижали уровень листериозной нагрузки с 2, 3 и 4,5 до 1,8, 2,5 и 3,5 lg (КОЕ/г) при температуре хранения образцов 4, 10 и 22 °С, соответственно. При обработке бактериофагом в течение 10 дней при температуре 4 °С бактериофаг P100 элиминировал листерии на поверхности образцов до уровня 0,3 lg (КОЕ/г), в то время как их количество на необработанных фагом экземплярах достигало 2,6 lg (КОЕ/г). Титр бактериофага на поверхности филе оставался стабильным в течение 10 дней хранения образцов, лишь незначительно снижаясь на 0,6 lg (БОЕ/г) от исходного количества фаговых частиц, нанесенных на образцы 8 lg (БОЕ/г). Проведенные эксперименты показывали высокий листерицидный эффект бактериофага P100 на поверхности рыбного филе.

В 2011 г. Susanne Guenthera и Martin J. Loessner предложили использовать бактериофаги для обработки мягких сортов сыра, как наиболее эффективный способ борьбы с пищевыми патогене-

нами, не изменяющий исходные пищевые свойства продукта. В своем исследовании они применяли листериозный бактериофаг A511, обладающий широким спектром литической активности, для эрадикации *L. monocytogenes* в процессе производства двух типов мягких сыров: камамбер и лимбургер. Первоначально поверхности образцов сыра до созревания искусственно контаминировали *L. monocytogenes*, штаммами Scott A (серовар 4b) и CNL 103/2005 (серовар 1/2a) в титре от 10^1 до 10^3 КОЕ/см². Однократная обработка сыра камамбер фагом A511 в титре 3×10^8 БОЕ/см² снижала исходный уровень жизнеспособных клеток штамма Scott A (10^3 КОЕ/см²) на конец срока его созревания (21-й день эксперимента) на 2,5 логарифмических порядка. Уровень листерий в конце созревания обработанного фагом лимбургера (22-й день эксперимента) при такой же исходной контаминации упал на 3 порядка. При более низкой первоначальной контаминации листериями (10^1 – 10^2 КОЕ/см²) количество жизнеспособных бактериальных клеток в конце созревания сыра было ниже уровня детекции, что более чем на 6 порядков отличалось от микробиологической загрязненности контрольных образцов.

В 2012 г. Carter C. D. с группой ученых оценивали эффективность коктейля на основе бактериофагов EcoShield™, активного в отношении *E. coli* O157:H7, при обработке говядины. Большинство продуктов, которые подвергаются высокому риску контаминации *E. coli* O157:H7, как правило, транспортируются и хранятся в охлажденном или замороженном состоянии, в таких условиях кишечная палочка, как правило, практически не размножается. Учитывая этот факт, в процессе эксперимента искусственно контаминированные бифштексы, деконтаминированные EcoShield™, и контрольные образцы, обработанные PBS буфером, хранили в течение суток при температуре 4 °С. Количество жизнеспособных клеток кишечной палочки определяли на 0, 1, 5 и 7-е сутки. Применение коктейля бактериофагов приводило к значительному снижению концентрации клеток *E. coli* O157:H7 (на 94–98 %) на обработанном фагом бифштексе в сравнении с контрольными образцами.

В 2012 г. Susanne Guenther с группой ученых провели опыт по биоконтролю за *Salmonella typhimurium* с помощью вирулентного фага FO1-E2 на продуктах, готовых к употреблению (RTE). Образцы искусственно контаминировали сальмонеллой в титре 1×10^3 КОЕ, затем наносили бактериофаг в титре 3×10^8 БОЕ/г и инкубировали 6 дней, при температуре 8 и 15 °С. При температуре хранения 8 °С жизнеспособные клетки не обнаруживались после нанесения бактериофага, что свидетельствовало о снижении уровня контаминации сальмонеллой более чем на 3 порядка. При температуре хранения 15 °С уровень *S. typhimurium* снизился на 5 логарифмических единиц на поверхности мяса индейки и молочном шоколаде, а также снизился на 3 порядка на хот-догах и морепродуктах.

В 2013 г. D. Spricigo с соавт. провели эксперимент, в котором оценивали эффективность коктейля бактериофагов (UAB_Phi 20, UAB_Phi78 и UAB_Phi87), активных в отношении сальмонелл, на четырех различных продуктах питания (свиная кожа, куриная грудка, свежие яйца и запакованные листья салата). Образцы экспериментально заражали *Salmonella enterica*, серовар *enteritidis*, и *S. enterica*, серовар *typhimurium*. Образцы свиной кожи опрыскивали фаговым коктейлем, а затем инкубировали при 33 °С в течение 6 часов, что приводило к значительному снижению бактериальных клеток, более чем на 4 и 2 $\log/\text{см}^2$ для *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, соответственно. Значительное снижение наблюдалось и на поверхности куриных грудок (значение *S. typhimurium* и *S. enteritidis* снижалось на 2,2 и 0,9 $\log_{10}$ КОЕ/г соответственно), которые погружали на 5 мин в коктейль бактериофагов, а затем закладывали на 7 дней в холодильник при температуре 4 °С. Значительное снижение бактериальной контаминации также можно было наблюдать у упакованного длиннолистого салата, обработанного аналогичным образом и хранившегося в течение 60 мин при комнатной температуре. Уровни *S. typhimurium* и *S. enteritidis* на листьях салата снижались на 3,9 и 2,2 $\log_{10}$ КОЕ/г, соответственно. Также снижение бактериальной нагрузки 0,9 $\log_{10}$ КОЕ/см² наблюдалось на свежих яйцах, опры-

сканных коктейлем бактериофагом, затем инкубированных при температуре 25 °С в течение 2 ч. В 2013 г. М. Oliveira с группой ученых исследовали эффективность бактериофага ListexP100 на ломтиках дыни и соках дыни, груш и яблок. Применение бактериофагов оказалось более эффективным на поверхности дыни и груши, но на поверхности яблок никаких изменений не произошло. Уровень листерий снижался на 1,50 и 1,00 log КОЕ/см² на ломтиках дыни и груши, соответственно. В соках снижение листерий было явно выражено, так, количество бактериальных клеток в дынном соке сократилось на 8 log КОЕ/мл, а в грушевом соке – на 2,10 log КОЕ/мл после 8 дней хранения. В яблочном соке количество листерий не снижалось под действием бактериофага, а само количество бактериофагов снизилось до неопределяемого уровня, что было связано с высоким уровнем pH в яблочном соке. В 2013 г. О. Boyacıoglu с соавт. оценивали эффективность коктейля бактериофагов *EcoShield*TM против налидиксово-устойчивой энтерогеморрагической кишечной палочки O157:H7 RM4407 (ЕНЕС), на листьях зелени, хранившихся в окружающей среде и в модифицированной газообразной оболочке (5 % O₂; 35 % CO₂; 60 % N₂). Образцы (~2×2 см²) зелени (листья салата и шпинат) инокулировали 4,5 log КОЕ/см² ЕНЕС, после чего обрабатывали коктейлем *EcoShield*TM (6,5 log БОЕ/см²) и закладывали на хранение при 4 и 10 °С в течение 15 сут. Через 30 мин после нанесения коктейля бактериофагов на листья шпината уровень ЕНЕС снижался на 2,38 и 2,49 log КОЕ/см² при температуре 4 и 10 °С, соответственно. На поверхности листьев салата уровень ЕНЕС снижался на 2,49 и 3,28 логарифмических единиц через 30 мин и 2 ч при температуре хранения 4 °С. Коктейль бактериофагов значительно уменьшал ЕНЕС за один день на 1,19, 3,21 и 3,25 log КОЕ/см² на листьях шпината, зеленых листьях и листьях салата ромэн по сравнению с контрольными образцами, при температуре хранения 4 °С. Во время хранения в модифицированной упаковке фаги уменьшали популяцию ЕНЕС на 2,18, 3,50 и 3,13 log КОЕ/см² на листьях шпината, зеленых листьях и листьях ромэн при 4 °С. При хранении образцов

в окружающей среде при температуре 10 °С ЕНЕС снижалась на 1,99, 3,90 и 3,99 log КОЕ/см², в то время как в газовой модифицированной упаковке количество бактерий сократилось на 3,08, 3,89 и 4,34 log КОЕ/см² на шпинате, зеленых листьях и листьях ромэн, соответственно, по сравнению с контрольной группой. В 2014 г. Galarce с коллегами провели исследование, в котором оценивали эффективность коктейля бактериофагов для подавления роста *S. enteritidis* на поверхности сырого и копченого лосося. По 25 образцов в каждой группе были инокулированы *S. enteritidis*, после чего были обработаны коктейлем бактериофагов, а затем инкубированы в течение 10 дней при температуре 4 и 18 °С. Значительное снижение количества бактериальных клеток наблюдалось на 3, 6 и 10-й день в образцах сырого лосося, инкубированных при 18 °С от 0,75 до 3,19 log КОЕ/г, а при температуре 4 °С – от 2,82 до 3,12 log КОЕ/г. В образцах копченого лосося наблюдалось более низкое снижение бактериальных клеток от 1,02 до 1,96 log КОЕ/г при 18 °С, от 0,50 до 1,16 log КОЕ/г при 4 °С хранения.

В 2014 г. Zinno P. провели исследование, в котором оценивали эффективность бактериофага, активного в отношении *Salmonella enterica* серовар *typhimurium*, на различных продуктах питания: жидкие яйца, энергетические напитки, цельное и обезжиренное молоко, яблочный сок, куриная грудка и фарш. Образцы были экспериментально контаминированы *S. typhimurium* в титре 10⁴ КОЕ/г, после чего оставляли их на 1 ч при температуре 4 °С для адаптации бактерий на поверхности. После этого образцы обрабатывали бактериофагом P22 и оставляли при 4 °С, эффективность деконтаминации смотрели через 0, 24 и 48 ч. Заметное снижение бактериальных клеток на 2 логарифмические единицы достигалось в опытных образцах с твердой поверхностью в сравнении с контрольными образцами, а в цельном и обезжиренном молоке через 48 ч роста сальмонелл не наблюдалось. В 2014 г. E. N. Silva с соавт. провели исследование, в котором оценивали эффективность бактериофага P100 на *L. monocytogenes* в ис-

кусственно контаминированных сырах до созревания. Образцы инокулировали смесью штаммов *L. monocytogenes* 1/2a и Scott A в титре 10^5 КОЕ/г, после добавляли бактериофаг в титре $8,3 \times 10^7$ БОЕ/г и оставляли при температуре 10°C в течение 7 дней. В нулевой момент времени, через 30 минут после инфицирования, бактериофаг P100 снижал уровень *L. monocytogenes* в среднем на 2,3 log в сыре Minas Frescal и на 2,1 log в сыре Coalho, в отличие от контрольных образцов, не обработанных бактериофагом. Однако после 7 дней хранения в холодильнике бактериофаг P100 показал слабую антилистерийную активность: на 1,0 (MinasFrescal) и 0,8 (Coalho) log, по сравнению с контрольными образцами. Данное исследование показало, что эффективность фаговой обработки зависит от изначального уровня контаминации и требуется более высокий титр фаговых частиц на обрабатываемой пищевой поверхности для лучшего эффекта.

В 2014 г. М. Li наблюдал предотвращение порчи морской рыбы путем снижения *S. putrefaciens* на образцах рыбы после воздействия специфического бактериофага Spp001, активного против данного возбудителя порчи продукции. Охлажденное филе, инокулированное *S. putrefaciens*, обрабатывали различными концентрациями бактериофага от 10^4 до 10^8 БОЕ/мл. Количество бактериальных клеток значительно снижалось на обработанных бактериофагом образцах, в отличие от контрольной группы. Органолептические и биохимические параметры показали, что обработка бактериофагом может продлить срок годности охлажденного филе на 4–14 дней. Кроме того, концентрации бактериофага 10^6 и 10^8 БОЕ/мл были более эффективны, чем химический консервант сорбат калия 5 г/л. В 2015 г. Н. Liu с соавт. оценивали эффективность четырех бактериофагов индивидуально и коктейлем из них для снижения роста *E. coli* O157 на поверхности говядины, при температуре хранения 4, 22 и 37°C . Образцы $3 \times 3 \times 1$ см искусственно контаминировали *E. coli* O157 в титре 10^4 КОЕ/см², давали бактериям адаптироваться на поверхности в течение 10 минут и обрабатывали фагами, индивидуально и коктейлем, с множественностью инфицирования (MOI) =

1000 и MOI = 10. Полученные данные свидетельствовали о том, что бактериофаги более эффективно подавляли рост *E. coli* при 37 °C и более высокой MOI. В 2015 г. Augustine J. с соавт. оценивали два специфических бактериофага, ΦSP-1 и ΦSP-3, активных в отношении сальмонелл, в готовом к употреблению (RTE) курином мясе при различных температурах хранения – 4 °C, комнатной температуре $28 \pm 0,5$ °C, 37 °C и с различной множественностью инфицирования (MOI). При температуре 4 °C индивидуальное применение бактериофагов ΦSP-1 и ΦSP-3 снижало уровень сальмонелл на 2,46 и 2,1 log КОЕ/мл при высоких значениях MOI и 0,98 и 0,52 log КОЕ/мл при низких значениях MOI, по сравнению с контрольными образцами на 3-й день эксперимента. При комнатной температуре снижение бактериальных клеток составляло 3,99 и 3,46 log КОЕ/мл при высоком MOI и 2,51 и 2,3 log КОЕ/мл при низком MOI. При 37 °C снижение сальмонелл составило 1,98 и 2,38 log КОЕ/мл при высокой MOI и 1,52 и 1,98 КОЕ/мл при низкой MOI. Лучший эффект был получен, когда бактериофаги использовали коктейлем и с высоким уровнем MOI. Так, на 3-й день эксперимента в обработанных коктейлем бактериофагов образцах бактериальная нагрузка снижалась на 3,53 log КОЕ/мл при 37 °C и за пределами уровня обнаружения при 4 °C и комнатной температуре. Таким образом, представленный обзор научной литературы подтверждает необходимость разработки новых методов деконтаминации для продления сроков годности пищевых полуфабрикатов, сохраняющих исходное качество и экологическую чистоту продуктов питания, при этом щадящие процедуры переработки полуфабрикатов и все большее распространение в мировой торговой сети готовых к употреблению продуктов, не требующих длительной термической обработки, использование бактериофаговых препаратов уменьшает риск возникновения спорадических случаев и вспышек инфекций, передаваемых пищевым путем

Однако, в Российской Федерации до сегодняшнего дня нет ни одного технологического вспомогательного средства на основе бактериофагов, используемого для деконтаминации и продления

сроков годности пищевых полуфабрикатов, в связи с чем целью данной темы НИР является стремление доказать возможность создания безопасного и эффективного средства деконтаминации на основе коктейля бактериофагов, активного в отношении бактериальных патогенов, вызывающих как порчу пищевых продуктов, так и пищевых инфекции у человека.

Создание нового для Российской Федерации класса технологических вспомогательных средств (биопрепарата) на основе бактериофагов позволит в перспективе, на наш взгляд, решить обе эти проблемы, что подтверждается рядом предварительных исследований, проведенных западными коллегами и результатами наших НИР.

**ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ
ПО ИЗУЧАЕМОЙ
ПРОБЛЕМЕ,
ВКЛЮЧАЯ
ОПУБЛИКОВАННЫЕ
НАМИ
РЕЗУЛЬТАТЫ
СОБСТВЕННЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ
ПО ДАННОЙ ТЕМЕ НИР**

3.1. БАКТЕРИИ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ ИНФЕКЦИИ, ПЕРЕДАВАЕМЫЕ ПИЩЕВЫМ ПУТЕМ, ПОРЧУ ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ, ПИЩЕВОЙ ПРОДУКЦИИ, И ИЗУЧАЕМЫЕ В ДАННОЙ ТЕМЕ НИР

В условиях роста мирового населения увеличивается спрос на продукты питания. В целях удовлетворения этого спроса происходит повышение интенсивности и объемов промышленного производства в секторах растениеводства и животноводства, что создает как новые возможности, так и новые угрозы в том, что касается безопасности продуктов питания. В свете этих угроз на производителей продуктов питания и работников пищевой промышленности ложится дополнительная ответственность по обеспечению безопасности пищи человека. В условиях, при которых потоки продукции перемещаются с большой скоростью и на большие расстояния, местные инциденты могут быстро разрастаться до международных чрезвычайных ситуаций. За последнее десятилетие на каждом континенте были отмечены серьезные вспышки заболеваний пищевого происхождения, масштабы которых нередко усугублялись масштабами глобализированной торговли. В качестве примера можно назвать вспышку энтерогеморрагической инфекции, вызванной *Escherichia coli*, в Германии в 2011 г., которая была связана с употреблением в пищу проростков пажитника. Случаи заражения были зарегистрированы в 8 странах Европы и Северной Америки, умерли 53 пациента.

К потреблению стандартных или, так называемых, «классических» продуктов питания известных человечеству столетия или тысячелетия добавляются новые, зачастую экзотические типы пищевых продуктов или новые технологии их приготовления, новый тип упаковки, новые методы обработки пищи для

её сохранности и длительности применения. Это требует дополнительного изучения как вновь появившихся пищевых инфекционных агентов (заболевания: пищевой листериоз, кишечный иерсиниоз, кампилобактериоз и другие, которых ещё 50-70 лет тому назад не было), так и факторов их передачи в эпизоотической, эпидемической цепи, устойчивости к различным условиям физико - химических, биологических форм воздействия.

3.1.1. ЛИСТЕРИИ И ЛИСТЕРИОЗ. БАКТЕРИЯ – *L. MONOCYTOGENES*

(Материал подготовлен по результатам исследовательской работы Д. А. Васильева)

С прогностической точки зрения, наиболее опасной из вновь появившихся пищевых инфекций является листериоз. Листериоз – инфекционная болезнь людей и животных с полиморфизмом клинических проявлений и высокой летальностью. Основной путь заражения человека – пищевой, при употреблении не прошедших термической обработки продуктов питания. С 1992 г. эта инфекция была признана как эпидемически значимая. Особое значение имеет способность листерий к вертикальной передаче от беременной женщины плоду трансплацентарно или интранатально. У людей, не страдающих иммунодепрессивными состояниями, *L. monocytogenes* может вызвать гастроэнтерит, который, как правило, протекает в легкой форме. У пациентов с нарушенным клеточным иммунитетом листериоз может приводить к серьезным осложнениям, в том числе сепсису, менингиту, энцефалиту, заканчивающимся нередко летальным исходом.

Прошло более 100 лет со времени первого описания листериоза у животных. Значение этой инфекции в патологии людей и животных не только не уменьшилось, а даже возросло. Все первые публикации связаны с обнаружением болезни у кроликов (Лусе во Франции, 1892; Д. Гюльферс в Швеции, 1911) у мор-

ских свинок и кроликов (Мюррей, Уэбб и Свэнн в Англии, 1926) у крысоподобного грызуна (Г. Пири в Южной Африке, 1927). В 1931 г. Д. Джилль установил эту болезнь у овец, в 1932 г. Тен-Бритч – у птиц, в 1934 г. Джонс и Литлль – у крупного рогатого скота, в 1936 г. Т. П. Слабоспицкий – у поросят, в 1948 г. Сенкеруд – у лошадей, в 1949 г. Н. Г. Трегубова – у лисиц, в 1964 г. Н. А. Литвинов – у песцов, затем у соболей – М. Е. Еремеев, у нутрий – С. Е. Сорина. Кроме того, Свинцов П. М. и другие в 1946 г. при микроскопическом исследовании крови свиней, используемых для изготовления кристалвиолет вакцины против чумы свиней, обнаруживали не известные ранее небольшие грамположительные палочки, которые в то время именовали Х-палочками. В последствии оказалось, что это были листерии.

Первые сообщения о листериозе у людей связаны с именами Аткинсона (Австралия, 1915), Дюмонта и Котони (Франция, 1918). Вопросы таксономии и классификации были частично решены уже к 1940 году – Г. Пири дал наименование возбудителю болезни - *Listeria monocytogenes*, которое было утверждено Международной Классификационной комиссией и используется до сих пор. Официальная регистрация болезни, как нозологической единицы, в нашей стране проводится с 1956 года у животных, а у людей – с 1992 года. Особая опасность листериоза возникла в конце XX века, в следствии установленной контаминации пищевых продуктов листериями. В связи с этим листериоз получил наименование «пищевой инфекции» (И. А. Бакулов., Д. А. Васильев, 1991). Однако, медицинские специалисты нашей страны только с 1992 стали признавать его как эпидемическую инфекцию. В частности ими подтверждены, ранее установленные зарубежными микробиологами и врачами, группы риска у людей – листериоз беременных, новорожденных, пожилых и лиц, для лечения которых использовали препараты и методы, подавляющие защитные способности организма (при пересадке почек и т.д.). У животных к группе риска отнесен целый вид – овцы. Этот этап изучения листериоза, как пищевой инфекции, длится и в настоящее время, приобретая все большую актуальность. Был

зафиксирован ряд крупных вспышек листериоза людей с высоким уровнем смертности при употреблении пищевых продуктов животного и растительного происхождения (молоко и молочные продукты, сыры, мороженое, квашеная капуста). Данные случаи акцентировали внимание общественности и подчеркнули важность контроля за производством, сбытом и употреблением пищевых продуктов в связи с возможной их контаминацией листериями. Выделения листерий из пищевых продуктов были и до упомянутых вспышек, однако они рассматривались скорее как казус и медики не стремились их обобщать, систематизировать и изучать. В настоящее время листерии обнаруживаются в пищевых продуктах с постоянным нарастанием и это обусловлено не только улучшением методов индикации, но и биологическими особенностями листерий, связанными с новыми технологиями приготовления и хранения пищевых продуктов. В России, в связи с этим, налажена система контроля за качеством пищевых продуктов отечественного и зарубежного происхождения. Огромное внимание уделяется разработке средств и методов быстрой индикации листерий в пищевых продуктах и методы их обеззараживания.

Распространённость и устойчивость листериоза и листерий

Листерии – микроорганизмы, широко распространенные в природе. Многими исследователями доказано их присутствие в почве и растениях. (Н. Welshimer et.al., 1971, I. Armstrong, 1980). По данным Н. Seeliger (1975) листерии выделяют от 9 до 44 % проб почвы и растений. Интересно отметить, что самые высокие положительные результаты были получены с поверхности образцов почвы тех полей, где травы не скашивались несколько лет. Авторы считают, что увядшая и разложившаяся трава способствует накоплению листерий. По данным Гершуна В. И. (1981) способность листерий размножаться в почве зависит от сезона года (температуры), фитомассы (гумуса), влажности и показаний рН. В осенний период происходит размножение листерий в почве. Их концентрация возрастает по сравнению с летом. Зимой происходит стабилизация роста бактерий. В ве-

сенний период опять происходит значительное увеличение количества листерий на единицу веса почвы. Летом в почве отмечается резкое понижение концентрации листерий. Возбудитель листериоза размножается и длительно сохраняется в почвах с высоким естественным плодородием, с содержанием значительного количества фитомассы. В черноземах, лугово-болотной, лугово-каштановой почве, лесной (но не хвойного леса) почве листерии выделяются круглый год. Пустынные почвы, пески, такыры не являются средой обитания листерий. Водный баланс почвы оказывает значительное количество листерий. В почве с влажностью 15-26 % листерии не размножаются и их концентрация со временем снижается. При 40 %-ной влажности почвы количество листерий увеличивается в 7-11 раз, а при влажности 55-70 % их концентрация увеличивается в 100-400 раз по отношению к первоначальному показателю. По данным исследований, проведенных во Франции (Picard, 1989), химический состав почвы не влияет на вирулентность листерий. Сливко В. В. (1954) указывает, что листерии подобно бруцеллам могут на глубине 1-3 см при низких температурах весны, осени и снежной зимы оставаться в почве активными до 6 месяцев. По мнению Н. Seeliger, экология листерий на некультивированных полях связана в первую очередь с величинами рН. В их опытах у 22 из 46 проб эти показатели были в пределах 4,8-7,6, т.е. соответствовали величинам, характерным для некоторых силосных масс.

В эпизоотологии листериоза давно отмечена связь между клиническими вспышками болезни у животных и использовании в их рационе силоса. В Ирландии листериоз известен как «силосная болезнь». Наблюдения Djlphanson (1945) не только подтвердили это предположение, но и дали возможное объяснение более широкой распространённости листериоза среди жвачных, питающихся силосом, по сравнению с другими животными, получающими иные корма.

В воде листерии сохраняют свою жизнеспособность в зависимости от величин рН, жёсткости воды и окисляемости. По данным различных авторов при оптимальных условиях эти бакте-

рии сохраняют жизнеспособность в воде до 737 дней. Н. Seeliger (1988) считает, что листерии обладают уникальной возможностью размножаться при очень низкой температуре воды.

Присутствие листерий в фекалиях человека и животных доказано К. Вауен (1962) и другими. Поэтому неудивительно, что этот микроорганизм выделяют из сточных и поверхностных вод, и это может способствовать возникновению листериозных вспышек.

N. Stamatin et.al. (1957) выделяли листериозную культуру из поймы реки. Причём как на возможный источник инфекции авторы указывают на мясоперерабатывающие предприятия, расположенные выше по течению реки. Сточные воды этого предприятия разносили листериозную палочку на значительные расстояния, что и послужило причиной заболевания и гибели до 50 % форелей в водном бассейне данной реки. Олсуфьев Н. Г. и др. (1959) выделили листериозную палочку из водных протоков и от водяных крыс, обитающих в этих водоёмах. V. Rosca (1962) установил контаминацию листериями ряда естественных водоёмов, расположенных на слиянии рек. Листериозная палочка была обнаружена и у домашних животных (КРС, овцы, свиньи), водопой которых проводился из этих водоёмов.

По данным американской группы исследователей, изучавших распространение листерий в эстуарных водах Калифорнии, листериозная палочка обнаруживалась в 81 % случаев в пресной и слабокислой воде. Причём, вид *L.monocytogenes* доминировал в пресной воде, к которой имели доступ сельскохозяйственные животные Colburn. K. (1990), D. Vatking и др. (1981) изучили распространение листериоза в сточных водах, иле сточных вод и речной воде. Листерии были выделены из всех изученных проб воды и ила, причём в ряде случаев в концентрациях, превышающих таковую для сальмонелл. Авторами была отмечена более длительная выживаемость листерий, чем сальмонелл, в естественных условиях.

R. Dickstra (1982) исследовал на наличие листерий поверхность воды каналов и озёр в Северной провинции Нидерландов.

Из 180 отобранных образцов, 62 дали положительные результаты. Из 25 образцов вод каналов инфицировано 9, остальные 53 инфицированных образца приходятся на сточные воды. А. Lappi (1986) выделил листериозную палочку из вод реки По. Н. Geuenich (1985) изучал очищенные сточные воды городской канализации. Было выделено 214 штаммов листерий, из них 92,5 % принадлежали *L.monocytogenes*, 4,2 % – *L.innocua* и 3,3 % – *L.zeeligeri*.

Н. Skovgard (1988) отмечает, что в отличие от стафилококков, сальмонелл, иерсиний, которые погибают в неаэрированной холодной навозной жиже, листерии, в этих условиях, хорошо сохраняются в течение длительного времени. Использование этой жижи на полях в качестве удобрений, по его мнению, приводит к распространению листерий в окружающей среде.

Листерии распространены в различных климатических районах планеты, даже за Северным полярным кругом (Дунаева Т. Н. и др., 1967). Адаптационный механизм листерий позволяет им сохранять свою жизнеспособность и размножаться при различных условиях и средах обитания.

Изучение экологии листерий показывает, что этот микроорганизм достаточно пластичен в своей приспособляемости к условиям обитания. Под воздействием антибиотиков и других факторов листерии могут изменяться – появляются R-формы колоний, антибиотикоустойчивые мутанты и, наконец, L-формы листерий. Появление L-форм – это защитная реакция микроорганизма на вредные для него воздействия факторов внешней среды и его своеобразная экологическая форма, образуются они в организме животных и людей.

L-трансформация листерий в почве в летний период года под влиянием неблагоприятных условий, о чём пишет В. И. Гершун (1988), убедительными данными пока ещё не доказана, однако не исключена.

Особо стоит вопрос о некультивируемых формах листерий.

С позиции экологии, листерии способны существовать и размножаться как в объектах внешней среды (абиотические объек-

ты), так и в организме животных и человека (биотические объекты).

Определённым резервуаром листерий являются кровососущие насекомые, мышевидные грызуны и клещи. В работах целой плеяды исследователей приведены убедительные данные о наличии листерий в их организме.

В заключение данного раздела имеет смысл привести цитату из статьи Г. П. Сомова (1978): «Жизненный цикл факультативных паразитов состоит в непрерывном переходе из окружающей среды в организм животных, где они функционируют как паразиты, в возврате в окружающую среду, где они ведут сапрофитический образ жизни. Нам представляется, что инфекции, вызываемые такими микроорганизмами, лучше называть сапрозоонозами. В этом термине удачно сочетается представление о двойственной природе таких микроорганизмов, об их сапрофитических и паразитических свойствах». Данное мнение, на наш взгляд, отражает особенности в экологии возбудителя листериоза.

Биологическая характеристика возбудителя листериоза

Тинкториальные свойства бактерий *Listeria monocytogenes*

Из всех видов входящих в род *Listeria*, наибольшую значимость в патологии людей и животных играет вид *Listeria monocytogenes*. Родовое название *Listeria* дано в честь учёного, санитарного микробиолога Листера, а определение «*monocytogenes*», связано со способностью листерий вызывать повышенное накопление моноцитов в крови кроликов и некоторых других видов животных. В связи с этим остановимся более детально на бактериях данного вида.

Морфология. *Listeria monocytogenes* – маленькая палочковидная бактерия с закругленными концами, является наиболее типичной.

Однако листериям свойственна значительная полиморфность: в зависимости от условий культивирования они способны принимать кокковидную или овоидную формы.

Нередко это обстоятельство вводит в заблуждение врачей-бактериологов в лабораториях, которые в посевах из органов павшего животного обнаруживают формы листерий, близкие к коккам, и делают ошибку, неправильно их идентифицируя. Чтобы избежать этого, надо сделать несколько последовательных пересевов культуры на свежие питательные среды и вырастить ее при комнатной температуре – листерии при этом приобретают типичную палочковидную форму.

Бакулов И. А., Меньшикова З. И. и др. (1966) наблюдали различие в форме клеток в зависимости от температуры инкубации, хотя, по мнению Гартвига (1958), температура инкубации и вид питательной среды не влияют на величину листерий. По нашим наблюдениям, в культурах, выращенных при комнатной температуре, преобладали палочковидные формы, в то время как в культурах, выращенных в термостате при температуре 37 °С, чаще встречались кокковидные и овоидные формы. Для исследованных штаммов листерий характерно резкое различие между культурами, выращенными при температуре 22 и 37 °С.

В старых культурах и нередко в патологическом материале обнаруживаются очень мелкие коккообразные формы листерий. Листерии приобретают кокковидные формы при ограниченных условиях размножения (в обычном мясопептонном бульоне при температуре 4 °С).

Некоторые авторы указывают, что в результате этого в определенных условиях листерии приобретают способность проходить через бактериальные фильтры. Ф. З. Амфитеатров и К. А. Шишкина (1962) на основании опытов по фильтрации 1-120-суточных бульонных культур листерий также пришли к выводу о возможности существования «фильтрующихся форм» у листерий. Однако, дальнейшие исследования показали наличие у листерий так называемых L-форм, возникающих под действием различных факторов – физической, химической или биологической природы, в частности, пенициллина.

Другим характерным свойством листерий является их подвижность, обеспечиваемая наличием жгутиков, однако эти жгу-

тики обнаруживают у листерий при культивировании их при комнатной температуре (22 °С), в культурах, выращенных при 37 °С (как это обычно делается в бактериологических лабораториях) жгутики, как правило, отсутствуют и, соответственно, подвижность не обнаруживается, поэтому при бактериологических исследованиях необходимо учитывать эту особенность листерий, иначе можно ошибочно отнести листерии к *Erysipelothrix* – возбудителю рожи.

Листерии хорошо окрашиваются всеми анилиновыми красками. По Граму они окрашиваются положительно (темно-фиолетовый цвет). Возможное биполярное окрашивание листерии Зеллигер (1961) связывает с различной скоростью обесцвечивания средней части и концов микробной клетки. Грамположительная окраска свойственна, как правило, молодым культурам листерий. В 2-5-дневных культурах часть клеток легко обесцвечивается спиртом и поэтому окрашивается грамотрицательно. С 14-го дня почти все клетки в культуре листерии могут окрашиваться грамотрицательно. По нашему мнению, изменение окраски листерий по мере старения культуры связано с гибелью и аутолизом бактериальных клеток. Чем старше культура, тем больше в ней погибших клеток, соответственно больше клеток, окрашивающихся грамотрицательно. Листерии могут окрашиваться грамположительно и реже грамотрицательно (в старых культурах). Особенно часто это наблюдалось в культурах, выращенных при температуре 37 °С, в то время как микробные клетки, выращенные при температуре 20 °С, имели грамположительную окраску.

По данным Д. Ю. Халла (1964), в молодых и старых культурах листерии отличаются по своей электронно-микроскопической плотности и строению. В молодых культурах большинство клеток были однородными и окрашенными в темный цвет. При окраске по Граму клетки из этих культур окрашивались резко положительно. В старых культурах обнаруживали клетки с неоднородной электронно-микроскопической плотностью, средняя часть клеток выглядела в виде гранулярной массы. В мазках, окрашенных по Граму, клетки из этих культур были

нечетко окрашенными или целиком грамотрепательными. Бактериологу нужно помнить об этих свойствах листерий при их идентификации и дифференциации от других видов микробов. В листериях не обнаружены включения серы, железа, жира, не выявлено наличия метахроматических зерен волютина. Листерии не спор не образуют.

Подвижность. Отличительной особенностью листерий является их подвижность – ценный дифференциально-диагностический признак, позволяющий отличать листерий от сходных рожистых бактерий. Подвижность возбудителя листериоза своеобразная - кувыркающиеся, вращательные движения в сочетании с поступательными.

Однако, подвижность можно уловить лишь при соблюдении определенных условий культивирования. Дело в том, что подвижность листерий наиболее ярко выражена в молодых (6-12-часовых) культурах, выращенных при комнатной температуре (20-22 °С). Листерии, выращенные в термостате при температуре 37 °С, как правило, лишены подвижности, и лишь единичные клетки сохраняют таковую.

Проведенные исследования с помощью электронного микроскопа показали четкие различия в наличии жгутиков у листерий, выращенных при комнатной (22 °С) и термостатной (37 °С) температурах. Исследование этих же культур методом висячей капли подтвердило почти полную неподвижность листерий во втором случае (термостатная культура) и хорошо выраженную подвижность в первом случае (комнатная культура). Число жгутиков у листерий, по данным различных исследователей, колеблется от 1 до 5. Подвижность листерий зависит и от продолжительности инкубации культуры. По мере удлинения срока инкубации подвижность листерии снижается. На степень подвижности влияет характер среды и рН. Наиболее активное движение наблюдалось у листерий, выращенных на жидких и полужидких средах. Все сказанное выше о подвижности листерий необходимо учитывать при проведении бактериологического исследования на листериоз. Методически неверно проведенное исследование на

подвижность часто служит причиной неправильных выводов о принадлежности выделенного микроба. На это обстоятельство справедливо обращает внимание Волинтир (1967), который пишет, что листериоз обычно остается недиагностированным, так как первый же прием по идентификации микроба - исследование его подвижности – как правило, дает отрицательный результат, если листерий культивируют при 37 °С.

Устойчивость. Листерии могут длительное время сохранять свою жизнеспособность во внешней среде. Они способны размножаться в мертвых тканях при низкой температуре. Л. А. Поманская (1963) установила возможность размножения листерий в почве. В ее опытах число микробов возрастало за 6 суток при 18-20 °С во влажной почве (влажность 32 %) в 1530 раз и в более сухой (влажность 25 %) – в 3164 раза (это противоречит данным В. И. Гершуна (1981)). Она же установила, что листерии способны не только сохраняться, но и размножаться в речной воде, в воде прудов и других водоемов. Поэтому загрязненные листериями водоемы опасны в эпизоотологическом и эпидемиологическом отношении. Данные по устойчивости листерий, во внешней среде представлены в таблице 1. Варнекке (1963) установил, что в пробах молока и сыворотки листерии сохраняются около двух лет.

Листерии сохраняются в кале и моче овец от 5 до 12 месяцев. Прямые или рассеянные солнечные лучи убивают их в течение 2-15 суток. Г. А. Гриницина (1962) установила, что в кошаре при колебании температуры от - 4 до +24 °С, влажности 30-98 %, скорости ветра 0,063-0,160 м/сек, освещенности 5-585 люкс листерии сохранялись на стенах, полу, яслях, щитах до 8-10 месяцев, в решетках до 14 месяцев; на выгульном дворике до 15-45 суток, зимой до шести месяцев.

Листерии погибают под действием 5 %-ного раствора лизола или креолина через 10 минут; 2,5 %-ные растворы формалина или едкого натра убивают их через 20 минут, марганцовокислый калий в 2,5 %-ной концентрации – через 5 минут, раствор риванола 1:250 – через 1 час, раствор сулемы 1 : 1000 – через 5 ми-

Таблица 1. Устойчивость возбудителя листериоза во внешней среде.

Объекты внешней среды	Длительность сохранения Жизнеспособности	Исследователь
В почве	В период весна-лето до 33 дней, осень-зима до 5 месяцев, летом до 33, зимой до 72 дней Около двух лет	М. А. Бараненков 1963 М. М. Халимбеков 1956 Варнекке 1963
На почве, загрязненной навозом	Весной до 33 дней, летом до 20 дней Осенью до 55 дней, зимой до 115 дней	М. А. Бараненков 1963
В песке	До 10 месяцев	Варнекке 1963
В воде	При температуре 35—37 ° до 346 дней При температуре 15—20 ° до 299 дней При температуре 2—8 ° до 737 дней Летом от 70 дней до 15—20 месяцев	Л. А. Поманская 1961, М. А. Бараненков 1963, А. В. Селиванов, Г. А. Гриницина 1961
Во льду	709—928 дней 5 1/2 месяцев	Л. А. Поманская 1961 М. А. Бараненков 1963
В овсе	До 105 дней До 10 месяцев	В. И. Попов 1960, Г. А. Гриницина 1964
На замороженном овсе	До 1009 дней	Л. А. Поманская 1961
В отрубях	До 105 дней От 5 до 12 месяцев	В. И. Попов 1960 А. В. Селиванов 1961
В комбикорме	До 10 месяцев	Г. А. Гриницина 1962
В сене	До 134 дней До 8 месяцев От 40 до 180 дней	В. И. Попов 1960 Г. А. Гриницина 1962 М. М. Халимбеков 1956
В мясо-кост муке	До 134 дней	В. И. Попов 1960
В навозе	В весенне-летний период 2—4 месяца В осенне-зимний период 5—7 месяцев Летом до 22, зимой до 60 дней	А. В. Селиванов и Г. А. Гриницина 1961 М. М. Халимбеков 1956
В трупах в земле	От 45 дней до 4 месяцев	М. А. Бараненков 1963
В шурах	Неконсервированных — до 90 дней, консервированных солью — до 62 дней	М. А. Бараненков 1963

нут, раствор хлорной извести при содержании 100 мг активного хлора в 1 л – в течение одного часа, 200 мг в течение 30 минут, 400 мг в течение 10 минут.

Листерии хорошо развиваются в стерильном овечьем молоке при температуре от 4 до 20°C; устойчивы к тепловой обработки сыра качкавала; в кислом молоке сохраняют жизнеспособность до 48 часов при температуре 18-20 °C, более 6 дней при 10 °C.

Приведенные данные (таблица 1) свидетельствуют о весьма значительной устойчивости листерий во внешней среде и по отношению к различным физико-химическим факторам. Очень важны сведения о возможности размножения листерий в почве и воде.

Все эти наблюдения имеют чрезвычайно большое эпизоотологическое и эпидемиологическое значение, объясняют причины стационарности болезни (повторяемости в неблагополучных

пунктах в течение нескольких лет подряд) и должны учитываться при проведении мероприятий.

Устойчивость листерий к воздействию физико-химических факторов.

а) Температурный фактор

Интерес к температурной устойчивости листерий имеет практическое значение. Особенно большое внимание, он привлек после вспышки листериоза в Новой Англии (США), когда после употребления в пищу пастеризованного молока, контаминированного листериями, заболело 49 человек и 14 из них скончались (D. Fleming, 1985). Ретроспективный анализ литературы дает ряд противоречивых сообщений о термоустойчивости листерий. J. Potel (1951) сообщил, что листерии в молоке выдерживают температуру 80 °С в течение 5 минут.

R. Bearns (1958) указывал, что листерии при концентрации 5×10^4 м.т./мл выдерживают температуру 61,7 °С в течение 35 минут. J. Donker-Voet (1962) приводит данные о том, что инактивация листерий в молоке происходит при температуре 73 °С в течение 15 сек. J. Bradshaw (1985) исследовал термоустойчивость эпидемического штамма листерий при его концентрации 10^{10} м.т./мл молока. Автор термически обрабатывал данную суспензию в герметически закрытых пробирках из бромсиликатного стекла и пришел к выводу, что листерии не выдерживают режима пастеризации (72,7 °С – 15 сек.). К аналогичным выводам пришли и Донелли с соавторами (C. Donnelly et.al., 1986, 1987).

В последнее время ряд ученых утверждает, что способность листерий выживать при температуре пастеризации связана с внутриклеточным персистированием листерий в макрофагах или нейтрофилах. Оригинальные исследования были проведены группой V. Binning.et.al. (1986, 1988). Они изучали термоустойчивость внутриклеточных и свободно циркулирующих листерий в молоке коров. Внутриклеточное расположение листерий получали путем их фагоцитоза фагоцитами молока (88 % – полиморфно-ядерные лейкоциты – ПЯЛ, 8 % – макрофаги, 4 % – лимфоциты). Исходная концентрация свободно суспендированных

и внутриклеточных листерий равнялась 10^6 м.т. в 1 мл молока. По результатам параллельных экспериментов с прогреванием образцов при температурах 57,8; 62,8; 66,1; 68,9; 71,7; 74,7 °C авторы пришли к выводу, что внутриклеточное расположение листерий не повышает их терморезистентность. Однако эти исследователи отмечали относительную эффективность пастеризации при температуре 62,8 °C в течение 30 минут, и недостаточную эффективность данного процесса при 71,7 °C в течение 15 сек.

Группа М. Doyle (1987) также изучала воздействие температурного фактора на устойчивость листерий в молоке. Исследователи указывают, что в 11 опытах из 12 в каждом полиморфноядерном лейкоците находилось в среднем 1,5 – 9,2 клетки листерий. Продукт прогревался в диапазоне 71,7 – 73,9 °C в течение 16,4 сек. и температурном диапазоне 76,4 – 77,8 °C в течение 15,4 сек. Полученные результаты свидетельствуют, что в 6 из 9 опытов с нагреванием в диапазоне 71,7 – 73,9 °C листерии оставались жизнеспособные. Авторы пришли к выводу, что режим пастеризации 71,7 °C – 15 сек. не инактивирует листерии.

J. Garayzabal. et. al. (1986) сообщили, что они выделяли листериозную палочку из пастеризованного молока (режим 78 °C – 15 сек.). Авторы исключают возможность контаминации и считают, что режимы пастеризации не инактивирует листерий. Листерии не погибают в молоке при 60 – 67,5 °C. Именно этот режим чаще всего используют при изготовлении мягких сыров. Видимо с этим связаны вспышки листериоза при употреблении мексиканского и других сортов мягких сыров.

По данным итальянских исследователей (Qulntavalla.s.et.al., 1989) необходима экспозиция от 10,5 до 14,3 минуты при температуре 65 °C для снижения 7/10 количества бактерий. Испанские исследователи (F. Suares.et.al., 1989) утверждают, что пастеризация позволяет инактивировать культуру листерий. По сообщениям канадцев (J. Farber.tn.al., 1988) пастеризация молока при температуре 60 – 67,5 °C является неэффективной и может способствовать выживанию листерий. К аналогичному выводу при-

шли и французские исследователи (J. Lamare.et.al., 1989). Они отмечают, что при температуре 72 °С термическая устойчивость листерий понижалась лишь после экспозиции в 1,6 минуты. Способность листерий выживать после пастеризации молока остается до конца не выясненной и требует дальнейшего изучения. Слабо изучены и вопросы инактивирующего воздействия высокой температуры на мясные продукты, полученные от животных, больных листериозом. Так, по данным Р. Караіоанпглан (1980) листерии выживают в мясных фрикадельках в течение 15 минут при прогревании до температуры 85 °С.

S. Carpentez (1989) изучал выживаемость листерий в мясе птицы, подвергнутой тепловой обработке с последующим длительным хранением до 4-х недель при температуре хранения от 4 до 10 °С. Образцы были подвергнуты вакуум-упаковке и упакованы в газонепроницаемую пленку. По его данным в образцах, подвергнутых тепловой обработке до 71,1 °С листерии выживают. Хранение образцов при указанных параметрах способствовало увеличению количества популяции листерий. Примерно к такому же выводу пришли и канадские исследователи (J. Farber. et.al.,1989), утверждающие, что готовые ферментированные мясные продукты, обработанные посолочными веществами и подвергнутые термообработке по стандартным параметрам, могут содержать листериозную культуру. Учитывая возросшее применение в быту микроволновых печей ряд исследователей (B. Ling. et.al., 1989, M. Harrison.et.al., 1989) изучали действие микроволновой обработки пищи на рост и развитие листерий. Установлено, что обработка мяса в печах мощностью 700 Вт, при использовании ряда температурных параметров до показателя 82,2 °С не избавляла пищевой продукт от контаминации листериями, а последующее ее хранение до 10 °С приводило к увеличению числа бактерий. При температурном показателе в 87 °С и экспозиции в 15 минут количество жизнеспособных листерий доходило до 10 КОЕ/г. После завершения цикла приготовления пищи согласно инструкции (38 мин.), когда температура поверхности тушки цыплёнка достигла 80-99 °С (внутри тушки температура

достигла 78 °С) уровень жизнеспособных клеток понижался, но полного избавления продукта от листерий не наступало.

Бутко М. П. (1983) сообщает, что при варке колбасных батончиков диаметром 35-50 мм листерии погибают через 75 мин., если диаметр колбасы 65 мм и экспозиция варки не менее 90 мин. При температуре 75-85 °С в кусках мяса от животного, больного листериозом, при их весе до 2,5 кг и толщине до 10 см, листерии инактивируются после одночасовой варки.

По данным И. С. Тартаковского и др. (2002) наибольшее число исследований посвящено изучению терморезистентности листерий, поскольку последняя определяет режимы пастеризации молока, необходимые для гибели возбудителя. Рекомендуемые в настоящее время FDA (США) режимы пастеризации молока, составляющие 71,7 °С в течении 15 минут или 62,8 °С в течении 30 минут, считаются достаточными для полной инактивации листерий. Особенности высокой терморезистентности листерий связывают с их внутриклеточным паразитизмом.

б) Влияние концентрации *NaCl* и величины pH

Н. Stenberg (1955) установил факт устойчивости листерий к высоким концентрациям поваренной соли. Так, листерии сохраняют жизнеспособность в бульоне с 6 % NaCl более года, в органах заражённых животных при хранении их в 6 %-ном растворе хлористого натрия – до 2-х месяцев, в бульоне при 24 %-ном содержании поваренной соли – до 22-х дней. По данным Малахова Ю. А. (1960), в мясе, хранившемся в 24 %-ном растворе NaCl, листерии сохраняли жизнеспособность до 400 дней. Будко М. П. сообщает, что в мясе, находящемся в рассоле, содержащем до 30 % NaCl, 0,05 % нитрата и 0,25 % нитрата калия, листерии сохраняли жизнеспособность в течение 2-х месяцев при температуре хранения +4 °С. По данным J. Prentice (1989) в 25 %-ном растворе NaCl листерии выживают до 132 суток.

При консервировании продуктов питания, в том числе мяса и мясопродуктов, показатели концентрации хлористого натрия, pH, температуры взаимосвязаны и оказывают решающее дей-

ствие на результаты консервирования. М. Shahamat с соавтор. (1980), изучая влияние указанных параметров, а также ингибирующее воздействие нитрата натрия на листериозную клетку, пришли к выводу, что антимикробное действие вышеприведённых веществ и факторов на листериозную палочку начинает проявляться уже в присутствии 3 % NaCl, pH – 5,5 и низких температурах.

Группа J. Gare (1987) изучала выживаемость листерий в говяжьем фарше, хранящемся при температуре холодильника +4 – +8 °С. Пробы обсеменяли культурой в количестве 5×10^5 – 5×10^7 КОЕ на 1 г и упаковывали в кислородопроницаемую и кислородонепроницаемую плёнку при стандартных показаниях pH мясного фарша от здорового животного (5,5-5,8). Наблюдения проводились в течение 14 дней. Авторы пришли к выводу, что в мясном фарше листерии могут выживать в условиях охлаждения, не уменьшая при этом числа жизнеспособных клеток на протяжении всего времени исследования. О. Konner с соавторами (1986) также изучали влияние температуры, поваренной соли и величины pH на листериозную культуру. Они установили наличие роста в капустном соке при температуре 30 °С и снижении NaCl до 1,5 %. При 5 °С, pH – 5,6 и соли до 5 % рост бактерий был в течение всех 25 дней наблюдения. При снижении pH до 4,4 рост листерий прекращался на 3-й день. При температуре 5 °С и pH 4,8 скорость отмирания листерий была меньше, чем при температуре 30 °С. Авторы пришли к выводу, что листерии хорошо растут при значении pH меньшем, чем те, которые считаются минимальными для их роста. Данные исследования по контаминации и сохранности листерий в капустном соке были проведены после вспышки листериоза в Канаде в 1981 году, когда заболел 41 человек. Причиной вспышки послужил салат из капусты, обсеменённой листериозной палочкой (W. Schlech, 1983). Данные эти в определённой степени совпадают с результатами исследований, ранее проведённых Гершуном В. И. (1979). Он утверждает, что в силосном соке с показаниями pH 4,2 – 5,2

листерии сохраняются 5-20 дней, а при величинах рН 5,7 – 9,6 они остаются жизнеспособными до 24 месяцев.

Помимо температурной устойчивости, изменениям величины рН, концентрации солей, не меньшее значение имеет чувствительность листерий к другим факторам. Значения активности воды, способность к росту в аэробных условиях позволяет листериям размножаться в широком диапазоне условий внешней среды и продуктах длительного хранения.

Эпидемиология листериоза

Начиная с середины 80-х годов XX века листериозу людей стали уделять все большее внимание. Это обусловлено лавинообразным появлением вспышек листериоза, связанных, как позднее выяснилось, с употреблением пищевых продуктов, загрязненных листериями. Ухудшает ситуацию и то, что болезнь протекает очень тяжело, как у новорожденных, их матерей, так и у пожилых людей.

Самое большое число случаев приходится на первую возрастную группу, состоящую из новорожденных и детей до 1 месяца. Сравнительная частота этих случаев в разных странах в среднем составляла 35,6 % (от 21,1 % до 71,1 %). Наименьшее число наблюдалось в Японии, самый высокий процент в Словакии (71,1 %) и в США в период с 1933 по 1966 гг. (39,3 %). В Канаде (46,3 %), в Новой Зеландии (41,6 %), в ГДР (50,0 %) и большей части Франции в течение различных периодов частота заболевания была высокой.

Интересно, что в США в 1968-69 гг. этот процент заболевания снизился до 27,3 %. Это значит, что значение листериоза для более старшего возраста возрастает. То же наблюдалось в Дании (27,1 %), в Великобритании 1967-81 гг. (24,5 %) и Нидерландах в 1958-76 гг. (25,4 %).

В возрастных группах от 10 до 40 лет коэффициент был самым низким, а после 40 лет он вновь увеличивался за исключением ГДР, где 42,2 % случаев имели место среди больных в возрасте 18-35 лет (Ralovich, 1984).

Самый высокий коэффициент заболевания листериозом наблюдается среди детей до 1 месяца.

Листериоз является болезнью с высоким процентом гибели – до 62 % (С. Cherubin.et.al. 1981). Несмотря на то, что болезнь поражает в основном людей с пониженной резистентностью старых или в младенческом возрасте, люди другой категории не избегают риска заражения. Этому способствует использование в медицинской практике стероидов и других иммуноподавляющих препаратов. Увеличивающееся потребление алкоголя, наркотиков играет роль в распространении листериоза (Т. King, 1988).

Продукты питания могут быть контаминированы листериями из-за некачественного пищевого сырья, используемого в процессе приготовления пищи. В первую очередь вызывают опасение те продукты, которые употребляются в необработанном виде – охлажденные свежие салаты, овощи, фрукты. Другая категория продуктов питания – это те, которые прошли обработку, консервирующую их на незначительное время. К этой группе относятся некоторые сорта сыра, пастеризованное молоко и молочные продукты, замороженное мясо. В следующую категорию входят продукты, в технологии приготовления которых использовались достаточно традиционные методы консервирования, гарантирующие до недавнего времени их санитарное качество. К этой категории можно отнести колбасы и копчености. Однако, необходимо подчеркнуть, что все продукты питания, при создании которых используются сырые пищевые материалы могут являться источником листериоза.

Крупные первые вспышки пищевого листериоза, которые и высветили данную проблему, были зарегистрированы на Северо-Американском континенте. В 1981 году в Новой Шотландии (Канада), в 1983 году – в штате Массачусет (США) и в 1985 году – в Южной Калифорнии (США). Причем, в Южной Калифорнии они приняли характер эпидемии, т.к. заболел 181 человек и летальность составила 33 % (К. Brum, 1987, С. James, 1985). Эпидемиологический анализ указанных случаев позволяет выявить определенную закономерность, определить возможные

пути заражения и оценить механизм взаимодействия заражающей дозы и ее восприятия хозяином. Все эти вспышки были обнаружены в необычных обстоятельствах. В Новой Шотландии вспышка произошла в родильном доме. Эпидемию не распознали до тех пор, пока степень заражения не достигла примерно 1,3 % от всех родов, имеющих в госпитале. Ретроспективный анализ лабораторных данных показал, что годом раньше в том же районе также была вспышка листериоза, но она оказалась незамеченной вследствие трудности обнаружения на общем фоне заболевания. В Массачусете вспышка была расшифрована, т.к. департамент здравоохранения предпринял наблюдение за всеми изолятами листерий в штате после заболевания в госпитале города Бостона в 1979 году.

В Южной Калифорнии вспышка была обнаружена потому, что единственный госпиталь в округе Лос-Анджелес имеет возможность регистрировать основную часть акушерских заболеваний среди испанского населения этого района. После идентификации вспышки эпидемиологи пытались установить источник распространения листерий. Был составлен опросник, касающийся вопросов питания людей, заболевших и подозрительных по заболеванию. Врачи пришли к выводу, что диапазон продуктов, которые могут быть контаминированы листериями так широк, что исследование всех продуктов без информации о возможном источнике заражения неэффективно. После обработки полученных данных прослеживалась статистически существенная связь между продуктами и заболеванием. Итоги бактериологического исследования подтвердили наличие указанных связей, выделив листериозную культуру из пищи людей. В Южной Калифорнии таким источником оказался мягкий сыр типа «мексиканский». В Новой Шотландии вспышка была связана с употреблением шинкованной капусты (W. Schlech.et.al., 1983). В связи с этим было выдвинуто предположение, что капуста была контаминирована посредством овечьего навоза, полученного от зараженного стада используемого в качестве удобрения. Большое удивление вызвали результаты анализа вспышки листериоза в Бостоне. Там впервые была уста-

новлена причастность к ней пастеризованного молока. В первом опроснике о продуктах питания пастеризованное молоко не было исключено, полагали, что это надежный продукт. Однако никакие другие продукты не были идентифицированы на первом опросе. Второй опросник показал, что пастеризованное молоко было единственным продуктом, покупаемым в тех магазинах, которые могут быть связаны с болезнью. Лица, употреблявшие больше молока, обладали большей возможностью заражения. Лица, употреблявшие обезжиренное молоко, были в меньшей степени подвержены опасности заражения. Исследования процесса пастеризации не обнаружили дефектов в пастеризирующем аппарате. Исследование на фосфатазу не выявило аномалий. Поэтому и возник вопрос о возможности выживания листерий при использовании этих режимов в пастеризации молока.

При указании вспышки указывают на два разных аспекта болезни. Заболевание в Новой Шотландии и в Лос-Анджелесе коснулось в основном беременных женщин и их потомства (83 % случаев в Н. Шотландии). В Бостоне, наоборот, только 14 % случаев были перенатальными, остальные отмечались у взрослых людей с пониженной резистентностью. Интересен и следующий факт. При вспышке в Лос Анжелесе «мексиканский» сыр был очень сильно контаминирован листериями. При первичном посеве материала было обнаружено множество КОЕ, напротив, бостонская вспышка явилась результатом выживания единичных листерий, прошедших пастеризацию. Тем самым подтвердилась гипотеза, что люди с пониженной резистентностью особенно восприимчивы к низким дозам листериозной культуры. По данным Schonberg, (1988) в США частота случаев листериоза составляет от 4 до 7 человек на 1 млн. жителей.

Вспышка листериоза в Северной Америке не является исключением. Можно привести беглый обзор случаев листериоза людей, описанных в литературе за последнее десятилетие.

F.Quaglio.et.al. (1979) сообщает о ряде вспышек листериоза людей в Италии. Указывает, что наиболее частыми клиническими формами листериоза являются менингит, менинго-энцефа-

лит (до 75-89 % больных), септецимия. Особое внимание он обращает на способность листерии проникать через плацентарный барьер и вызывать у новорождённых субклиническую или инвазивную инфекцию. Листерийные поражения новорождённых составляют до 75 % всех случаев листериоза. Латентность при этих формах заболевания достигает 50-80 %. Автор один из первых предложил обратить особое внимание на роль продуктов питания, как фактора распространения листериоза.

В Испании E. Balsech (1981) сообщает о выделении и идентификации 17 штаммов листерий от больных людей. C. Sanchez и др. (1981) описывают 10 случаев листериоза в Барселонской больнице. До 1986 года число случаев листериоза людей в среднем за 20 лет в этом регионе было достаточно постоянным и равнялось приблизительно один в шесть месяцев. С лета 1986 года по декабрь 1987 года произошло заметное увеличение числа заболеваний и достигло цифры 29 случаев. Причём регистрации подлежит менингеальная форма листериоза людей (N. Skovgaard и др., 1987).

В Скандинавских странах E. Bauvet и др. (1982) описывают сорок случаев менингита, вызванного листериями. Они отмечают, что у 58 % исход болезни – выздоровление, причём у 8 % без осложнений.

S. Larson. et.al. (1979) описал 7 случаев листериоза у новорождённых в центральной части Швеции, 2 из них закончились летальным исходом.

В Нидерландах по данным E. Kampelmacher (1980) на протяжении 20 лет от людей выделено 793 штамма *Listeria monocytogenes*, в т.ч. 193 от новорождённых и детей до 2-х месяцев. У взрослых людей листерии выделяли как среди больных листериозом (242), так и среди клинически здоровых (358) людей. Предрасположенность к листериозу отмечается у людей после лечения иммунодепрессантами и трансплантации органов (J. Herrero et.al. 1989).

В Швеции до 1983 года в течение многих лет описывалось примерно по 9 случаев листериоза ежегодно. За 1983-1984 гг.

стало известно о 25 случаях листериоза (Maliverni.et.al. 1985). В октябре 1985 г. заболело 10 человек, из них трое скончались. Источником листериоза людей послужил сыр.

Во Франции по данным А. Morel (1989) в университетском госпитале города Руана за 20 лет было зарегистрировано 249 больных листериозом. Автор указывает, что в среднем 5 женщин из 1000 в период беременности подвергаются риску заражения листериозом.

Vitti (1980) описал 20 случаев листериоза новорождённых, из них у 7 наступил летальный исход. В. Yersin (1981) описал 10 случаев инфекции, обусловленной листериями. Gladel (1987) сообщила о результатах исследования национальной медицинской лаборатории. Ею был сделан запрос в 422 лаборатории страны о случаях листериоза за 1984 год. Ответили 285 (67 %) лабораторий, из которых 172 имели положительные результаты по листериозу (всего 630 случаев). Из указанного количества – 352 (56 %) касается беременных женщин и новорождённых. По подсчётам автора на 1 млн жителей Франции приходится в среднем 11,3 случая листериоза.

По данным национального справочного центра Франции в 1985 году у людей выделено 215 штаммов листерий. По сообщению V. Gonlet (1989) во Франции отмечается тенденция роста данного заболевания.

В Германии в 1986 году было зарегистрировано 79 случаев листериоза. Причём, по данным J. Kulz (1990), в ряде случаев источником внутриутробного заражения плода листериями послужили беременные женщины, заразившиеся, в свою очередь, листериозом в результате употребления продуктов питания, контаминированных бактериями.

F. Allerbergen (1989) сообщает, что за 1986 год в Министерство здравоохранения Австрии поступили данные о 39 случаях заражения у людей.

В Шотландии, где с 1 января 1988 года введён надзор за листериозом среди людей, выявлено на протяжении года 35 слу-

чаев бактериологически подверженного листериоза человека (D. Campbell, 1989).

Несколько вспышек листериоза за последние десятилетие описывается в Великобритании (D. Bovi, 1983; A. Dajdjonii, 1983), Японии (S. Inagichara, 1982), Бразилии (E. Ramires, 1979; L. Cintra, 1983).

Необходимо отметить, что не всегда в настоящее время и практически никогда до 80-х годов (за редким исключением) нет возможности проследить источник листериозной инфекции при заражении человека.

По сообщению А. Froun (1989), количество регистрируемых в мире заболеваний листериозом составляет около 20 000 случаев в год. Однако, не вызывает сомнения, что это только верхушка айсберга, так как только в нескольких развитых странах листериоз людей является регистрируемой болезнью. Интересные данные приводят в своей работе Маненкова Г. М., Родина Л. В., Цвиль Л. А. (2000). В России, начиная с момента регистрации (1992) вспышки пищевого листериоза выявлены не были. Ежегодно регистрируется от 40 (1996 г.) до 89 (1997 г.) случаев, в основном в г. Москве и Тульской области. В Москве ежегодно регистрируется заболеваемость людей различными формами листериоза, выделяется возбудитель листериоза из пищевых продуктов и от грызунов. Анализ данных состояния заболеваемости людей листериозом показывает, что за период с начала официальной регистрации с 1992 по 1999 годы в Москве выявлено 117 случаев, что составляет 25,2 % от количества случаев листериоза по Российской Федерации – 465 случаев.

Роль пищевых продуктов в возникновении листериоза людей

Вышеприведенный беглый обзор эпидемиологических данных свидетельствует о возросшей проблеме листериоза среди людей, конечной причиной распространения этой болезни являются продукты питания. В связи с этим остановимся подробнее

на тех продуктах, которые играли ключевую роль в возникновении вспышек листериоза.

а) Молоко. В настоящее время твердо установлено, что листерии могут быть обнаружены в молоке коров с разной степенью мастита или без него. Аналогичные результаты получали и другие исследователи (О. Potel, 1953,1954; К. Dedie, 1955; J. Vries, 1966; D. Fenlon, 1969).

Эпидемиологическая роль молока в передаче болезни подозревалась во время эпидемии листериоза в Германии в середине 50-х годов. Патогенный агент выделили и из молока овец и коз (К. Dedie, 1955, 1958; О. Poter, 1955; I. Comi, 1987), исследовали традиционным методом 140 проб молока коз и в 9 из них обнаружили *Listeria monocytogenes*.

J. Farber (1983) сообщает, что при исследовании больших танков для сырого молока в штате Онтарио (США) в 12,4 % из 445 исследуемых образцов, были выделены штаммы, идентифицированные как *Listeria monocytogenes* в 1,3 % (6 из 445), как *L.m.*, и в 1,3 % как *L.w.*

Других видов листерий не выделяли. D. Lucais (1985) сообщили, что в Центральной Испании за 16 месяцев было отобрано 95 образцов. В 89,5 % выделена палочка *Listeria grayi* (*L.g.*), 45,3 % – *Listeria monocytogenes*, 15,86 % – *Listeria ivanovi* (*L.i.*), а в 3,1 % – *L. welschimeri* (*L.w.*), в 1,05 % – *L. seeligeri* (*L.s.*). Р.Наyes (1986) указывает, что во время вспышки листериоза ими была исследована 121 проба сырого и 14 проб фильтрованного молока. В 12 % и 14% соответственно обнаружена листериозная палочка. J. Garagrabel (1986) сообщил, что из 28 проб пастеризованного молока он выделил культуры *Listeria grayi* (69,3 %), *L. monocytogenes* (21,4 %), *L. innocua* (*L.in.*) (10,7 %), *L. welschimeri* (3,6 %). G.Siragusa (1988) установил, что из коммерческого йогурта (рН – 4,1) листериозная палочка выделяется в течение 9 дней хранения.

б) Сыры. Как вспышка в Ю. Калифорнии (1985), так и в Швеции (1987) связана с потреблением сыра. Это и побудило исследователей более детально заняться вопросами санитарной оценки

сыров. По сообщениям С. Breer (1987) швейцарские исследователи исследовали 799 исследуемых проб мягкого, полумягкого и твердого образцов сыра, в основном из Швейцарии и Франции. Они установили, что 96 (12 %) из 799 исследуемых проб содержат листерии. 50 изолятов были типированы как *L.m.*, другие 46 принадлежали к *L.in.* Все 88 проб твердого сыра были свободны от листерий, а среди 205 проб полумягкого сыра – 4 (2 %) содержали *L.in.*

Степень выделения листерий из 604 проб мягких сыров составила 19,2 % образцов. Авторы отмечают, что нет никакой разницы между образцами приготовленными из пастеризованного и непастеризованного молока.

Анализ всех листериозных сыров показал, что эту бактерию можно обнаружить только на поверхности продукта. Все пробы, взятые из середины сыров, были свободны от листерий. Количество бактерий доходило до 4х10 колонеобразующих единиц (КОЕ) на 1 грамм. Проведенные авторами дополнительные исследования показали следующие результаты: ни одна из 24 проб молока, сыворотка, сгустка не содержала листерий. В течение первых пяти дней созревания при 12 °С с поверхности 33 сыров не выделяли листерий. Но через две недели, вслед за повышением pH у 6 (из 36 образцов), обнаружили искомую культуру. Еще через неделю 41 проба (46) – 80,1 % оказалась контаминирована листериями. В конце срока созревания (4 недели) листериозная культура была выделена от 58 проб (28 образцов из 48).

В ФРГ доктор J. Serla (1987) проводил исследования 706 проб сыра различных типов. По приводимым данным только 8,2 % были контаминированы листериозной полочкой. Из них 2,5 % – *L.m.*, 5 % – *L.in.*, 0,7 % – *L.s.* Авторы пришли к выводу, что только мягкие и полумягкие сорта сыра обладают оптимальными условиями для присутствия и развития листерий. Разновидность сыров с клейкой поверхностью дала самые высокие результаты присутствия.

Группа А. Veber (1088) в период с октября 1987 года взяла 245 проб у немецких и 264 пробы у иностранных сортов сыра, про-

дававшихся в Северной Баварии. В 60 образцах (11,8 %) из 506 исследованных обнаружены листерии. В 29 случаях это *L.m.* и в 31 случае это *L.in.* По данным исследователей из Великобритании P.Pini.et.al. (1988) 10 % из 22 проб британского и импортного мягкого сыра содержали *L.m.* в количестве 10 КОЕ/1 г. Чаще всего были контаминированы сыры из Италии (16 %) и Франции (14 %), реже из Кипра (10 %) и Великобритании (4 %). Из 706 образцов сыра, производимого в Северной Америке, *L.m.* обнаружена в 58 образцах, *L.m.* – в 35, *L.s.* – в 5. Авторы указывают, что нет разницы из какого молока делали контаминированный сыр – сырого или пастеризованного. Из твердых, полутвердых и плавленых сортов сыра листерий выделить не удалось. Очень показательны выборочные исследования сыров и молока, проведенные во Франции Центральной лабораторией гигиены пищевых продуктов (G. Gledol, 1988). В течение января 1988 года она получила 51 пробу сырого молока из 13 департаментов страны. Из них 38 были положительны на листериоз. Из 873 проб пастеризованного и 330 проб сырого молока используемого для приготовления сыров, в 20 и 10 пробах соответственно обнаружена листериозная палочка (*L.m.* – 15, *L.in.* – 15). Из 149 образцов сыра «коммегис» – 2 контаминированы *L.m.*, из 289 полутвердых сыров – 10 контаминированы *L.m.*, 4 пробы солевого раствора оказались контаминированы листериозной культурой. Данные профессора Н. Seeliger (1988), по результатам годовичного исследования указанных продуктов, свидетельствуют, что австрийские, датские, французские, швейцарские и немецкие сыры, производимые хорошо известными компаниями часто бывают контаминированы культурой листерий. Указанная бактериальная культура была обнаружена в 30 различных видах продукции европейского происхождения. Автор подчеркивает, что не все сорта сыра представляют такую опасность. Мягкий кисломолочный сыр (деревенский) и твердые, покрытые коркой, обычно свободны от листерий. «Красные» сыры, ароматные и нравящиеся покупателям, по мнению автора, относятся к основным факторам заражения людей листериозом.

в) Мясо и мясопродукты. Инфицированные мясопродукты также могут являться причиной листериоза человека. О наличии листерий в мясе, признанным годным для употребления в пищу людей, сообщили А. Forray (1969), В. Raeovieh.et.al. (1970), Hohneg (1975). О выделении листерий из тушек замороженных цыплят и из мяса птицы указывали Kwantes (1971), К. Elischerova (1979) и др. Результаты изучения этого вопроса за последние 3-5 лет свидетельствуют о возросшей степени риска заражения людей посредством данных продуктов питания. По данным Guilleon, сообщенным в 1980 году, в Мозеле (Восточная Франция) 8% измельченного мяса и 6,5 % сырокопченых колбас содержали листериозную полочку. Через 7 лет К. Nikolas.et.al. (1987), проводя во Франции аналогичные исследования, получили цифры, превышающие вышеуказанные в 10 раз. R. Shcoen (1987) и J. Breur, О. Prandl (1988) подтвердили эти данные, обнаружив листерии в 70 % рубленого мяса и в 67 % копченой колбасы. Культуру *L.m.* выделили в 36 % мяса и 23 % колбасы. Аналогичные работы были проведены в ФРГ U. Shcmidt (1988), зимой и весной 1988 года изыали из торговли 30 проб свиного фарша и 30 проб свежей копченой колбасы с целью исследовать на наличие листерий. Данная культура была обнаружена во всех 30 пробах фарша и в 29 пробах копченой колбасы. В фарше чаще всего выделяли *L.m.* (80 %), далее идет *L.in.* (47 %) и *L.w.* (30 %). В колбасе *L.m.* составляла 59 % всех проб, *L.in.* – 83 %.

В 16 пробах свиного фарша количество колониеобразующих единиц распределялось следующим образом. В 8 пробах – 10 на 1 г, в 7 пробах между 100 и 1000 на 1 г, в 1 пробе свыше 1000 на 1 г продукта. Из 20 положительных проб копченой колбасы в 24 наличие КОЕ было менее 10 на 1 г, а в 5 от 100 до 1000 на 1 г продукта. Исследования, приведенные в 1988 г. в лаборатории Датского ветеринарного и сельскохозяйственного университета, выявили, что из 67 образцов говяжьего фарша, отобранного ими в магазинах, и 17 образцов тушек домашней птицы – 67 % и 94 %, соответственно, образцов были контаминированы листе-

риями, в том числе микроорганизмы вида *L.m.* были выделены, соответственно, из 28 % и 47 % образцов. Подобная работа была проведена M.Pini.et.al. (1988) в Великобритании. Из 100 проб сырых цыплят в 60 выделена листериозная палочка вида *L.m.* и в 28 пробах другие виды листерий. Помимо сырокопченых колбас, о которых уже упоминалось, есть сообщение К. Николас и др.(1986) о наличии листерий в сосисках, о выделении листериозной бактерии из колбасы сорта «салями» (J. Johnson, 1988). Практически ни один вид мясопродуктов не может быть гарантирован от обсеменения листериями.

г) Растительная пища. На растительную пищу, как на причину возможного заражения листериозом людей почти не обращали внимание. И только вспышка в Канаде в результате использования в пищу капусты, контаминированной листериями, когда заболело свыше 40 человек, также ее тяжелые последствия – 27 %-ная смертность новорожденных, гибель 2-х взрослых людей, привлекли внимание врачей к этому виду пищи человека. Подобные случаи возможны и при употреблении в пищу всех видов сырых овощей и салатов, выращенных на полях, удобряемых навозом от больных листериозом животных и фекалиями от людей носителей *L.m.* Учитывая тот факт, что собранные овощи хранятся в холодильниках при температуре +4 до +10 °С (достаточной для интенсивного размножения листерий), риск заражения людей возрастает.

Н. Seeliger (1988) считает, что овощи и фрукты, собранные с почв, где использовались органические удобрения, являются дополнительным фактором заражения, в первую очередь для пожилых и больных людей, а также детей и беременных женщин.

Очень интересные результаты в своих исследованиях получены Р. Шарма (1999). Им проверены на контаминацию листериями импортируемые в Россию продукты питания и установлено, что до 20 импортируемых мягких сыров, до 8 % мясопродукции и колбас, от 15 % до 40 % рыбы и рыбопродуктов содержат листериозную культуру

Культуральные свойства

Культивирование листерий на питательных средах

Листерии растут при свободном доступе кислорода воздуха на обычных (МПА, МПБ) питательных средах. Однако, по отношению к кислороду их правильнее характеризовать как факультативные аэробы, в связи с тем, что было отмечено хорошее развитие листерий при уменьшенном содержании кислорода, при замене кислорода углекислотой. Если же создать строго анаэробные условия без добавления углекислоты, то рост листерий резко замедляется, вплоть до полного прекращения. П. М. Свинцов (1946) наблюдал рост листерий на бульоне Китт-Тароцци в эксикаторе при давлении в 8 мм ртутного столба.

Наилучший рост листерий отмечается при температуре 37 °С. Однако, Ю. А. Малахов (1960) считает, что оптимальной температурой для выращивания листерий является 30-31 °С, а не 37 °С. Установлено также, что листерии хорошо растут при комнатной температуре (20-22 °С), но их рост появляется позднее и бывает более слабым, чем при выращивании этих же штаммов при 37 °С. Через 3-4 дня интенсивность роста становится такой же, как и при двухдневном выращивании в термостате. Зеллигер (1961) считает температуру 20 °С наиболее подходящей для физиологического развития микробов. Как уже указывалось раньше, при этой температуре подвижность листерий была выражена значительно сильнее, чем при выращивании культуры в термостате при температуре 37 °С. Установлена способность листерий размножаться при низких температурах. При температуре от -0,5 до + 4 °С листерии дают хороший рост, хотя и замедленный, в сравнении с выращиванием при температуре 37 °С (колонии листерий обнаруживают через 10-14 дней культивирования при температуре +4 °С). Верхняя граница роста листерий лежит между 42 и 44 °С.

Листерии способны расти на искусственных питательных средах при колебании рН от 5,0 до 8,0. Оптимальный рН для выращивания листерий 7,0-7,4. Наиболее удобны для выращивания возбудителя листериоза печеночные среды с добавлением

глюкозы (1 %), глицерина (2-3 %), триптозы, сыворотки крови, яичного белка. Также факторы роста листерий включают в себя цистин, лейцин, изолейцин, аргинин, метионин, валин, цистеин, рибофлавин, биотин, тиамин, липоевую кислоту. Пышный рост листерий отмечали на картофельном агаре с добавлением глюкозы и глицерина.

На обогащенных средах листерии растут более интенсивно, в то время как на простых питательных средах рост их более скудный, и особенно трудно бывает получить первые генерации микробов при выделении их из патологического материала. Штаммы, несколько раз проведенные через обогащенные среды, в дальнейшем хорошо растут на простых питательных средах. Однако, было установлено, что вирулентность листерий, выращенных на средах с 1 % глюкозы, для мышей, в 4-9 раз меньше, по сравнению с вирулентностью листерий, которых культивировали на средах с 0,2-0,6 % глюкозы.

Проведенные опыты показали, что увеличение концентрации глюкозы в среде роста вызывает снижение активности ферментов в клетках (дегидрогеназы, каталазы), что указывает на связь вирулентности листерий с их окислительной способностью. В некоторых экспериментах вирулентные штаммы росли более интенсивно в присутствии железа, чем авирулентные. В качестве исходных источников углерода и азота необходимы глюкоза и глютамин. Для нормального роста листерий на питательных средах необходимо наличие витаминов, в особенности рибофлавина, тиамина и биотина. Важными для роста листерий и стимулирующими его являются органически связанная сера, лейцин, изолейцин, валин, гистидин, аргинин, глютамин и метионин и липоевая кислота. Рост стимулируется Fe^{3+} и фенилаланином. По сообщению Ларсона (1965), отдельные штаммы листерий при выращивании нуждались в жирных летучих кислотах как в питательных веществах.

Рост на твердых средах. На мясопептонном агаре (МПА) в первые сутки роста обнаруживаются мелкие (0,2-0,5 мм в диаметре), прозрачные в проходящем свете, слегка выпуклые коло-

нии. Со временем колонии несколько увеличиваются в размере (до 1-3 мм в диаметре), становятся более плоскими и приобретают сероватый оттенок при падающем свете.

Если посев производился пастеровской пипеткой, то иногда в первые сутки роста наблюдали на поверхности агара тонкую нежную пленку, как бы легкое потускнение. Такую пленку бывает сравнительно трудно заметить. На вторые сутки рост листерий легко обнаруживается в виде иризирующего налета на поверхности агара, а при увеличении – в виде морщинистой пленки.

На мясопептонном печеночном и картофельно-пептонном агарах с 1 % глюкозы и 3 % глицерина листерии растут пышно, в виде серо-белых колоний или налета. На глицериновом картофеле отмечается слабый рост в виде слизистого налета. На кровяном агаре обнаруживаются колонии, окруженные прозрачной бесцветной зоной гемолиза.

При изучении характеристик роста обнаруживали колонии листерий нескольких типов. Наиболее типичными для листерий и чаще всего встречающимися следует считать колонии S-формы – круглые, выпуклые, с ровными краями, блестящей поверхностью, прозрачные в первые сутки роста; диаметр их обычно в пределах 1,0-1,5 мм. Эти колонии легко снимаются с агара. Как пишет Зеелигер (1961), на кровяном агаре отдельные колонии S-формы могут достигать 6 мм в диаметре. При этом у них образуется утолщенная периферическая зона, центр несколько западает.

При длительном хранении на искусственных питательных средах культуры листерий подвергаются диссоциации - появляются различные формы колоний, причем эти изменения идут от гладких S-форм к шероховатым R-формам через ряд промежуточных стадий (SR, RS и др.).

Бакулов и др. (1960) выделили культуру листерий R-формы из мозга овцы, которую длительное время лечили биомицином. Л. А. Поманская (1964) сообщила о выделении колоний листерий R-формы из селезенки мертворожденного ребенка, а также

из трупa степной пеструшки, погибшей в виварии. Эти факты говорят о возможности циркуляции измененных штаммов листерий в природе.

Колонии R-формы имеют шероховатые, неровные, как бы изъеденные края, несколько большие размеры, зернистую сухую консистенцию, трудно снимаются с агара. Микробные клетки из таких колоний иногда располагаются в виде цепочек, нитей, проявляют сильную склонность к спонтанной агглютинации, при пересеве их на бульон обнаруживают пленку и зернистый осадок. Выделенный нами штамм листерий в R-форме обладал пониженной вирулентностью и только после пассажа через мозг мышей приобрел способность вызывать положительную конъюнктивальную реакцию у морских свинок. Л. А. Поманская (1964), однако, указывает, что основные биохимические свойства R-культур по сравнению с S-культурами не изменялись, снизилась лишь вирулентность и повысилась агглютинативность. По степени диссоциации (по соотношению колоний S- и R-форм) она наблюдала практически недиссоциированные (0,25 R-колоний на 1000 S-колоний), более диссоциированные (3,2 R-колоний на 1000 S-колоний) и сильно диссоциированные (34 R-колоний на 1000 S-колоний) колонии. При хранении одного штамма во льду в течение года количество колоний R-формы увеличилось втрое.

По вопросу о возможности реверсии R-формы в S-форму единого мнения нет. Зеелигер (1961) сомневался в возможности такой реверсии. По его мнению, в культурах R-формы всегда присутствуют в небольшом количестве колонии S-формы, и преобладание их при последующих пересевах нельзя считать за реверсию. Такого же мнения придерживалась Л. А. Поманская (1964), в культуре, где лишь 4-5 % колоний было S-формы, после годового хранения в холодильнике обнаружила 100 % колоний R-формы. Она рассматривает этот факт не как реверсию, а как простое отмирание измененных клеток.

С этим мнением согласны далеко не все исследователи. Да и сама Л. А. Поманская наблюдала, что при заражении се-

лекционированной R-культурой в одном случае при посеве из селезенки белой мыши удалось получить до 35 % колоний S-формы.

Приведенные факты говорят о значительной изменчивости листерий, о возможности циркуляции в природе таких измененных штаммов, что заставляет работников бактериологических лабораторий обратить особое внимание на это обстоятельство при постановке диагноза на листериоз.

Рост на жидких средах. Мясопептонный бульон (МПБ) в первые сутки роста листерий слегка мутнеет. Помутнение, как правило, равномерное, при встряхивании такой пробирки наблюдали так называемые муаровые волны. Эти волны часто настолько нежны, что их можно видеть только при рассматривании пробирки на темном фоне. Через некоторое время (10-15 дней) бульон в пробирке светлеет, а на дне ее образуется слизистый осадок, который при встряхивании поднимается косичкой. Эта косичка с трудом разбивается в равномерную муть.

Диссоциированные штаммы (в R-форме) в первые сутки роста также вызывают легкое помутнение бульона. На поверхности бульона образуется тонкая пленка. В дальнейшем наступает просветление бульона, однако осадок в отличие от посевов штаммов в S-форме носит не слизистый, а крошковидный или хлопьевидный характер.

Зеелигер (1961) справедливо замечает, что интенсивность роста листерий в жидких средах зависит от количества посеянных микробов. Обильный посев дает быстрое появление роста. При посеве небольшого количества микробов рост идет медленно или вообще не наступает. Это обстоятельство следует учитывать при проведении посевов из патологического материала: рекомендуются обильные посевы на искусственные питательные среды, а также предварительное обогащение материала (выдерживание патологического материала в холодильнике при температуре +4 °С в течение 4–8 недель).

На мясопептонном желатине (МПЖ) при посеве уколом культуры листерий дают рост в виде штыка только по ходу укола, не

наблюдается никаких отростков, а также разжижения желатина. Это свойство листерий является очень ценным для дифференциации от возбудителя рожи – *Erysipelothrix rhusiopathiae*, который растет на МПЖ в виде ламповой щетки и, кроме того, разжижает желатин.

Однако, если в желатин добавить глюкозу, то листерии тоже дают нитчатые щеткообразные ответвления.

Следует отметить, что рожистые микробы дают щеткообразный рост как на простом, так и на обогащенном желатине, листерии – только на обогащенном.

На полужидком (0,2 %-ном) мясопептонном агаре при посеве уколом листерии растут в виде сплошного столбика, что является подтверждением их подвижности.

Листерии способны лизировать эритроциты, однако эта способность проявляется не всегда. Наиболее хорошо выражена она у культур листерий в колониях S-формы.

Культуры листерий в колониях R-формы вызывают слабый гемолиз. Гемолизирующая способность выражена по отношению к эритроцитам человека, лошади, крупного рогатого скота, овец и кроликов. Зеелигер (1961) писал, что гемолиз эритроцитов вызывали все свежие культуры, выделенные из патологического материала. П. М. Свинцов (1946) указывал, что гемолизирующая способность у листерий повышается по мере пересевов на питательных средах. Гемолиз на кровяном агаре выражается в виде прозрачной бесцветной зоны вокруг колоний – гемолиз типа β. Разрушение эритроцитов можно наблюдать и при посеве листерии на жидкие кровяные среды. Зеелигер (1961) связывает растворение эритроцитов с образованием листериями гемолизина. Последний может образовываться и на средах, не содержащих кровь. Фильтрат таких сред вызывает лизис эритроцитов.

Нжоку-Оби (1963) изучил образование гемолизина у 112 штаммов листерий и установил, что разные штаммы обладают различной способностью образования гемолизина. Гемолизин образуется при культивировании листерий на жидких и твердых средах. Скорость его образования и количество зависят от

характера среды, температуры и времени инкубации. По своей природе гемолизин представляет собой белок. С помощью электрофореза в нем установлены две фракции: одна напоминает гамма-глобулины, другая близка к альбуминам. Гемолизин имеет выраженные антигенные свойства и не обладает токсичностью.

В работе Дженкинса, Нжоку-Оби и Адамса (1964) описано получение очищенных препаратов гемолизина из вирулентных и невирулентных штаммов листерий. Была установлена белковая природа гемолизина и наличие в его структуре связи S-S, которая является гемолитически неактивной. Под влиянием действия цистина и других восстановителей группа S-S превращается в группу SH, которая является гемолитически активной.

Джирард, Обарра и Бардавил (1963) также получили растворимый гемолизин листерий. Он имел белковую природу, был термостабилен, чувствителен к протеолизу при обработке трипсином, обладал антигенными свойствами. Электрофорез показал близость гемолизина к гамма-глобулиновой фракции.

Фтози и Пиллис (1962) установили, что штаммы листерий регулярно вызывали помутнение агаровой среды, содержащей 5 % яичного желтка, при инкубации в течение шести дней при температуре 37 °С. Способность образовывать значительные помутнения у отдельных штаммов совпадала с их выраженной гемолитической активностью.

Штаммы, вызывающие слабое помутнение, проявляли слабую гемолитическую активность. По мнению авторов, эта реакция связана с действием ферментов листерий.

Характерной особенностью листерий является их способность вызывать почернение среды с эскулином (глюкозид из коры каштана *Aesculus hippocastani*), в то время как возбудитель рожи не изменяет среды (1948).

Урбах и Шабинский (1955) сообщили, что листерии размножаются в куриных эмбрионах, причем хороший рост был отмечен в белке и желтке. И. А. Бакулов (1965) также успешно культивировали листерии на куриных эмбрионах, получая во всех случаях чистую культуру, типичную по своим свойствам.

Подбор селективных сред для листерий

Существуют объективные методические трудности, возникающие у бактериологов при выделении и типировании листериозных бактерий. Ошибки при данной работе вполне возможны. Так, например, М. Gray (1964) указывал, что по заявлению отдела здравоохранения штата Массачусетс (США) только 55 % лабораторий правильно идентифицировали высланную им контрольную листериозную культуру. По данным К. Шлыгиной (1970) из 144 культур, поступивших в ИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи для идентификации, только 39 % являлись листериозными. По сообщению В. М. Котлярова (1973) только 60 % штаммов, присланных во ВНИИВВиМ как листериозные, соответствовало этой бактериальной культуре.

Еще больше трудностей возникает при проведении бактериологического контроля продуктов питания на наличие возбудителя листериозной инфекции. На наш взгляд, эти трудности в значительной степени обусловлены биологическим разнообразием многих фенотипических свойств листерий в зависимости от схем их выделения и использования селективных сред.

Даже самое раннее сообщение о листериозе у кроликов показало трудности и нерегулярные результаты при выделении и типировании *L. monocytogenes*. Многие последующие исследования, направленные на выделение бактерий рода *Listeria* из проб, сильно контаминированных конкурентными микроорганизмами, тоже подчёркивали указанные проблемы (Н. Seeliger 1961, 1986, М. Guay, А. Killinger 1966, Н. Welshimer. 1981).

В одном из первых таких исследований чистых культур и проб от овец и кроликов М. Gray (1950) обнаружил, что лишь минимальная задержка роста *L. monocytogenes* и грамположительных кокков происходит в средах содержащих 0,05 – 0,1 % теллурита калия. Колонии *L. monocytogenes* отличали по черным центрам и характерным сине-зеленым краям при микроскопии по методу Генри. Перенос культур в среды с теллуритом или без содержащего теллурит бульона через 24 часа при 37 °С позволял проводить предполагаемую дифференциацию *L. monocytogenes*

пока относительное количество конкурентных микрококков было низким. Теллурит калия, как селективный агент, впоследствии использовался в других составах сред один или чаще в комбинации с другими ингибиторами (С. Lehnert 1964, М. Khain 1973, Bravenieta 1973). Кроме того, установлено, что некоторые штаммы *L. monocytogenes* могут задерживаться теллуритом, особенно из исходных культур (Н. Seelinger, 1961).

В 1951 году К. Shimizu с сотр. сообщили об использовании 5-нитро-2 фурфуримед-аминогуанидина HCl («гуанофурацин») в конечных концентрациях 1:8000 – 1:15000 как селективного агента для выделения *L. monocytogenes* из проб назальных выделений или феций овец. Пытаясь усовершенствовать селективность и снизить задержку роста *L. monocytogenes*, С. Bride и Girard (1960), описали использование обогащенного бульона, содержащего нитрофуразон («фурацин» конечная концентрация 1:100.000), с последующим посевом на селективную, содержащую кровь среду, состоящую из фенолэтанол-агаровой основы с 0,05 % хлористого лития и 1 % глицина в качестве селективных агентов.

Пробы инкубировали в обогащенном бульоне при 37 °С в течение 18 часов, а затем наносили на селективную среду еще на 24-48 часов при 37 °С. В опытах со смешанными культурами *E. coli*, *P. aeruginosa*, *P. vulgaris*, *St. pyogenes*, последние не росли после инокуляции в обогащенном бульоне и переносе в селективную питательную среду. *L. monocytogenes* росли в виде серых колоний, не обнаруживающих зон гемолиза; *B. subtilis*, *St. faecalis* вырастали в меньшем количестве и отличались от *L. monocytogenes* по биохимическим свойствам. Через 26 лет эту основную среду на обогащенном бульоне с модификациями оригинальной среды (Me. Bride) Мак Брайда-Жирарда включили в стандартный референс-метод в США (J. Lovett 1987).

Несомненно, чаще всего предлагаемым селективным агентом для выделения *L. monocytogenes* была налидиксиновая кислота. В первом сообщении Beerens.et.al. (1966) описывал селективный рост *L. monocytogenes*, стрептококков и *Erysipelothrix* на пи-

тательной среде, содержащей 40 мкг налидиксиновой кислоты на мл. После этого многие другие исследователи использовали налидиксиновую кислоту в разных вариантах селективных питательных сред для *L. monocytogenes*.

Многие из этих сред содержали другие ингибиторы, включая различные неорганические соли, например, хлористый литий, ацетат таллия и трехокись хрома и бихромат калия. Для снижения роста *S. faecalis* Despirres (1971) предложил селективный бульон, содержащий 3мкг/мл полимиксина В и 0,02 мкг/мл метиленового голубого кроме 40 мкг/мл налидиксиновой кислоты. Эта среда была эффективной для выделения *L. monocytogenes* из фекальных проб, взятых от матерей заражённых плодов или заражённых детей. Акридин или акрифлавин и другие краски (включая индиго-кармин, метиленовый голубой, пиронин, тионин) так же часто вводились в селективные среды для *L. monocytogenes*.

После обогащения высоко контаминированных проб в бульоне, содержащем 3 токсические металлические соли, тионин, налидиксиновую кислоту и амфотерицин В. Mavrothalassitis (1977) предложил перенос культуры на дифференцирующий агар, содержащий пиронин и дополнительно краску феназин, галлоцианин. Как упоминал Н. Welshimer (1981), существуют вариации в частоте красящих соединений, используемых в сравнительных исследованиях. В каждом случае следует титровать отдельные партии реагентов, чтобы определить эффективные селективные концентрации, не задерживающие рост *L. monocytogenes*.

Другие неоднородные ингибиторные соединения включают тиогликолат (Е. Kampelmacher, 1969) и тиоцианат (J. Vockemuhl, 1971). Тиогликолат также был введён в «обогачительно-транспортную» среду (J. Vockemuhl, 1974). Одним из самых оригинальных ингредиентов, предложенных для селективной питательной среды был прополис, материал, используемый пчёлами для выстилания стенок сот (Cronstol, 1977). Эта питательная среда содержала также налидиксиновую кислоту, полимиксин В, этакридин и индигокармин и обладала повышенной селективностью для *L. monocytogenes* в смешанных культурах по срав-

нению со средами без прополиса. Более поздние составы сред представляли комбинации налидиксиновой кислоты, полимиксина В и акрифлавина в качестве ингибиторных агентов.

После наблюдения Larson и сотр. (1985), касающихся резистентности штаммов *L.monocytogenes* к моксалоктаму *in vitro*, W. Lee et.al. включили этот антибиотик широкого спектра (20 мкг/мл) в модифицированный агар Мак Брайда-Жиарда. Они специализировались на выделении *L. monocytogenes* из проб говядины и мяса других видов животных, в которых большую проблему представляет обильный рост как грамотрицательных, так и грамположительных бактерий. Они обнаружили, что увеличение в 10 раз концентрации хлористого лития по сравнению с оригинальными формулами (т.е. до 5 мг/л) и замена глицинангидрида (10мг/мл) на глицин проводили к меньшей ингибции роста штаммов *L. monocytogenes*. Интересно, что о значении глицинангидрида впервые упомянули R. Bearns et.al. ещё 1959 г. до публикации своего сообщения в следующем году. R. Bearns et.al. рекомендовали фенилэтаноловую агаровую основу, содержащую 10 мг/мл глицинангидрида, 0,5 мг/мл LiCl, а для контаминированных материалов (фекалии, посва, материалы вскрытия и т.п.) 200 мкг/мл циклогексимида («Актидион»).

Jay (1987) сообщил о питательной среде, названной CPN агаром, обладающей ещё большей селективной способностью. Питательная среда содержит налидиксиновую кислоту, фенилэтанол и I циклогексанидин в качестве ингибиторов и TRIS для получения конечного рН 8,2. Колонии *L.monocytogenes* в чистых или смешанных культурах были крупнее (2 мм вместо 1 мм) на CPN, чем на агарах Мак Брайда.

J. Lovett (1987) тоже обнаружил отличную селективность, используя модифицированную среду Мак Брайда и Жиарда, содержащую циклогексимид, глицинангидрид, 0,5 мг LiCl /мл (первая концентрация), но без крови.

В таблицах 2-4 указаны питательные среды для культивирования листерий и основные селективные агенты, применяемые при их выделении.

Рост на селективных питательных средах

Большое распространение в качестве селективных сред (с добавлением эскулина) для выделения листерий получили Оксфорд и ПАЛКАМ агары. Основа Оксфордской среды для листерий с добавками рекомендуется для быстрого обнаружения и идентификации различных видов листерий. На Оксфорд агаре через 24 часа на зеленоватом фоне вырастают очень мелкие, едва заметные, сероватые колонии, через 48 часов колонии заметно увеличиваются в размере и становятся серыми с черными включениями внутри.

ПАЛКАМ – агар для идентификации листерий, используется для селективного выделения и идентификации листерий. На ПАЛКАМ – агаре через 24 часа вырастают мелкие, едва заметные серовато-зеленые или оливково-зеленые колонии, диаметром 1 мм, часто с черным центром. Колонии окружены характерным черным ореолом на красном фоне агара. Через 48 часов колонии вырастают до 1,5-2,0 мм в диаметре с характерным вогнутым центром, сохраняя окраску и черный ореол вокруг. Посевы инкубируют при 30 °С в течение 48 часов. Рост листерий сопровождается потреблением эскулина и почернением колоний, что позволяет на основании ограниченного числа тестов идентифицировать культуру *L. monocytogenes*.

Для выделения листерий из клинического материала, продуктов питания, большое значение имеет процедура обогащения. На общем микробном фоне количество листерий в исследуемом материале может быть невелико, скорость роста листерий уступает многим условно-патогенным бактериям, поэтому процедура обогащения часто является необходимым условием выделения культуры листерий из исследуемого материала. *Основа бульона Фрезера с селективными добавками* используется как первичная, так и как вторичная среда обогащения для выделения, обогащения, культивирования и подсчета листерий. *Состав бульона Фрезера*: ферментативный гидролизат казеина, пептический перевар животной ткани, мясной экстракт, дрожжевой экстракт, натрия хлорид, калия дигидрофосфат, натрия гидрофосфат, эску-

лин, лития хлорид. Рост листерий на этом бульоне проявляется почернением среды через 24-48 часов при 37 °С. В практике с успехом применяются и другие селективные питательные среды, представленные в таблицах 2-4.

В качестве селективных реагентов для выделения используют сложные химические соединения. Широкое использование при выделении листерий, нашли среды, в состав которых в качестве селективной добавки входит эскулин в сочетании с цитратом железистого аммония. Цвет среды в результате реакции продуктов гидролиза эскулина с цитратом железистого аммония меняется, что приводит к потемнению бульона. Данные селективные реагенты входят в состав сред, которые сейчас наиболее распространены в лабораторной практике: бульон Фрезера, бульон UVM, селективный обогатительный бульон для выделения листерий, рекомендованный стандартом ISO 10560-93.

Помимо сред с эскулином для обогащения используют триптон-соевые бульоны с дрожжевым экстрактом, в качестве селективной добавки для данной среды используют акрифлавин и налидиксовую кислоту. Применение селективных сред значительно повысило эффективность выделения листерий из клинического материала и продуктов питания по сравнению с ранее применявшимися средами.

Усовершенствованные и «быстрые» методы выделения листерий

Разработано множество методов, увеличивающих процент выделения листерий и ускоряющих процесс идентификации.

Несмотря на широкий интерес к условиям, обеспечивающим хороший рост бактерий, и средам, большинство исследователей соглашается, что самым чувствительным методом выделения *L. monocytogenes* из проб, сильно контаминированных конкурентными микроорганизмами, остается некоторая вариация метода холодного обогащения, первоначально предложенного М. Gray и сотр. (1948). Он основан на том, что *L. monocytogenes* не только выживают, но и растут в диапазоне – 1 до + 4 °С. Рекомендовано

Таблица 2. Неселективные питательные среды для выделения *Listeria spp.*

Название среды	Область применения
Питательный агар/ питательный бульон	В качестве основных или специальных сред
Триптон-соевый агар/ триптон-соевый бульон	В качестве основных для культивирования широкого круга микроорганизмов, выделение листерий из биологических жидкостей, предварительное подраживание
Дрожжевой триптон-соевый агар/дрожжевой триптон-соевый бульон	Обнаружение листерий, выделение их из биологических жидкостей, пересев подозрительных колоний для последующей идентификации, освещение по Генри
Основа колумбийского кровяного агара (1 % агаром)	В качестве основы для приготовления кровяного, шоколадного агаров, а также различных селективных и дифференциальных сред
Среда для определения подвижности листерий	Определение подвижности листерий при различных температурах
Основа лецитиназного агара для листерий	Определение лецитиназной активности листерий

периодическое субкультивирование полуселективных и селективных культур в обогащенном бульоне при 4 °С до нескольких месяцев. Считалось, что это единственный культуральный метод успешного получения изолята в случаях, где микроорганизмы вначале были обнаружены под микроскопом. Следует напомнить, что действительные механизмы эффективности холодового обогащения остаются гипотетическими. Вероятно, они включают комбинацию персистентности и роста клеток *L. monocytogenes*, гибель конкурентов и пониженное или понижающее влияние неизвестных «ингибиторов», присутствующих в сложных пробах, таких как зараженная ткань, фекалии или пробы из окружающей среды. Несмотря на свою чувствительность, очевидно, что холодовое обогащение, в общем, непрактично для всех исследований, кроме исследований продолжительного характера.

Как упоминалось ранее, Mc Brain (1986), W.Lee (1989) продемонстрировали положительные результаты по выделению *L. monocytogenes* из разных видов мяса последовательным культивированием в LEB при 30 °С в течение 24 часов с последующим разведением 1:100 в LEB с 25 мкг/мл акрифлавина и, наконец, субкультивированием при 30 °С в модифицированной питательной среде Мак Брайда с максалактамом. Процедура занимает всего 48 часов в обогащенных бульонах, 24 часа на селективной пластине и 24 – 48 часов для подтверждения колоний. Авторы сообщают о выделении *L.monocytogenes* из 70 % проб измельченной говядины, 43 % свиных сосисок и 48 % мяса до-

Таблица 3. Селективные питательные среды для выделения и идентификации *Listeria spp.*

Название среды	Область применения
Бульон Фрезера с селективными добавками	Для выделения и подсчета листерий из пищевых продуктов и кормов для животных
Основа бульона вторичного обогащения для листерий с селективными добавками	Для выделения листерий из пищевых продуктов и объектов окружающей среды, культивирования и обогащения
Хромогенный агар для идентификации листерий с селективными добавками	Для идентификации листерий, для быстрого обнаружения и идентификации листерий различных видов, особенно <i>L. Monocytogenes</i>
Бульон обогащения для листерий, модифицированный	Для селективного обогащения видов <i>Listeria</i>
Среда обогащения для листерий (среда UVM)	Обогащение при выделении из клинического материала
Агар (ПАЛКАМ) с селективными добавками	Для идентификации листерий, селективного выделения и идентификации
Бульон (ПАЛКАМ) с селективными добавками	Для селективного обогащения и идентификации видов <i>Listeria</i>
Основа Оксфордской среды для листерий с селективными добавками	Для выделения <i>Listeria</i> из образцов патологического, клинического материалов и продуктов питания
Основа ALOA агара для листерий	Для быстрого обнаружения и идентификации различных видов листерий.

Таблица 4. Основные селективные реагенты, используемые при выделении листерий.

№№	Название селективного агента
1	Теллурид калия
2	Налидиксовая кислота
3	Хлорид лития
4	Акрифлавин
5	Эскулин
6	Красители (фенилрот)
7	Антибиотики (цефазидим, полимиксин В)
8	Циклогексамид

машных птиц (всего из 62 проб всех типов) в декабре 1986 г. Наличие *L.monocytogenes* в мясе не является новым фактом, но эти высокие цифры положительных проб выдвигают на первый план необходимость в усовершенствованной методологии. Действительное значение такой контаминации для здравоохранения остается неясным. Выдвигать слишком строгие требования, чтобы все продукты были свободны от *L. monocytogenes* определенно не практично. Новые методы, однако, впервые позволяют проводить исследования в более широком масштабе, чтобы определить действительное распространение микроорганизма в разных продуктах и связь, если она имеется, с болезнью.

Doyle, Schoeni (1986, 1987) сравнили холодное обогащение, метод Ловетта (1987) и свой собственный укороченный селек-

тивный метод обогащения для увеличения эффективности выделения *L.monocytogenes* из феций и тканей экспериментально зараженных животных и из сыров. Их селективный метод обогащения включает 24-часовой период роста в триптозном бульоне, содержащем овечью кровь, полимиксин В, акрифлавин и налидиксиновую кислоту. Важно, что образцы выращивали в атмосфере с пониженным содержанием кислорода. Оба исследования показали неточность современных культуральных методов. При исследовании мягкого сыра *L. monocytogenes* выделились не с первого раза примерно у 21 % проб.

Методы подготовки пищевого продукта для бактериологического исследования на листерии и схемы посева на питательные среды

Растительные продукты

А. Первый способ

(Рекомендации D. Ноо et. al., 1987)

Исследуемый растительный продукт режут на кусочки не больше 1 см в длину. Полученные и подготовленные образцы весом не менее 500 г сохраняют при температуре холодильника +4 °...+6 °С в течение всего срока исследования. Образцы продукта исследуют в день приготовления, а также на 9, 25, 39, 64 дни хранения (при отсутствии положительных результатов в ходе предшествующих исследований).

Подготовленный образец весом 100 г соединяют с 200 мл физиологического раствора в полиэтиленовом мешочке и встряхивают в течение 1-2 минут. Далее промывающую жидкость и ее серийно разведенные растворы засевают на плотные селективные питательные среды и культивируют при +30 °С в течение 48 часов.

Б. Второй способ

(Рекомендации L. Benchat et. al., 1987)

Исследуемый растительный продукт делят на порции по 20 г и соединяют со 100 мл питательного бульона в 250 мл колбах. Полученные образцы исследуют в день приготовления, а также

через 14 и 30 дней, сохраняя данную суспензию при температуре +4°...+6 °С.

В начале исследования смесь в колбе встряхивают 2-3 минуты, затем отобранную пробу серийно разводят и засевают на плотные селективные питательные среды.

Молочные продукты

А. Первый способ

(Рекомендации управления пищевой промышленности и медицинских препаратов США «FDA» 1987)

Пробы (если это твердый молочный продукт, например сыр, то пробы, берут с поверхности и изнутри и мелко измельчают) в количестве 25 г помещают в 225 мл жидкой питательной среды, культивируют при +30 °С. Через 24 часа и 7 дней 1 мл среды с бактериями разводят в 9 мл 0,5 % КОН и наносят на плотную питательную среду (например «MLA»). Культивируют при тех же режимах с последующим изучением выросших колоний.

Б. Второй способ. Усовершенствованный метод выделения листерий из сыра

(Рекомендации Yosef Ahmed E. et. al., 1988)

Образцы сыра, взятые из разных мест, гомогенизируют в течение 2 минут в смесителе и смешивают в соотношении 1:10 с 2 %-ным водным раствором цитрата тринатрия при температуре +40 °С и высевают на селективный агар с последующим изучением выросших колоний.

Мясные продукты

А. Первый способ

(Рекомендации «Руководства по ВСЭ и гигиене производства мяса и мясных продуктов», М. 1983)

Берут пробы весом 200-250 г, режут на кусочки, растирают, засевают на плотные или жидкие питательные среды. Культивируют в течение 24-48 часов при +37 °С с последующим изучением выросших колоний.

Б. Второй способ

(Рекомендации «Инструкции по лабораторной диагностике листериоза животных и людей» М. 1987)

Из исследуемых образцов готовят суспензию на физиологическом растворе в соотношении 1:5 и из нее делают посеvy на твердые питательные среды. Рекомендуется часть исследуемого материала, с добавлением в него 15-50 ЕД/мл полимиксина В, поместить в холодильник при +4 °С. При отрицательном результате первичного посева из сохраняемого материала в течение 30 дней через каждые 10 дней проводить дополнительные исследования с ежедневным просмотром в первые 3-4 дня.

В. Третий способ

(Рекомендации МСХ США)

Исследуемый мясной продукт в количестве 25 г измельчают и помещают в 225 мл жидкой питательной среды (рекомендуют «LEB»), встряхивают 2 минуты и инкубируют в течение 24 часов при +30 °С. Полученную бактериальную суспензию разводят 1:10 в 0,5 %-ном КОН и наносят на твердую питательную среду (рекомендуют «LPM») с последующим культивированием в тех же режимах. Как дополнительную операцию рекомендуют 0,1 мл бактериальной суспензии поместить в 10 мл среды «LEB», культивировать 24 часа с последующем высевом на среду «LPM» и дальнейшем изучением выросших колоний.

Г. Четвертый способ

(Рекомендации McClain D., Lee W. 1987)

Исследуемый мясной продукт мелко измельчают, 25 г засевают в 225 мл бульона (рекомендуют «LEB»), инкубируют 24 часа при +30 °С, далее 0.1 мл полученной первичной культуры засевают в 10 мл среды «LEB», содержащей 25 мг акрифлавина и инкубируют 1 день при +30 °С. Затем 1 мл данной вторичной культуры бактерий в среде «LEB» с акрифлавином смешивают с 4,5 мл 0,25 %-ного раствора КОН в 2 % растворе NaCl в течение 1 минуты. Обработанную таким образом вторичную культуру микроорганизмов высевают на агар «LPM». Через 1 день возможно изучение колоний.

Общие схемы исследования пищевого продукта
предложены Федеральным отделом здравоохранения ФРГ
(Fentel R. 1992)

А. Первый способ

25 г (мл) продукта + 225 мл селективной среды
48 ч при +30°C
посев на оксфордский агар или PALCAM-агар
48 ч при + 37°C изучение колонии

Б. Второй способ

10 г (мл) продукта + 90 мл раствора	
Гомогенизация	
Количественное обнаружение	Тест присутствия 10 мл гомогената + 100 мл селективно- го бульона
Десятикратное разведение	48 ч при +30 °C
Перенос 0.1 мл на плотные селективные среды	Посевы на среды PALCAM или ОКСФОРД
48 ч инкубации при 37 °C изучение колоний	

Каждый из указанных методов подготовки пищевых продуктов и проведения бактериологического исследования не лишен недостатков. Часть этих методов, способов и питательных сред дает отличные результаты в некоторых лабораториях, но не во всех. Это можно объяснить различным качеством применяемых компонентов. Некоторая громоздкость рекомендованных схем проведения бактериологического посева обусловлена стремлением получить максимально гарантированный ответ на вопрос о контаминации пищевых продуктов листериями.

Биохимическая активность листерий

Листерии принадлежат к числу сравнительно мало активных в биохимическом отношении бактерий. В литературе существуют мнения о типичности и постоянстве этих свойств (Корнилова А. Л. 1953), но наряду с этим есть высказывания об их вариабильности. Более правильным является в данном случае высказывание Н. Г. Трегубовой (1949), которая пишет, что од-

нотипными биохимическими свойствами обладают, как правило, старые музейные штаммы. В отличие от них биохимические свойства свежевыделенных штаммов листерий отличаются разнообразием.

Листерии способны ферментировать с образованием кислоты при отсутствии газообразования различные углеводы, многоатомные спирты и глюкозиды. Мы проанализировали сообщения различных авторов о биохимических свойствах листерий, и сами провели исследования на нескольких штаммах листерий. Учитывая эти данные, мы считаем, что биохимические свойства листерий являются специфическими и могут служить ценным подспорьем при проведении бактериологического исследования.

Характерными являются следующие биохимические реакции.

Листерии ферментируют с образованием кислоты без газа глюкозу, рамнозу, салицин, левулезу. Изменение среды происходит в первые двое суток.

Листерии не изменяют среду с дульцитам, маннитом, арабинозой, инулином, сорбитом.

На средах с лактозой, сахарозой, глицерином, мальтозой, галактозой, декстрозой наблюдаются непостоянные результаты. Часть штаммов листерии изменяет их в поздние сроки (более трех суток), что обесценивает их применение в дифференциально-диагностических целях; иногда имеет место неполное разложение среды и нечеткие показания.

Листерии не образуют сероводород, хотя, как уже было отмечено, диссоциированные культуры листерий выделяли следы сероводорода. Возбудитель рожи свиней выделяет сероводород, и данный признак может быть использован для дифференциации этих двух сходных по многим признакам бактерий. Однако при этом надо учитывать характер среды, на которой производится выращивание листерий. Л. А. Тимофеева, В. Я. Головачева и Н. З. Трофименко (1962) установили, что 20 испытанных ими штаммов листерий образовали сероводород в первые сутки выращивания в бульоне Хоттингера с глубоким расщеплением

белковой молекулы (60–70 %) и содержанием 150 мг % аминного азота; в мясопептонном бульоне с 0,1 % цистеина сероводород образовывался лишь на пятые сутки и в меньшей интенсивности. Эризипелотрикссы (рожистые микробы), взятые для сравнения, образовывали сероводород на всех средах в первые сутки роста. Листерии не обладают способностью вырабатывать индол, аммиак, не восстанавливают нитраты в нитриты, редуцируют метиленовую синьку, не гидролизуют мочевины.

Отдельные авторы (П. М. Свинцов, 1946) пишут, что листерии не образуют ацетилметилкарбинола (ацетоина). Зеелигер (1961), однако, устанавливал у листерии резко выраженную реакцию Фогес-Проакауэра (образование ацетоина) в том случае, когда исследования проводились более чувствительными методами. А. А. Триполитова (1949) использовала для этой цели метод Баррита (к 1 мл суточной бульонной культуры добавляется 0,6 мл 5 %-ного спиртового раствора альфафтола и 0,2 мл 40 %-ного раствора едкого натрия) и обнаружила образование ацетилметилкарбинола всеми взятыми в опыт штаммами листерий. По ее данным, при исследовании листерий не удалось выявить гиалуронидазу, плазмокоагулазу, фибринолизин. В. В. Сливко (1954) установил выделение листериями гиалуронидазы, однако различные изучаемые штаммы вели себя различно.

Постоянным признаком листерий является их способность выделять фермент каталазу. Добавление перекиси водорода к культуре листерий вызывает появление пузырьков газа: перекись водорода под действием каталазы разлагается на воду и свободный кислород. Возбудитель рожи – *Erysipelothrix rhusiopathiae* не выделяет фермент каталазу и не разлагает перекись водорода.

3.1.2. ПРОТЕЙ – *PROTEUS VULGARIS* И *PROTEUS MIRABILIS*

(Материал подготовлен по результатам исследовательской работы Н. А. Феоктистовой, Д. А. Васильева)

Характеристика бактерий рода *Proteus*

Впервые бактерии этого рода (*P. mirabilis*) выделил из гниющего мяса немецкий ученый G. Hauser в 1885 году. Способность бактерий менять внешнее проявление роста на агаровых пластинчатых средах послужила основанием для наименования *Proteus* (в честь сына Посейдона – водяного божества Протея, способного менять свой облик). В 1953 году в соответствии с решением Подкомитета кишечных бактерий Номенклатурного комитета Международной ассоциации микробиологов род *Proteus* включал 4 вида: *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. morganii*, *P. rettgeri*, отличия между которыми основывались на биохимических (ферментативных) признаках. Такой же классификации придерживался F. Kauffmann (1959), но уже спустя несколько лет он предложил новую классификацию бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, принятую в 1963 году. В соответствии с этой классификацией F. Kauffmann (1963) род *Proteus* включал лишь два вида – *P. vulgaris* и *P. mirabilis*, а другие виды протей были выделены в самостоятельные роды – *Morganella*, *Rettgerella* и *Providencia*. Его классификация имела расхождение с «Определителем бактерий Берджи», изданного в 1974 году, в котором протей насчитывал 5 видов: *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. morganii*, *P. rettgeri*, *P. inconstans*. Следует отметить, что в то время существовала и другая классификация указанных бактерий, разработанная американскими исследователями P. R. Edwards и W. H. Ewing (1972), по которой в трибу *Proteae* входили 2 рода – *Proteus* и *Providencia*. Род *Proteus*, как и в «Определителе бактерий Берджи» 1974 года, включал те же виды протей, за исключением *P. inconstans*, который был выделен в отдельный род *Providencia* с двумя видами *P. alcalifaciens* и *P. stuartii* (Золотухин, Каврук, Васильев, 2005).

В настоящее время все эти своеобразные бактерии составляют предмет дискуссий микробиологов по поводу их таксономического положения, причем некоторые из них считают протеев лишь отдаленно связанными с семейством *Enterobacteriaceae* (Hantula, Korhonen, Bamford, 1990; Блохина и др., 1992). Авторы обосновывают отдаленность рода *Proteus* на базе данных о строении генома. Известно, что семейство *Enterobacteriaceae* содержит в своем составе бактерии с вариациями содержания ГЦ – пар в ДНК от 38 до 60 %. Бактерии родов *Proteus* и *Providencia* значительно отличаются по составу ДНК от других родов семейства (на 10-20 %), что и послужило в свое время поводом для предложений по выделению этих родов в самостоятельное семейство *Proteaceae*.

Классификация рода по «Определителю бактерий Берджи» (1994) предусматривает разделение рода *Proteus* на четыре вида: *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Proteus mixofaciens* и *Proteus penneri*.

Представители рода *Proteus*, как и другие энтеробактерии, имеют форму прямых грамотрицательных палочек длиной 1-3 мкм, шириной 0,4-0,8 мкм, подвижны, спор и капсул не образуют.

Протеям в большей мере присуще проявление полиморфизма: обнаружение при микроскопии мазков кокковидных, нитевидных и неправильных очертаний инволюционных форм, при некоторых условиях возможно образование сферопластов (Сидоров, Скородумов, Федотов, 1995).

Протеи – это факультативные анаэробы. Они хорошо растут на обычных питательных средах с образованием гнилостного запаха в диапазоне температур 10-43 °С (оптимальная – 35-37 °С), оптимум pH – 7,2-7,4. На плотных питательных средах характерной особенностью для большинства штаммов протеев является способность к «роению» (ползущий рост), которая выражается в образовании на поверхности среды вуалевого налета (особенно выраженного на агаре меньшей плотности при температуре 20-22 °С) (Бакулов, Смирнов, Васильев, 2003). Gygi,

Rahman, Lai et al. (1995) установили, что участвуя в феномене «роения», вегетативные клетки превращаются в удлиненные, с огромным числом жгутиков, и популяционно-зависимым способом проникают через поверхность выстилающего эпителия.

Gram, Rocky, Ria (1996) установили, что при добавлении в среду грубого экстракта красной австралийской водоросли *Delisea pulchra* этот феномен «роения» угнетается. Среди компонентов водоросли наиболее активным ингибирующим действием обладает галогенизированный фуранон. Также феномен «роения» угнетается также при добавлении к питательным средам сухого новокаина и желтка куриного яйца (Леонтьева, 1991).

Внесение в среду ингибиторов (соли желчных кислот, высокие концентрации NaCl, мочевины) обуславливает рост в неподвижной О-форме. Подвижность бактерий используют для выделения чистой культуры посевом в конденсационную воду скошенного агара по Шукевичу. Колонии протеев в О-форме округлые, полупрозрачные и выпуклые. Н-формы дают сплошной рост. Пигментов не образуют (Бакулов, Смирнов, Васильев, 2003).

На среде Плоскирева протей образует крупные (4-8 мм) полупрозрачные колонии с перламутровым оттенком, среда в зоне роста колоний подщелачивается и приобретает желтизну. На висмут-сульфит агаре через 24-48 часов культивирования колоний протей имеют темно-коричневый цвет.

Иногда встречаются нероящиеся штаммы, образующие на плотных питательных средах мелкие и средние по размеру, круглые колонии S-формы сероватого цвета.

В МПБ бактерии рода *Proteus* вызывают равномерное интенсивное помутнение среды с наличием осадка, который при встряхивании пробирки легко разбивается (Золотухин, 2004).

Характерной для видов *P. vulgaris* и *P. mirabilis* является способность образовывать уреазу, сероводород, редуцировать нитраты, разжижать МПЖ, расти в присутствии цианида калия, ферментировать глюкозу с образованием кислоты и газа, давать положительную реакцию с метилротом, не декарбоксилировать

оргинин, дезаминировать фенилаланин, не ферментировать лактозу и маннит (таблица 5).

Виды *P. vulgaris* и *P. mirabilis* являются наиболее изученными, часто выделяются из объектов внешней среды, от людей и животных, а патогенные их варианты имеют эпизоотическое и эпидемиологическое значение. *P. myxofaciens* - малоизученный вид, по мнению многих ученых считалось, что он выделяется только от насекомых (личинок моли) (Сидоров, Скородумов, Федотов, 1995), но в последнее время появились сообщения о выделении представителей названного вида из патологического материала и объектов окружающей среды при массовых желудочно-кишечных заболеваниях поросят-сосунов и новорожденных телят (Бритова, Каврук, 1988; Каврук, 1986;1994; Золотухин, 2004). Поэтому в ветеринарии рассматриваются только три вида бактерий рода *Proteus* как возбудители эпизоотий.

Антигенная структура бактерий рода *Proteus* формируется из соматических О-антигенов и жгутиковых Н-антигенов, в некоторых случаях обнаруживали и капсульные К-антигены. О-антигены термостабильны, представляют собой липополисахаридно-белковые комплексы; Н-антигены термолабильны, имеют белковую природу (Золотухин, 2004).

Таблица 5. Дифференциальные признаки бактерий рода *Proteus* по ферментативным свойствам («Методические указания...», 1999).

Тест	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus myxofaciens</i>
Глюкоза	+	+	+
Сахароза	+	±	+
Мальтоза	+	-	+
Рост на агаре Симонса	±	+	±
Образование индола	+	-	-
Образование сероводорода	+	+	-
Расщепление мочевины	+	+	+
Разжижение желатины	+	+	+
Дезаминирование фенилаланина	+	+	+
Тесты дополнительные			
Реакции с метилротом	+	+	+
Реакция Фогеса-Проскауэра	-	±	+
Подвижность	+	+	+

Примечания:

«+» - ферментация сахара, образование индола, расщепление мочевины;

«-» – отсутствие ферментации сахара и т.п.;

«±» – различные показатели.

Антигенно-диагностическая схема для видов *P. vulgaris* и *P. mirabilis* представлена 49 соматическими О-группами и 19 Н-антигенами. Также установлено, что как О-, так и Н-антигены могут иметь мозаичное строение (Золотухин, 2004).

Для серологической идентификации определяют структуру О-, Н- антигенов, обозначаемых арабскими цифрами. В настоящее время антигенная формула включает в себя более 49 О-антигенов и 19 Н-антигенов, всего 110 сероваров. В отличие от бактерий кишечной палочки, бактерии протей нельзя разделить на болезнетворные и неболезнетворные штаммы по показаниям антигенной формулы. Хотя отмечено, что при кишечных заболеваниях людей наиболее часто выделяют палочки протей определенной серологической группы по О-антигену (Бакулов, Смирнов, Васильев, 2003).

Определение серогрупповой принадлежности бактерий рода *Proteus* в ветеринарных бактериологических лабораториях страны в настоящее время не проводится, что является причиной отсутствия статистических данных о выделении из патологического материала от больных и павших животных патогенных штаммов протей, принадлежавших к определенным серологическим группам. О серогрупповой принадлежности патогенных штаммов протей, выделенных от животных, сообщается в работах отдельных авторов (Парайко, Парайко, 1990), поэтому требуется дальнейшее накопление фактического материала по данному вопросу.

Бактерии рода *Proteus* в значительном количестве были выделены группой итальянских ученых S. Delia et al. (1989) из 150 образцов говядины, 150 образцов поверхностных соскобов с костей бычьих скелетов, 20 образцов мелкокускового мяса и 164 образцов колбас.

С. Ramos, М. Cruz, М. Frada (1991) исследовали сточные воды и пленки, выстилающие трубы. Полученные результаты указывают на преобладание бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, в частности родов: *E. coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Shigella* (по нисходящей).

При бактериологическом исследовании биопленки, образующейся на пузырьных катетерах, в видовом составе микроорганизмов, ее составляющих, преобладали *E coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca* (Canderton et al., 1991).

Ven V. Deutrich, Gudrun Pioch (1991) при исследовании хранящегося в естественных условиях в течении 20 лет навоза крупного рогатого скота серологическими методами идентифицировали следующие группы микроорганизмов: *E coli*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Enterobacter* (по нисходящей).

Бактерии рода *Proteus* экзогенным путем контаминируют яйца птиц через поры скорлупы при содержании микробов на ее поверхности или в окружающей среде. При температуре 20 °С и относительной влажности воздуха 80-85 % бактерии рода *Proteus* проникают с поверхности скорлупы внутрь яйца на 2-5 сутки. Далее при размножении протеев возникает порча яиц под названием «черная гниль» (Panda, Sharma, 1996; Золотухин, Васильев, 2002).

При исследовании молока, сыров, жира, замороженных цыплят и колбасы, а также из приготовленной из них пищи, было выделено 54 штаммов *P. mirabilis* (37,0 %), *M. morganii* (25,9 %) и *P. vulgaris* (18,5 %) (Urbanova, Manova, Pacova, 2000).

Бактерии группы протей широко распространены в природе, участвуют в процессах аэробного гниения и служат показателем присутствия органических веществ животного происхождения в воде водоемов. Их нередко обнаруживают в различных пищевых продуктах, что в лучшем случае свидетельствует о гнилостном распаде и порче их. При массовом обсеменении употребленного в пищу продукта протей могут вызывать пищевую токсикоинфекцию (Золотухин, Васильев, 2002). Представители рода типичны среди бактерий, присутствующих в кишечном тракте людей и животных. Они могут быть выделены из разных овощей и мясных нарезок, особенно тех, которые подвергаются порче при температурах диапазона мезофилов.

Патогенность протеев

Патологическое значение имеют все представители рода *Proteus*: *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. penneri* и *P. myxofaciens*, при этом наиболее частым возбудителем нозомикальных инфекций у человека является *P. mirabilis*. В частности - инфекций мочевых путей, респираторного тракта, остеомиелита, менингита. Существует прямая корреляция между гемолизирующей активностью и инвазивностью штаммов протей.

Патогенность протеев обусловлена факторами вирулентности. Имеются научные данные о наличии у патогенных штаммов протеев энтеротоксигенности, адгезивности, инвазивности, гемагглютинирующей, липазной, гемолитической активности (Габидуллин, Суфияров, 1991).

A. Gomez, F. Baquero, C. Nombela (1991) называют одним из факторов вирулентности и патогенности возможность кооперации штаммов протей с другими возбудителями (золотистый стафилококк), наличие полирезистентности. Исследования В. И. Кузнецова, В. И. Семененко, Л. П. Бахарева (1991) подтверждают вышесказанное. В Иркутске в 1984-1988 гг. они проводили изучение частоты инфекций, вызванных бактериями семейства энтеробактерий, в общей группе острых кишечных заболеваний, которая составила 37 %. Наиболее частыми возбудителями условно-патогенных энтеритов являются золотистый стафилококк и энтеробактерии родов: *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*.

Важным фактором вирулентности является способность вырабатывать протейми эндо- и экзотоксины. Эндотоксин не обладает специфическим действием и при парентеральном введении поражает нервную систему и толстый отдел кишечника (Покровский, 1985). Кроме эндотоксина, протей могут вырабатывать термолабильный экзотоксин, в частности энтеротоксин (Мнацканов, 1983). Автор отмечает наличие сочетания способности продуцировать энтеротоксин с синтезом антигенов адгезии у бактерий рода *Proteus*, выделенных от больных диареей телят, поросят и детей.

Начало изучению адгезинов у протеев положила работа I. N. Coetzee (1967). Автор констатировал наличие у бактерий рода *Proteus* отличающихся от жгутиков длинных тонких нитевидных образований. В настоящее время у протеев известно несколько групп (типов) фимбрий. Фимбрии первой группы (общего типа) вызывают РА эритроцитов, подавляемую D-маннозой. Эта реакция является типичной для большинства бактерий кишечной группы. Две другие группы фибрий, гемагглютинирующая активность которых не подавляется D-маннозой, получили название маннозорезистентных фимбрий MR/P- и MR/K-типы. MR/P-гемагглютинины, как правило, вызывают агглютинацию свежих эритроцитов животных. Их синтез идет при 20-30 °С в жидкой питательной среде.

MR/K-гемагглютинины вызывают гемагглютинацию эритроцитов разных видов животных и человека, обработанных танином. Они встречаются чаще всего у штаммов клебсиелл и протеев (Old, Adegbola, 1982).

З. Г. Габидуллин и И. Б. Ишкильдан (1989) изучали адгезины 100 клинических штаммов, из которых 86 относились к *P. mirabilis* и 14 – *P. vulgaris*. При электронной микроскопии установлено, что гемагглютинирующие бактерии хорошо пилированы и в большом числе плотно прилипают к эритроцитам цыпленка. Клетками-мишенями для протеев являются эритроциты цыпленка, с помощью которых были тестированы 31,1 % культур. Авторы считают, что D-маннозорезистентная РГА с эритроцитами цыпленка является наиболее чувствительным тестом для определения адгезивной активности бактерий рода *Proteus*.

Наряду с указанными факторами большинство патогенных штаммов протеев вырабатывают ферменты, которые могут усилить их вирулентность. Это, например, способность к образованию уреазы, когда бактерий, попадая в мочевыводящие пути, разлагают мочевины, а образующийся при этом хлорид аммония вызывает местное воспаление и изменяет рН до значений, способствующих образованию кристаллов, камней и застою мочи в почках и мочевыводящих путях (Jones et al., 1990; Покровский,

Поздеев, 1999). Протеазы, образуемые протеями, нарушают структуру различных подклассов Ig и IgG, повышают проницаемость сосудов и дезаминируют аминокислоты. Гемолизины выявлены и описаны у видов *P. vulgaris*, *P. mirabilis* и *P. penneri*. Они способны лизировать эритроцитов барана, кролика, лошади и человека. Лизис эритроцитов на кровяном агаре присходит при культивировании посевов в течение 48 часов при 37 °С, более быстро (от 5 минут до 3 часов) гемолитическая активность проявляется в питательном бульоне.

Бактерии рода *Proteus* выделяют гемолизины первого и второго типов. Гемолизины первого типа выявлены у изолятов *P. vulgaris* и *P. mirabilis*. Они образуются в начальный и средний период логарифмической фазы роста и проявляют цитотоксическое действие на эпителий мочевого пузыря, моноциты и культуру клеток vero in vitro. У данного типа гемолизинов протеев выявлена гомология нуклеотидных последовательностей с гемолизином *Serratia marcescens*.

Образование Са-зависимых гемолизинов (второго порядка) выявлено у большинства изолятов *P. penneri* и у небольшого количества *P. vulgaris* и детерминировано плазмидами (Покровский, Поздеев, 1999). Указанные гемолизины разрушают эритроциты, нейтрофилы и фибробласты. Механизм физиологической активности связан с образованием пор и каналов в липидном слое и аналогичен действию α -гемолизина *E. coli* (Lukomski, Muller, Schmidt, 1990).

При исследовании взаимодействия *P. mirabilis* с энтероцитами мышей in vivo в первые часы контакта установлено, что штаммы *P. mirabilis* способны повреждать мембрану апикального полюса энтероцитов в пределах репаративной компенсации. Повреждающий фактор связан с термолабильной высокомолекулярной фракцией культуральной жидкости бактерий. Сопутствующее ослабление защитных барьеров слизистой оболочки позволяет бактериям проникнуть во внутреннюю среду макроорганизма через дефекты эпителия (Ковальчук, Пархоменко, 1991).

Внутрибольничные инфекции, обусловленные *P. mirabilis* и *P. vulgaris* (реже – другими представителями *spp. Proteus*), с высокой частотой регистрируются в хирургических отделениях у больных после тяжелых вмешательств, при патологии респираторного тракта, сердечно-сосудистых заболеваниях и, с наибольшей частотой, как осложнение катеризации при урогенитальных манипуляциях, известны также протейные менингоэнцефалиты новорожденных, как осложнение пупочной инфекции с высокой летальностью (Gomez, Baguero, Nombela, 1991).

Cengiz A. Tevfik et al. (1991) изучал бактериальную флору носоглотки у лиц страдающих частыми ОРЗ. Частота выделения *Staphylococcus aureus* составила – 12 %, *Streptococcus haemolyticus* – 7 %, *Proteus* – 1 %.

И. С. Молочаева (1991) изучала этиологическую роль отдельных микроорганизмов в развитии острых кишечных инфекций у 266 детей в возрасте от рождения до 4 лет, госпитализированных в инфекционную клинику с диагнозами: гастроэнтерит, гастрит, энтерит, энтероколит, пищевая токсикоинфекция. Путем комплексного лабораторного исследования было установлено, что в 11,3 % случаев возбудителями были бактерии рода *Proteus*.

Martin C. McHenry et al. (1991) изучал поражения аорты, которые развивались на фоне наличия микотических и инфекционных аневризм, а также псевдоаневризм. Среди возбудителей описываемых заболеваний были выделены грамотрицательные бактерии, в число которых входили и бактерии рода *Proteus*.

G. Sekaninova (1995) выделила от 32 больных хроническими урологическими инфекционными заболеваниями 95 штаммов *P. mirabilis*. При определении типов протоцинов этих штаммов показано, что большинство штаммов относятся к эндемичным типа P/S: P5/S6, S7, S9 или P5/S0 и P1/S2, S11. Примерно 50 % больных выделяют с мочой эти штаммы в течение нескольких месяцев, 1/3 – от 1 года до 7 лет. У большинства из этих больных обнаружены камни в почках или мочеточниках, а у некоторых – гипертрофия предстательной железы.

Аль-Санори Тарек Мохаммад (1996) приводит данные о частоте выделения микроорганизмов различных таксономических групп при трихомонадных уретритах у мужчин. Микробы-ассоциаты принадлежали к видам *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Klebstella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Moraxella lacunata*, *Acinetobacter calcoaceticus*, а также дрожжам *spp. Candida*. Изолированные культуры условно патогенной микрофлоры в большинстве случаев обладали патогенными свойствами.

При обследовании больных хроническим остеомиелитом, лечившихся методом чрескостного остеосинтеза по Илизарову с 1983 по 1993 год, были выделены бактерии, вызывающие патогенные явления, среди которых 950 штаммов протей. Был сделан вывод, что протей является одним из частых симбионтов – возбудителей хронического остеомиелита, занимает второе место в микробном пейзаже раневого отделяемого, встречается в настоящее время в основном в «роящейся» форме, имеет высокую резистентность к антибиотикам (Аранович, Ключин, Розова, 1997; Розова, Аранович, Ключин, 1997). В. И. Халитова с соавт. (1991) наблюдала 104 ребенка с острой кишечной дисфункцией протейной этиологии, которая в большинстве случаев (65,3 %) протекала в средне-тяжелой и тяжелой формах. Однако им не удалось определить какие-либо клинические диагностические признаки протеоза. С. Б. Хецкель, Б. М. Ариэль (1997), обобщая данные комплексного паталогоанатомического исследования с применением микробиологических и серологических исследований, проведенного у 40 умерших детей раннего возраста, страдавших болезнью Дауна, указывают, что пневмонии были причиной смерти во всех случаях. У 1/3 течение было острым, у 2/3 – подострым и хроническим (длительность до 6 месяцев). Преобладали двусторонние (95 %) очаговые поражения с белково-лейкоцитарным экссудатом в альвеолах. В посевах обнаружены *Klebsiella* (28 %), *E. coli* (25 %), *Staphylococcus* (23 %), *Proteus* (10 %), что характерно для нозокомиальной инфекции.

В последние десятилетия накопилось много экспериментальных данных о патогенности протеев для животных. Указанные микроорганизмы выделяют при маститах, эндометритах, раневых инфекциях и других воспалительных процессах у различных видов животных. Особое внимание заслуживают работы по изучению этиологической роли протей в возникновении желудочно-кишечных заболеваний новорожденных животных (Каврук, 1986; 1994; Бритова, Каврук, 1988; Парайко, Парайко, 1990; Мищенко В. А., 1999; Золотухин, 2004; Золотухин, Каврук, Васильев, 2005). Е. Т. Парайко, И. Н. Парайко (1990) удалось экспериментально воспроизвести протейную инфекцию у поросят-сосунов, причем клинические признаки болезни были более выражены у тех животных, заражение которых проводили смесью патогенных штаммов протей с патогенными культурами эшерихий, по сравнению с животными, которых заражали монокультурами.

Е. I. Udochukwu, K. U. Anukam (1988) исследовали пробы фекалий западноафриканских коз, страдающих диареей. В течение года из 35 проб выделили 37 штаммов кишечных бактерий, из которых 19 % приходилось на бактерии рода *Proteus*.

Идентификация бактерий рода *Proteus*

Идентификация бактерии рода *Proteus* – самая простая во всем семействе *Enterobacteriaceae*. Их легко распознают по способности давать феномен «роения» (85-100 % изолятов *P. mirabilis* и 35 % изолятов *P. penneri*) на плотных питательных средах (образование концентрических колец роста по периферии центральной колонии) (Покровский, 1985).

Исследование патологического материала проводят в соответствии с действующими «Методическими указаниями по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утвержденными Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства и Продовольствия РФ 11 октября 1999 года. Общий срок бактериологического исследования до 7 суток.

Е. П. Сиволодским, Л. М. Герасименко, А. А. Копейка (1992) была разработана и испытана питательная среда «Proteus-PPM» для одноэтапного выделения и идентификации бактерий рода *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*. Основой действия среды является выделение фермента триптофандезаминазы бактерий, специфичной для протей, морганелл и провиденций. Культуры этих бактерий образуют зоны темно-коричневой окраски среды вокруг колоний указанных микроорганизмов. Для дальнейшей идентификации выделенных культур авторы предлагают пересевать их на среды с мочевиной и Д-маннозой. Бактерии, ферментирующие мочевины и маннозу, относят к роду *Morganella*, ферментирующие только маннозу – к роду *Providencia* и не ферментирующие маннозу, но разлагающие мочевины – к роду *Proteus*. Было исследовано 953 образца мочи и раневого отделяемого. Испытание среды, как указывают авторы, показали, что она обладает высокой чувствительностью, имеет 100 % специфичность и позволяет значительно ускорить идентификацию бактерий.

В 1975 году была разработана среда для накопления протеев, известная как «Среда Калина П-1». В основе среды соли желчных кислот по Олькеницкому, которые ингибируют рост всех видов бактерий, кроме протеев (Сидоров, Скородумов, Федотов, 1995).

З. Г. Габидуллин и Р. З. Суфиярова (1991) предложили использовать метод молекулярного зондирования ELT-генов и тест-систему ИФА для выявления штаммов протеев, продуцирующих холероподобный энтеротоксин. Проведенные опыты по гибридизации колоний 16 штаммов *P. vulgaris* и 109 штаммов *P. mirabilis* позволили с помощью молекулярного зонда выявить наличие детерминант, кодирующих синтез холероподобного токсина у 41 культуры (33,3 %). При использовании ИФА для обнаружения LT-энтеротоксигенных культур из 125 штаммов выявлена токсиноположительная реакция у 27 штаммов (21,6 %). Авторы указывают, что полученные ими результаты свидетельствуют о принципиальной возможности обнаружения энтеротоксинпро-

дуцирующих штаммов протеев с помощью метода генного зондирования и ИФА, что дает возможность быстрого выявления клинических штаммов протеев, продуцирующих LT-энтеротоксин и значительно повышает эффективность лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых бактериями рода.

В. С. Балаклеец, Т. С. Неломинская (1991) предлагают для родовой идентификации протеев использовать разработанную ими среду «Двуслойную питательную среду для идентификации энтеробактерий: А.с. 163331090 СССР, МКИ С 12 Q 1/04, С 12 1/20». В состав вещества нижнего слоя входят: ЭКД, пептон, глюкоза, тиосульфат натрия, агар, обезвоженный динатрийфосфат, феноловы красный, бриллиантовый зеленый, 50 % раствор мочевины. В состав верхнего слоя входят: ЭКД, лактоза, агар, обезвоженный динатрийфосфат, соль Мора, феноловый красный, алкинбензолсульфата натрия. При росте протей вся среда окрашивается в малиновый цвет.

Т. Карпо et al. (1992) предлагают для дифференциации клинических штаммов *P. mirabilis* и *P. vulgaris* использовать в качестве пулов показатели профилей белков наружной мембраны и многолокусного ферментного электрофоретического анализа. С помощью SDS–мочевина ПААГ выявляются профили наружной мембраны, характерные для протеев. Далее проводился многолокусный ферментный электрофоретический анализ. Результаты исследований соответствуют результатам биохимической классификации протеев указанных видов.

С. Н. Золотухин (1994) предлагает для первичной идентификации использовать трехсахарную комбинированную среду. С помощью этой среды можно на первом этапе идентификации выявить микроорганизмы родов *Proteus*, *Morganella*, *Retgerella*, *Providencia*, *Edwarsiella* и отличить их от других родов энтеробактерий. У культур, которые в пробирке с засеянной питательной средой через 18-24 часа инкубации при 37 °С вызывали пожелтение столбика и сохранение красного цвета на поверхности скола (ферментация глюкозы и отсутствие ферментации лактозы, сахарозы и маннита), отсутствие почернения среды (отри-

цательный тест на выделение сероводорода) и покраснение индикаторной бумаги (положительный тест на выделение индола) изучают другие свойства по тестам, изложенным в «Методических указаниях по бактериологической диагностике смешанной кишечной инфекции молодняка животных, вызываемой патогенными энтеробактериями», утвержденных Департаментом ветеринарии Министерства сельского хозяйства и Продовольствия РФ 11 октября 1999 года.

F. Navarro et al. (1996) исследовали возможность использования хромогенной твердой среды CPS ID2 (bio Merieux) с целью индикации и идентификации ряда кишечных бактерий в моче больных. Состав среды позволяет выявлять активность 3 ферментов (b-глюкуронидазы, b-глюкозидазы и дезаминазы) и продукцию индола. На основании полученных результатов можно было идентифицировать *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* и *Enterococcus*. Чувствительность и специфичность метода составляет соответственно 94 и 100 % – для *E. coli*, 92 и 100 % – для *P. mirabilis*, 97 и 99 % – для *Enterococcus*.

Устойчивость

Бактерии рода *Proteus* выдерживают нагревание 65 °C в течение 30 минут, при 70 °C они инактивируются (в водных растворах), также есть данные, что штаммы протей выдерживают первоначальные режимы пастеризации молока. При кипячении погибают моментально. Замораживание слабо влияет на их жизнеспособность. При хранении мяса в режиме 13 °C эти микробы выделяются из него в течение 6 месяцев. Бактерии достаточно устойчивы к высоким концентрациям поваренной соли. Гибель клеток микроорганизмов наступает лишь при повышении концентрации в растворе хлорида натрия до 17 % и более. Данный микроорганизм очень устойчив и к кислотному воздействию, сохраняя свои жизненные функции в диапазоне pH 3,5-12,0. Поэтому, попадая на мясо от здорового животного, где величина pH в пределах 5,8-6,2, палочка протей, в отличие от других болезнетворных микроорганизмов, может размножаться. Даже такой метод хранения пищевого продукта, как маринование, то есть

понижение кислотности до величин 4,5-5,0, не убивает эту бактерию (Бакулов, Смирнов, Васильев, 2003).

Результаты микробиологических исследований, проведенных на говядине, показали, что ингибирующий эффект высокого давления на развитие бактерий отмечается уже при давлении 100 МПа, за исключением бактерий группы кишечных палочек. Обработка давлением в пределах 300-900 МПа позволяет обезвредить мясо от *E. coli*, бактерий группы *Proteus* (Рогов с соавт., 1996).

Протеи чувствительны к растворам хлорной извести, формалина, фенола, гидроокиси натрия (Золотухин, 2004).

И. Г. Швиденко (1986) изучала чувствительность патогенных штаммов протей к 10 антибиотикам (ампициллину, цефалоридину, карбициллину, мономицину, стрептомицину, канамицину, гентамицину, доксициклину, новобицину). Устойчивыми к одному препарату были 14,1 % культур, к 2-4 препаратам – 56 %, к 5-7 препаратам – 17,7 % и ко всем 10 изучаемым препаратам были устойчивы 8,3 % штаммов протей.

С. Н. Золотухин (2004) изучал чувствительность патогенных штаммов видов *P. vulgaris* и *P. mirabilis*, выделенных им в одном из хозяйств от больных диареей поросят-сосунов, к 10 антибиотикам (пенициллину, стрептомицину, гентамицину, эритромицину, левомицетину, оксациллину, линкомицину, ампициллину, полимексину, тетрациклину). Результаты показали, что все культуры устойчивы к воздействию большинства антибиотиков. Лишь ампициллин и гентамицин ингибировали рост штаммов *P. vulgaris*, а *P. mirabilis* – только гентамицин. Штаммы *P. vulgaris*, выделенные от больных телят в период массовых желудочно-кишечных заболеваний новорожденных животных в другом хозяйстве он изучал на чувствительность к пенициллину, ампициллину, стрептомицину, фуросемиду, левомицетину, неоветину, полимексину, канамицину, гентамицину, эритромицину, оксациллину. Результаты исследований показали, что штаммы протей были чувствительны лишь к трем из них: стрептомицину, канамицину гентамицину.

3.1.3. ИЕРСИНИИ И КИШЕЧНЫЙ ИЕРСИНИОЗ. БАКТЕРИИ - *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

(Материал подготовлен по результатам исследовательской работы Б. М. Коритняк, Д. А. Васильева)

За последние 50 лет отмечено расширение круга микроорганизмов, которые обуславливают пищевые отравления. Наряду с известными, хорошо изученными болезнями появляются «новые», вызываемые микроорганизмами, расцениваемыми ранее как условно патогенные. К числу таких болезней относится кишечный иерсиниоз людей и животных, возбудителем которого является бактерия *Yersinia enterocolitica*. Очень долгое время эти микроорганизмы относили к роду *Pasteurella* семейства *Brucellaceae*. Но в 1944 году J. V. Loghem внес предложение о выделении их в самостоятельный род *Yersinia*, так как они по многим признакам, а прежде всего по нуклеотидному составу ДНК, отличались от собственно пастерелл. Само понятие этого рода было дано в честь известного французского бактериолога А. Иерсена (A. Yersen), который в 1894 году, во время эпидемии в Гонг-Конге открыл возбудителя чумы – *Yersinia pestis*. Сразу же после выделения в самостоятельный род *E. Tral* предложил включить род *Yersinia* в семейство *Enterobacteriaceae*. Позднее был открыт возбудитель кишечного иерсиниоза – *Yersinia enterocolitica*, который также вошел в этот род.

Впоследствии благодаря таксономическим исследованиям D. J. Brenner et.al. (1980) и H. Bercovier et.al. (1980) была проведена переоценка спектра видов, составляющих род *Yersinia*. В результате те границы рода были значительно расширены за счет включения в него иерсиний новых видов: *Y. enterocolitica sensu stricto*, *Y. frederiksenii*, *Y. kristensenii*, *Y. X1*, *Y. X2* или *Y. aldovae*. Однако в 9-м издании Определителя бактерий (Bergey's manual of sistematic bacteriology, 1984) предложения авторов полностью не учтены. Согласно этому изданию род *Yersinia* насчитывает 7 видов: *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*,

Y.frederiksenii, *Y.kristensenii* и *Y.ruckeri*. В 1988 году G. Wauters выделил два новых вида иерсиний – *Y.mollaretii* и *Y.berco vieri* (1988).

Распространение иерсиниоза

Первые сведения о возбудителе кишечного иерсиниоза получены в США, где с 1923 по 1957 год было выявлено от людей около 15 штаммов бактерий, но в то время они были отнесены к атипичным вариантам псевдотуберкулёзного микроба и не рассматривались как причина заболевания. В 1964 г. во Франции и Бельгии появились сообщения о выделении возбудителя иерсиниоза (первоначально названного *Pasteurella X*) при мезентеральном лимфадените, аппендиците, энтерите. В последующие годы бактерию выделяли и за пределами Европы в США в 1965 году, Канаде и Южной Африке – в 1966 г., Бельгийском Конго – в 1967 г., Бразилии – в 1969 г., Японии – в 1972 г., Иране – в 1976 году (Н. Н. Mollaret, 1995 г.). Одно из первых крупных зарегистрированных пищевых отравлений, вызванных данными иерсиниями зарегистрировано в Японии в 1972 году. Тогда 180 школьников вместе с учителем были поражены заболеванием с характерными симптомами бактериального пищевого отравления. Следующая крупная вспышка подобного пищевого отравления была описана у 220 школьников США в 1976 году. Причем 36 школьников были госпитализированы, а 16-ти из них произведена апендиктотомия, прежде чем был правильно поставлен диагноз заболевания.

В дальнейшем кишечный иерсиниоз, как пищевая инфекционная болезнь людей, появилась в Западной Европе – Франции, Бельгии, Голландии, Германии, Швейцарии. Позднее она регистрировалась в Швеции, Финляндии, Венгрии. По предложению W. Frederiksen бактерии, вызывающие болезнь, названы *Yersinia enterocolitica*, что и было принято Международным подкомитетом по таксономии в 1972 г.

В настоящее время кишечный иерсиниоз занимает второе место по значимости после сальмонеллез (В. И. Покровский, 1985), а вспышки пищевых отравлений, вызванных данным воз-

будителем болезни регистрируются чаще, чем бактериальная дизентерия. В России кишечный иерсиниоз занимает второе место среди пищевых зоонозов, после сальмонеллёза (Черкасский Б. Л., Подунова Л. Г., Акулова Н. К., 1995).

Опасность кишечного иерсиниоза усугубляется чрезвычайной распространённостью возбудителя *Yersinia enterocolitica* в природе. Как отмечают ряд исследователей (Ленченко Е. М., Куликовский А. П., Павлова И. Б., 1998; Зыкин А. Ф., 1998; Покровский В. И., 1986; Ющенко Г. В., 1984) бактерии *Yersinia enterocolitica* выделены практически от всех видов млекопитающих, птиц, рыб, земноводных, моллюсков и насекомых. Кроме того, *Yersinia enterocolitica* обнаружены в воде, почве, сточных водах, продуктах животного происхождения. Особую опасность представляют маститы вызываемые иерсиниями, что сказывается на контаминации пищевых продуктов данной бактерией. Инфицированность сырого молока достигает 20 %, пастеризованного – 7-9 %, мяса – 5 % (М. В. Дулатова 1989). По данным Ющенко Г. В. и др. (1969), указанные микроорганизмы выделяются из сырого молока – 10-12 % проб (молочная кухня, молокозавод), пастеризованного – в 6 %, из молока от частных коров – в 6,6 % проб. По данным Vidon D., Delmas C., во Франции в 1981 г. при исследовании молока были выявлены в 81,4 % проб. Из молока и молочных продуктов *Y. enterocolitica* выделена в Австралии, Чехословакии. Японии, Дании, Аргентине, Германии, России. Shiemann (1978) сообщил, что микроорганизмы *Y. enterocolitica* были выделены в 9,2 % из 65 проб сыра. Необходимо отметить, что существующие методы пастеризации молока полностью обеззараживают его от *Y. enterocolitica*. В. Г. Кузнецов, В. Н. Багрянцев 1992 г. в своих исследованиях показали, что в 35 %, т.е. в каждой 3-й пробе пастеризованного молока, обнаруживали иерсинии. Как показали их исследования активность бактерий сохраняется даже при разведении пробы молока в 4 раза. Способность иерсиний длительное время сохраняться в продуктах животного и растительного происхождения, размножаться при низких температурах, а также неприхотливость к условиям обитания способствуют накоплению

их в пищевых продуктах. Пищевой путь передачи иерсиниозной инфекции человеку является ведущим, поскольку именно с ним связано большинство спорадических групповых заболеваний и вспышек иерсиниоза. Заражение человека происходит в результате употребления в пищу сырых или недостаточно термически обработанных продуктов (мясо, молоко, фрукты, овощи). Ющенко Г. В. и др. (1969) утверждают, что частота обнаружения иерсиний с овощей и фруктов колебалась от 2,7 % до 5,2 % и от 2,1 до 3,2 % соответственно. При этом 44 % заболевших связывали свое заболевание с употреблением сырого молока, 27,7 % – овощей и фруктов, 6,5 % – с употреблением других продуктов. Активность пищевого фактора передачи подтверждает и идентичность сероваров штаммов, выделенных от больных, из пищевых продуктов и внешней среды. Мясо и мясные продукты так же могут служить путями распространения иерсиниозной инфекции в случае получения их от больных животных (бактерионосителей) или вторично через различные предметы во время убоя и переработки. Leistner et al (1975) в Германии обнаружили, что 28,9 % проб куриного мяса, 34,5 % свинины, 10,8 % говядины были контаминированы *Y. enterocolitica*. Inoue Kurose (1975) в Японии выделили *Y. enterocolitica* из говядины. Schiemann (1980) в Канаде выделил *Y. enterocolitica* из свинины и продуктов ее переработки, причем наибольшее количество штаммов было выявлено в свиных языках и фарше. На убойных пунктах Дании Christensen (1982) выделил *Y. enterocolitica* в смывах из миндалин здоровых свиней. Seetee et al (1979) в США выделили несколько штаммов *Y. enterocolitica* из упакованных в вакууме кусков говядины и баранины. Бактерии были обнаружены в высушенном мясе. В Бельгии при исследовании 29 образцов свиных языков, 50 – мездры, 25-свиного мяса, 54 образцов миндалин – патогенные штаммы иерсиний были выделены соответственно в 96,5; 16; 26 и 61 % случаев. Есть случаи инфицирования колбасы (М. В. Дулатова 1989), т.к. технология ее приготовления включает этап выдерживания мясного фарша в растворе поваренной соли в течении 3-х суток в холодильнике.

Большое значение, как фактору передачи иерсиниозной инфекции, ряд авторов придают и другим пищевым продуктам. Например, штаммы *Y. enterocolitica* выделены из устриц, салата с куриным мясом, тушеных грибов, картофеля, капусты, моркови, свеклы и фруктов.

Почва является резервуаром возбудителя, в котором он не только сохраняется, но и длительное время может размножаться. Китайские ученые в 1988 г. показали, что жизнеспособная популяция кишечных иерсиний при достаточной аэрации почвы формируется к 10 дню. Отечественные исследователи установили, что почвы с высоким содержанием органических веществ, высокой влажностью и слабощелочной реакцией способствуют длительному сохранению данных бактерий.

В качестве постоянно существующего резервуара и потенциального источника заражения человека и животных иерсиниями может рассматриваться **вода** в открытых и закрытых водоёмах и колодцах. Van Oye (1978) сообщил, что у 148 видов рыб выловленных в реке Вальдивии (Чили) были выделены иерсинии. Таким образом, заражённая рыба способна инфицировать поедавших её людей и контаминировать воду. Установлено, что в речной воде она сохраняется более 1 года, в морской воде несколько недель, в стерильной воде 3 мес. По данным Кузнецова В. Г (1983) численность иерсиний в холодное время года в воде выше, чем в жаркое. Животноводческие фермы также являются резервуаром инфекции.

По мнению Сомова Г. П. (1985), можно предполагать, что возбудители иерсиниозов сформировались во внешней среде. Встречаясь в процессе эволюции с первыми теплокровными, иерсиний в результате мутаций и отбора приобрели свойства, позволяющие им выжить в макроорганизме хозяина, что и привело к развитию патогенных свойств, то есть способности вызывать инфекционный процесс. При этом бактерии не утратили своих первоначальных сапрофитных свойств, управление которыми заложено в генетическом аппарате, обеспечивающем им возможность размножаться и длительное время существовать

во внешней среде. Так как иерсинии являются факультативными паразитами, обладающими патогенными свойствами и сохраняющими способность существовать вне организма во внешней среде, то условия их жизнедеятельности обусловлены влиянием абиотических факторов, характерных для естественных мест обитания этих бактерий, таких, как температура окружающей среды, ультрафиолетовые лучи, повышенные концентрации натрия хлорида, pH среды и др. Наиболее важным из факторов внешней среды, определяющим жизнедеятельность микроорганизмов, является температура. К холоду иерсиний устойчивы, хорошо переносят температуру от -15 до -20 °C и в этих условиях могут длительно существовать. Для *Y. enterocolitica* важной особенностью является психротрофность – свойство довольно редкое для патогенных бактерий. То есть эти микроорганизмы при 4 °C не только сохраняются, но и размножаются, поэтому иерсиниоз называют «болезнь из холодильника».

Механизм адаптации психротрофных микроорганизмов к биологически низким температурам до сих пор полностью не ясен. Вместе с тем установлено, что при понижении температуры у этих микроорганизмов наблюдается интенсивное поступление питательных веществ и расщепление их внутри клетки. Кроме того, способность микроорганизмов расти при низких температурах зависит от строения и липидного состава клеточной мембраны. В частности, в липидах клеточных мембран психротрофных бактерий содержится больше ненасыщенных кислот, чем в липидах мембран мезофилов, вследствие чего цитоплазматическая мембрана постоянно находится в жидкокристаллическом состоянии даже при низких температурах. Психрофильные свойства иерсиний способствуют возникновению и развитию эпидемического процесса, поскольку холод не только позволяет этим бактериям размножаться и накапливаться в объектах окружающей среды, но и является пусковым фактором генетико-биохимических механизмов, обеспечивающих регуляцию их вирулентности. В районах с умеренным климатом эта инфекция выделяется в настоящее время значительно чаще, чем в сухих и жарких местах.

Род *Yersinia* в соответствии с систематикой по Bergey's (1994) входит в семейство *Enterobacteriaceae*, 5-ую секцию, 1-ый отдел *Gracilicutes*, царство *Procaryotae*. В род *Yersinia* был включен возбудитель иерсиниоза - *Yersinia enterocolitica* (*Pasteurella X*). В настоящее время род *Yersinia* состоит из 11 видов - *Y.pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenia*, *Y. kristensenia*, *Y. aldovae*, *Y. bercovieri*, *Y. mollaretii*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*. *Yersinia enterocolitica* представляет собой палочки с закругленными концами. Размеры палочек колеблются в зависимости от возраста культуры, температуры и среды выращивания. В условиях выращивания при 37 °С это чаще всего небольшие, одинаковые по размерам палочки (кокковидные), при 22-25 °С – обычные палочки средних размеров. В мазках из старых культур палочки различны по величине и форме. *Yersinia enterocolitica* окрашиваются всеми анилиновыми красителями. По Грамму – грамотрицательная, выращенная на жидкой среде окрашивается биполярно. Минимальная температура роста –1,3 °С, максимальная +44 °С (Reed, 1994). При температуре 18-20 °С бактерии подвижны. При более высокой температуре культивирования (37 °С) штаммы иерсиний неподвижны. Иерсинии – факультативные аэробы. Оптимальной для роста является рН среды 7,2-7,4, но возбудитель может расти при рН от 3,0 до 9,6 (Little, 1992). Наиболее благоприятна для роста иерсиний температура 22-28 °С. Бактерии растут и при температуре 37-40 °С, но при температуре выше 44 °С рост прекращается. При пониженной температуре 4-14 °С возбудители растут, но темп роста по мере снижения температуры угнетается. Иерсинии неприхотливы и нетребовательны к питательным веществам, растут на обычных питательных средах (МПА, агары Хоттингера и Мартена), средах Эндо, ЭМС, Плоскирева, Серова, агаре Мак-Конни, SS-агаре. Растут иерсинии на шоколадном и кровяном агарах, в МПБ, 1 % пептонной воде. Штаммы *Y. enterocolitica* вырабатывают фермент пенициллиназу, поэтому растут на средах с пенициллином, что является их отличительным признаком от *Y. pseudotuberculosis*. Через сутки инкубации, на агаре Эндо, при

температуре 22-28 °С, вырастают мелкие (росинки), круглые, выпуклые, бесцветные, блестящие колонии. Лучшие результаты достигаются через 36-48 ч. инкубации посева. На вторые сутки колонии увеличиваются в размерах и могут приобретать розоватый оттенок, иногда с красной точкой в центре. На слабощелочных средах (МПА, агары Хоттингера, Мартена) через 18-24 ч. вырастают колонии размером от 0,1-0,2 до 0,5 мм, круглые, сферически выпуклые, с ровным или волнистым краем, бесцветные, блестящие полупрозрачные, мягкой консистенции с голубоватым оттенком в проходящем свете.

Через 36-48 ч. колонии теряют прозрачность и голубоватый оттенок. Иерсинии по своей устойчивости к физическим и химическим агентам во многом сходны с представителями семейства кишечных. Растворы дезинфицирующих веществ (хлорамин, карболовая кислота и алкоголь) в обычных прописях убивают микробов в течение нескольких минут. К холоду иерсинии устойчивы: хорошо переносят температуру от -20 °С и в этих условиях могут длительно существовать, при температуре от +4 до 14 °С не только сохраняются, но размножаются. В тушках цыплят, хранившихся при -18 °С в течение 3-х месяцев, количество бактерий снижалось очень незначительно. Данный микроорганизм может размножаться в пищевых продуктах при температуре холодильника (+4 °С), что представляет опасность для здоровья человека. В одном из экспериментов установлено, что в свинине, хранившейся в течение 2х недель при температуре холодильника, количество бактерий в 1 грамме продукта увеличилось в три раза, по сравнению с первоначальными показателями. В связи с тем, что увеличение ассортимента мясных продуктов, создание резерва продуктов в холодильниках требуют совершенствования процессов холодильного хранения Ленченко Е. М, совместно с Штукаревой М. Ю. были проведены опыты по изучению сроков выживаемости иерсиний в мясе и мясопродуктах. Ими установлено, что в говядине и свинине при 4 °С иерсиний выживали 35 суток (срок наблюдения); при -18 °С сохранялись 75 суток (срок наблюдения).

К воздействию высокой температуры микроорганизмы *Y. enterocolitica* менее устойчивы по сравнению с *E. coli*. При нагревании до 60-80 °С бактерии погибают через 15-30 мин соответственно, при кипячении при 100 °С – в течение нескольких секунд. При температурной обработке продуктов (варка мяса, пастеризация молока), применяемых в промышленности, *Y. enterocolitica* быстро погибают. По сравнению с кишечной палочкой *Y. enterocolitica* менее устойчива к воздействию УФ-облучения, гамма-лучей. Установлено, что на прямом солнечном свете иерсинии в течение 30 мин инактивируются, при рассеянном отмирают через 6-8 ч. Очень быстро они погибают при высушивании.

Величина кислотности продукта влияет на выживаемость бактерий. Ее рост прекращается при показателе pH 5,0. Однако, сообщают, что этот микроорганизм выделили из острокислого соуса для бифштексов.

В отношении влияния на жизнеспособность иерсиний поваренной соли данные различны. Есть публикации, что концентрация в 4 % угнетает рост одного из штаммов, однако бактерии другого штамма в 80 % случаев выживали после контакта с поваренной солью данной концентрации. Считается, что бактерии растут при содержании NaCl – 7 % (Reed, 1994). При изучении влияния различных концентраций натрия хлорида на рост и изменчивость иерсинии Ленченко Е. М. и др (1998) установили, что, на агаре с содержанием NaCl 30 г/л *Y. enterocolitica* способны расти, тогда как *Y. pseudotuberculosis* не вырастают. Таким образом, *Y. enterocolitica* обладает широким спектром ферментов, обеспечивающих им питательные и энергетические потребности и возможность существования в различных условиях, в том числе и в окружающей среде.

Бактерии *Yersinia enterocolitica* в процессе своей жизнедеятельности и размножения выделяет токсическое вещество двух типов. Первый – термостабильный энтеротоксин, стойкий к воздействию температуры в 100-120 °С в течение 20 минут. Причем, что важно, образуемый при комнатной температуре (на-

пример в пищевых продуктах) +25 °С более ядовит, чем токсин, образуемый при температуре тела +37 °С. Но не все штаммы этой бактерии способны продуцировать подобный токсин. Чаще всего это штаммы выделенные из продуктов питания особенно из молока. У штаммов, выделенных из объектов окружающей среды, подобное свойство встречается реже. В настоящее время установлено, что большинство штаммов, выделенных от больных людей, обладают энтеротоксином. Второй тип токсина – термолабильный, разрушающийся при 100 °С в течение нескольких секунд. Одним из факторов, повышающих патогенность иерсиний, является их способность внедряться в клетки ткани человека или животного и размножаться в ней с последующим ее разрушением, то есть они обладают инвазией. Это свойство характерно для тех штаммов, которые также выделены от больных. Еще одним свойством, повышающим болезнетворное действие иерсиний, является их способность проявлять устойчивость к действию нормальной человеческой сыворотки крови. Таким образом, говоря о болезнетворности данных бактерий необходимо учитывать особенности их размножения и жизнедеятельности. Проникнув в организм через ротовую полость, иерсинии попадают в желудок, где частично погибают под действием кислой среды. Бактерии, преодолевшие защитный барьер желудка, внедряются в слизистую оболочку подвздошной кишки и ее лимфоидные образования. В месте входных ворот инфекции развивается различной выраженности воспалительный процесс. По лимфатическим сосудам иерсинии проникают в мезентеральные лимфатические узлы и вызывают мезаденит. В патологический процесс может быть вовлечена слепая кишка. На фоне инфекционно-воспалительных изменений развиваются токсический и аллергический процессы, связанные с токсинемией. На этом этапе инфекционный процесс, приобретая черты локализованной формы, может завершиться. В случае прорыва лимфатического барьера кишечника возникает бактериемия, обуславливающая развитие генерализованных форм заболевания. Наблюдается токсико-аллергическое поражение многих органов

и систем, в первую очередь печени и селезенки, возможно развитие полилимфаденита, полиартрита, остита, миозита, нефрита, уретрита, менингита и др. Иммунопатологические реакции у части больных иерсиниозом могут служить толчком к развитию системных заболеваний (тип коллагенозов). Заключительное звено патогенеза иерсиниоза - освобождение организма от возбудителя, ведущее к выздоровлению. Развивающийся иммунитет при иерсиниозе не является прочным, с чем связано нередкое развитие обострений и рецидивов болезни.

Внешне заболевание кишечным иерсиниозом проявляется у людей очень разнообразно. При этом доминирует энтероколит, сопровождающийся кашице водянистыми испражнениями, частично с примесью слизи и крови. Часто встречается форма течения заболевания как псевдоаппендицит (мезентеральный лимфаденит). В 6 % случаев исследования человеческого аппендикса обнаруживается *Y. enterocolitica*. Значительней, чем острая фаза, при этой инфекции является фаза осложнений, при которой могут возникать артриты, заболевания кожи и даже смертельно протекающий сепсис (Х. Наттерман, 1987). Помимо того, что возможно его течение в виде гастроэнтероколита (воспалительный процесс в желудочно-кишечном тракте) у взрослых оно сопровождается тошнотой, поносами, болями в животе, у детей протекает в виде энтеритов. Часто появляются диффузные боли в области кишечника, локализующиеся в области пупка или правой подвздошной области. Температурная реакция различна, ее может не быть или она достигает показателя в 38-39 °С. Течение болезни может проходить в форме энтероколита (одновременное воспаление слизистых оболочек толстых и тонких кишок). В этом случае развиваются более тяжелые поражения, имеющие уже другие клинические проявления. Одновременно с признаками энтероколита, или через два дня у больных появляются сильные боли в правой плеоцекальной области повышается температура до 38-39 °С. В этом случае подозревают аппендицит и больного необходимо отправить в больницу. Довольно часто кишечный иерсиниоз протекает как генерализованная инфекция, развивающаяся после

возникновения поноса и болей в животе. Повышается температура до 39 °С, появляется головная боль, боль в мышцах и суставах, резкая слабость. Клинические проявления со стороны кишечного тракта могут и отсутствовать. Позднее появляется сыпь сходная с краснухой. Характерной является сыпь на ладонях с последующим шелушением. Данная инфекция может протекать как сепсис, часто встречающийся у маленьких детей и сопровождающаяся высокой температурой, лихорадкой, желтушным окрашиванием кожи, сыпью. Почти при всех формах течения иерсиниоза поражается, в той или иной степени, печень. Зачастую иерсиниозный гепатит по клинике напоминает вирусный гепатит. Возможным осложнением иерсиниоза является поражение суставов - артриты. Как правило, воспалительным явлениям в суставах предшествуют: лихорадка, понос, боли в животе. Частым осложнением при данном заболевании является узловатая эритема – появление крупных болезненных узелков. Регистрируются при иерсиниозе и воспалительные явления в глазах. Возможно поражение почек, легких и плевры.

Начиная с 60-х годов нашего века заболеваемость людей иерсиниозом неуклонно растет и составляет на различных территориях от 6 до 200 случаев на 100 тысяч населения. К настоящему времени установлена повсеместная циркуляция иерсиний (Лысонов Ю. И., Марамович А. С., Степлин И. А. и др., 1991; Ющенко Г. В., Калошина А. А., Саргоян С. С., 1991; Ющенко Г. В., Елкина Ю. Б., Калужевский С., 1991).

Высокий уровень заболеваемости отмечается в США, Канаде, Бразилии, Конго, Алжире, Японии, Иране, Финляндии, Дании, Чехословакии, Румынии, Болгарии, ГДР, Бельгии, Великобритании, Венгрии, Греции, Испании, Италии, Нидерландах, Норвегии, Польше, Франции, Швейцарии, Швеции, Югославии, Израиле, Заире, Южно-Африканской республике (Toma and Deidrick, 1975; Pedersen, 1979; Pedersen and Winblad, 1979; Weber, Knapp, 1981; Hunter, Huger, 1983; Nesbakken, Kapperud, 1985; De Boer et al., 1986; Borie et al., 1997; Funk et al., 1998; Letellier et al., 1999; Thibodeau et al., 1999).

Считают, что основным резервуаром инфекции являются синантропные и полусинантропные грызуны. *Y. enterocolitica*, были выделены от серых крыс, домовых и полевых мышей, обыкновенных и рыжих полевков, бурозубок, ондатры и др. (Калошина Л. А., Ющенко Г. В., Шестопалов Н. В., 1991; Шикулов В. А., Хайтович А. Б., 1989; Михайленко А. Г., Сондул Г. М., Бузату А. Е., Чебан Д. С., 1989).

Шикулов В. А. и соавт. (1989) при исследовании 10 тысяч синантропных и живущих в природе грызунов высевали чаще всего возбудителей кишечного иерсиниоза от лесных мышей (51,2 %), обыкновенной полевки (14,7 %) и домовой мыши (13,3 %). Выделенные штаммы по серотипированию были отнесены к 26 сероварам, в т.ч. патогенным для человека.

В связи с бурным ростом городов, вовлечением их в черту природных очагов, созданием в пригородах и окраинной части хранилищ, теплиц и других предприятий, привлекающих грызунов, инфицированность популяции городских грызунов иерсиниями увеличилась в последнее время с 2-7 % до 6-10 % (Ющенко Г. В., 1989). Например, в Санкт-Петербурге зараженность зверьков с городских объектов была более высокой, чем с пригородных – 19,1 и 4,2 % соответственно (Ващенко Г. И., 1983).

Другими учеными (Смирнов И. В., Ценева Г. Я., 1991) было также установлено, что все штаммы этого вида, выделенные со смывов с овощей в местах их хранения (с моркови, капусты, картофеля, свеклы), также относятся к биовару 1 и не имеют маркеров вирулентности или плазмидной ДНК, то есть по фенотипу соответствуют штаммам от грызунов. Отсутствие тестируемых маркеров и патогенных свойств у этих штаммов не позволяет отнести их к потенциальным возбудителям у человека, а редкая высеваемость патогенных вариантов иерсиний от грызунов позволяет ставить под сомнение их роль как основного источника инфекции при иерсиниозе.

Развитие животноводства на промышленной основе привело к тому, что в естественную цепь циркуляции иерсиний в природных очагах включились сельскохозяйственные животные (коро-

вы, свиньи, овцы, олени, птица). Особое внимание привлекают свиньи, как носители *Y. enterocolitica* и один из источников иерсиниоза.

Y. enterocolitica вирулентных серо-биоваров обнаружены в фекалиях и миндалинах здоровых свиней в 4,9 % и 15,2 % (Mafu et al., 1989; Asplund et al., 1990; Merilabti-Palo et al., 1991; De Boer and Nouws, 1991) соответственно.

В отдельных животноводческих комплексах в центре России иерсиниями были инфицированы 10,4 % свиней. Выделенные штаммы в основном были представлены сероваром 03, биоваром 4 (Смирнов И. В., 1992). Поскольку свиньи часто инфицированы возбудителем иерсиниоза, проведено изучение 54 штаммов иерсиний, циркулировавших в агроценозе, включающем крупный свинокомплекс (получены от В. А. Гордейко). Установлено, что для 50 из них характерна ферментация салицина, преимущественная принадлежность к сероварам 05, 06, 03, 07 или нетипируемым и отсутствие ПВ-ассоциированных маркеров. Они отнесены к возбудителям иерсиниоза серовара 03 биовара 4. Два из них выделены из фекалий свиней и сточных вод свинокомплекса, два – из образцов почвы полей орошения.

Полученные результаты подтверждают необходимость тщательного изучения признаков вирулентности у штаммов иерсиний, циркулирующих во внешней среде, объекты которой довольно часто содержат микроорганизмы, относимые к роду *Yersinia*. Такая необходимость связана, в частности, с различиями в экологии патогенных и непатогенных иерсиний (Aldova et.al., 1980; Zink et.al., 1982).

Частая инфицированность различных органов, тканей и испражнений здоровых и больных свиней из животноводческих и индивидуальных хозяйств зарегистрирована во многих странах мира, что подтверждает их существенную роль в эпидемиологии иерсиниоза у человека.

Ведущая роль сельскохозяйственных животных в заражении людей подтверждается многочисленными случаями иерсиниоза среди профессионально-ориентированных групп населения

из антропоургических очагов иерсиниоза. Каландадзе Е. П. и соавт. (1991) при серологическом обследовании 138 работников птицеводческого комплекса выявили специфические антитела к *Y. enterocolitica* у 71,7 % лиц. У вновь принятых на работу антитела появлялись спустя 5-10 месяцев и через 6-10 лет обнаруживались у 23,1 % лиц. При этом чаще других обнаруживали иерсиний сероваров 03, 05, 06 и 09.

Серологическое изучение иерсиниоза у 167 работников свинокомплекса в центральной России позволило выявить сероконверсии в 16,6 % случаев (Гордейко В. А., Воронцова Т. А., 1990). Наиболее часто отмечены сероконверсии к бактериям серовара 03 (22 человека); остальные – к серовару 09. У части лиц при повторном обследовании (через 4-6 недель) выявлено 4-х кратное нарастание титра антител, сопровождающееся клинической симптоматикой. Аналогичные данные были получены у работников мясокомбината С441.

Одинаковая частота обнаружения 2-4 биоваров *Y. enterocolitica* при исследовании экстракта фекалий больных острыми кишечными инфекциями (ОКИ) людей и носоглоточной слизи клинически здоровых работников мясокомбината, имевших профессиональный контакт с животноводческим сырьем (1,8 %), свидетельствуют о частой связи последних с этими бактериями, с одной стороны, и о возможности развития бактерионосительства патогенных *Y. enterocolitica* – с другой (Ющенко Г. В., и др., 1991).

Следует, однако, заметить, что иерсиниоз распространен во всем мире свидетельствует высокая частота выделения иерсиний от больных и обнаружение положительных серологических реакций. Так, при обследовании 1006 больных ОКИ Sininonos S. et.al. (1989) выделял 128 штаммов *Y. enterocolitica* от 122 больных с желудочно-кишечными симптомами. Feeney G. et.al. (1991) при исследовании 3795 образцов фекалий от больных диареей выделили иерсиний в 15,8 % случаев.

Помимо животных и больных людей иерсинии нередко находят у здоровых бактерионосителей. В Санкт-Петербурге при обследовании 1285 здоровых людей, поступающих на работу на

пищевые объекты, у 10,5 % были обнаружены иерсинии различных сероваров, в том числе 03, 05 и 09, часто являющихся причиной заболеваний у людей (Ценева Г. Я., 1992).

Среди факторов передачи иерсиниозной инфекции человеку наибольшая обсемененность возбудителями была установлена в продуктах питания животного происхождения (53,3 %), в смывах со столового инвентаря предприятий общественного питания (5,7 %), в овощах (0,2 %), в том числе свекле (2,2 %) и капусте (0,4 %), картофеле, моркови, рыбе, мясе цыплят, ягнят, говядины, устриц, креветок, крабов и т.д. Исследование кормов показало, что частота обнаружения в них возбудителей иерсиниоза была равна 2,3%, в том числе в силосе 6,8 % (Fukushima, 1985; de Boer et al., 1986; Gurgui Ferrer et al., 1987; Cox et al., 1990; Ibrahim and MacRae, 1991; Falcao, 1991; Hudson et al., 1992; de Boer, 1994; Toora et al., 1994; Sierra et al., 1995; Escudero et al., 1996; Kbare et al., 1996; Logue et al., 1996; Velazquez et al., 1996; Fredriksson-Abomaa et al., 2001).

Иерсинии различных, в том числе патогенных видов *Y. enterocolitica* сероваров 03 и 09, нередко обнаруживали в молочных продуктах (Догель Л. З., 1985; Walkec S. J., Cilmour A., 1986). В Австралии обсемененность молока коров в отдельных хозяйствах сочеталась с выделением иерсиний из кишечника животных (Foberg U., Fryden A., Kinistrom E., Persson K., Weiland O., 1986). До 24 % образцов инфицированного молока обнаружено в Индии. Повышенный интерес исследователей иерсиниозов к молочной продукции диктуется тем обстоятельством, что молоко (коровье, козье, овечье, буйволиное и др.) и его продукты являются важнейшим компонентом питания населения в большинстве стран мира, особенно детей, наиболее подверженных заболеваниям иерсиниозами (Кузнецов В. Г., Багрянцев В. Н., 1992; de Boer et al., 1986; Walker and Gilmour, 1986; Christensen, 1987; Gurgui Ferrer et al., 1987; Hughes, 1987; Cover and Aber, 1989; Ibrahim and MacRae, 1991; Larkin et al., 1991; Rea et al., 1992; Tassinari et al., 1994; Toora et al., 1994; de Boer, 1995; Beuchar, 1996; Odumeru et al., 1997; Szabo et al., 2000;

Ackers et al., 2000; Fredriksson-Ahomaa et al., 2001). Инфицированность сырого молока достигает 20 %, пастерелизованного 7-9 %, мяса 5 % (М. В. Дулатова 1989). По данным Vidon D., Delmas C. 1981 г. во Франции при исследовании молока с помощью оригинальной обогатительной среды *Yersinia enterocolitica* были выявлены в 81,4 % проб. В. Г. Кузнецов, В. Н. Багрянцев 1992 г. в своих исследованиях показали, что в 35 %, т.е. в каждой 3-й пробе пастеризованного молока, обнаруживали иерсиний. Как показали их исследования активность бактерий сохраняется даже при разведении пробы молока в 4 раза.

Выводы их исследований таковы: а) пастеризованное молоко, поступающее в продажу, в 35,8 % случаев контаминировано апатогенными видами *Y. enterocolitica*, преимущественно биовара 1, являющегося обитателем внешней среды; б) контаминация пастеризованного молока носит вторичный характер, т.к. происходит во время розлива молока в тару, случайно загрязненную иерсиниями из окружающей среды; в) пастеризованное молоко, контаминированное иерсиниями различных биоваров и сероваров, играет роль важного фактора распространения носительства иерсиний среди населения и потенциально таит в себе опасность стать причиной заражения патогенными иерсиниями.

Есть случаи инфицирования колбасы (М. В. Дулатова 1989), т.к. технология ее приготовления включает этап выдерживания мясного фарша в растворе поваренной соли в течении 3-х суток в холодильнике.

По данным зарубежной литературы, исследования в области заболевания кишечным иерсиниозом мелких домашних животных проводились на основе реакции пульсированного электрофореза (PFGE) (Iteman et al., 1991; Buchrieser et al., 1994; Najdenski et al., 1994; Saken et al., 1994; Hosaka et al., 1997) и полимеразной цепной реакции (PCR) (Zheng X.B., Xie C., 1996; Fredriksson-Ahomaa et al., 1999; Ozbas Z. Y., Lehnen A., Wagner M., 2000).

В большинстве случаев был выделен штамм 4/0:3 (Fredriksson-Ahomaa et al., 1999). Также этот штамм был выделен у здоровых собак, которые не проявляли клинических признаков заболева-

ния (Fredriksson-Ahomaa et al, 1999; Weagant S. D., Jakow J. A., 1999; Jinneman K. C., Kaysner C.A., Hill W. E., 1999). Заражение домашних животных происходило от скармливания им зараженных иерсиниозом внутренних органов и мяса забитых животных (Fredriksson-Ahomaa et al, 2001a), и выделяли этот микроорганизм в течение нескольких недель (Fenwick et al, 1994). А затем через зараженные фекалии иерсиниоз может передаваться человеку (Maria Fredriksson-Ahomaa, 2001).

Случаи кишечного иерсиниоза с другими клиническими проявлениями остаются не учтенными, что, на наш взгляд, искажает истинную картину распространения данной инфекции.

Водный фактор в распространении иерсиниоза в последние годы приобретает серьезное значение. Находки иерсиний часты как в воде открытых водоемов, так и в системах централизованного водоснабжения. Причиной загрязнения воды могут быть сбросы недостаточно очищенных сточных вод и/или попадание испражнений животных в воды с пастбищ и из животноводческих комплексов, расположенных вблизи водоисточников (Christensen, 1979; Christensen, 1980; Stengel, 1986; Thompson and Gravel, 1986; Cover and Aber, 1989; Schiemann, 1990; Gohul and Karapinar, 1991; Brennhovd et al., 1992; Ostroff et al., 1994; Saebo et al., 1994).

На отдельных территориях европейской части России иерсинии были выявлены при исследовании воды из колодцев.

Причиной вспышки иерсиниоза в детском комбинате села Старый Кувак явилось обсеменение иерсиниями питьевой воды из родника, в результате отсутствия у него санитарной охраны и неудовлетворительного состояния системы водоснабжения села (Суркова Т. С., Гражданов В. К., 1990).

Вспышки различного характера и масштаба, связанные с употреблением молока, молочных и мясных продуктов, воды, овощей и фруктов наблюдали во многих странах мира.

Возрастная структура иерсиниоза в нашей стране изучена достаточно хорошо, как на отдельных территориях, так и в крупных городах. По мнению ряда авторов, чаще болеют дети в возрасте до 14 лет (Ценева Г. Я., 1992; Горловская Э. В., Ха-

кимов Н. М., Гиниятуллина Ф. Х., 1993). Многие экологические аспекты возбудителя кишечного иерсиниоза остаются малоизученными. Инфицирование человека при иерсиниозе происходит через мясо, молоко и молочные продукты, свежие овощи.

Таким образом, иерсиниоз относится к числу широко распространенных в мире инфекций, что в первую очередь обусловлено выраженной адаптационной способностью возбудителя.

Морфология и биологические свойства

Y. enterocolitica – факультативный анаэроб, растет на обычных питательных средах, не образует капсулы *in vitro*, но формирует ее *in vivo*. Являясь факультативным паразитом, кишечные иерсинии способны расти сапрофитически, а также внедряться и персистировать внутриклеточно в ретикулоэндотелиальной системе млекопитающих (Fukushima and Gomyoda, 1986; Kleinlein and Untermann, 1990; Doherty et al., 1995; Bodnaruk and Draughon, 1998; Barakat and Harris, 1999; Breholt et al., 1999; Harrison et al., 2000; Pin et al., 2000).

Штаммы *Y. enterocolitica* растут при pH 4.6-9.0 (оптимум 7.0-8.0) и температуре от 1 до 44 °C (Robins-Browne, 1997). Интенсивный рост кишечных иерсиний получали при температуре 22 °C (Winblad S., 1978) и 28 °C (Wauters G., 1981). Некоторые штаммы образуют специфические антигены при 29 °C (Wauters G., 1970). Температурный фактор оказывает глубокий эффект на экспрессию генов (в том числе вовлекаемых в процесс инвазии микроба в эукариотические клетки) и обеспечивает фенотипические изменения в морфологии клеток, их подвижности, синтезе протеинов наружной клеточной мембраны, продукции уреазы, синтезе и структуре липополисахарида (Aulisio et al., 1980; Fukushima and Gomyoda, 1986; Brocklehurst and Lund, 1990; Kleinlein and Untermann, 1990; Doherty et al., 1995; de Koning-Ward and Robins-Browne, 1995; Robins-Browne, 1997; Bodnaruk and Draughon, 1998; Barakat and Harris, 1999; Bredholt et al., 1999; Harisson et al., 2000; Pin et al., 2000).

Прототрофные при 28 °C иерсинии нуждаются в дополнительных факторах роста при 37 °C. При температуре выращивания

37 °С происходит, как правило, диссоциация клеток в направлении SR, а антисыворотки, полученные против бактерий, выращенных при данных температурных условиях, содержат антитела, направленные, в основном, против R-центра 0-антигена.

При температурах ниже 30 °С подвижны за счет перитрихиально расположенных жгутиков, при 37 °С неподвижны, жгутиков не образуют. Напротив, при 37 °С, но не при 22-28 °С, вирулентные штаммы образуют матрикс из множества тонких отростков – фибрилл, которые короче и тоньше жгутиков, выполняют роль адгезина. Важнейшим непостоянным структурным элементом клетки является также уникальная для иерсиний плазмида вирулентности (pYV) - кольцевидно замкнутая молекула ДНК массой 40-50 мега-дальтон (МД), лежащая непосредственно в цитоплазме клетки или интегрированная в ее хромосому. Гены этой плазмиды во многом определяют патогенные свойства возбудителя. Аналогичные по структуре и функциям плазмиды обнаружены и у других патогенных иерсиний – *Y.pseudotuberculosis*, *Y.pestis*. Иногда у возбудителя иерсиниоза встречаются другие плазмиды (например, R-плазмиды) (Смирнов И. В., 1992; Vesikari et al., 1981; Heesemann et al., 1983; Skurnik et al., 1983; Lachica et al., 1984; Portnoy and Martinez, 1985; Skurnik and Wolf-Watz, 1989; Cornelis et al., 1998).

Осуществлено типирование штаммов *Y.enterocolitica* по чувствительности к 12-16 бактериофагам. Установлена определенная зависимость распространения фаговаров от объекта и географического места их выделения. Однако широкого практического применения фаговый тест пока не получил, возможно, вследствие того, что очень большая часть штаммов кишечных иерсиний не поддается фаготипированию при использовании имеющегося набора бактериофагов.

Культуральные свойства возбудителя, помимо характерных для многих иерсиний олиготрофности (способности размножаться в «голодных» средах), психрофильности (способности размножаться и проявлять физиологическую активность при низких температурах), относительно медленных темпах роста и размножения, имеют ряд особенностей. Так, возбудители иер-

синиоза обладают температурозависимыми признаками: ауксотрофностью (проявляют потребность в тиамине и серосодержащей аминокислоте), кальцийзависимостью (в отсутствие ионов кальция у них наблюдается бактериостаз), аутоагглютинации (при росте в некоторых жидких средах образуют хлопьевидный осадок), морфологии колонии (существенное различие диаметров и внешнего вида колоний, полученных при двух температурах на среде АГВ). Эти признаки проявляются при 37 °С, но не при 22-28 °С. Для вирулентных (pYV+) иерсинии характерен также признак сорбции красителей - конго красного, кристаллического фиолетового, что обуславливает формирование возбудителем окрашенных колоний на соответствующих средах (CR-MOX, Серова) (Heesmann et al., 1983; Lachica and Zink, 1984; Skurnik et al., 1984; Heesmann and Gruter, 1987; Kapperud et al., 1987; Paerregaard et al., 1991; Ruckdeschel, 1996).

Биохимические характеристики в большинстве случаев также лучше выявляются при 26-28 °С, нежели, чем при 37 °С. Группа *Y. enterocolitica* гетерогенна по биохимическим, антигенным, патогенным и, по-видимому, экологическим характеристикам.

Из биохимических свойств, присущих возбудителю иерсиниоза, выделяют: способность ферментировать сахарозу и сорбит при отсутствии ферментации салицина, эскулина, лактозы, рафинозы, L-фукозы и D-арабитола.

Установлено, что все патогенные для человека варианты иерсинии (в т.ч. возбудители иерсиниоза), независимо от содержания плазмиды вирулентности (pYV), не обладают пиразинамидазной активностью. Для других иерсиний характерно наличие пиразинкарбоксиамидазы.

Патогенность

Патогенный потенциал возбудителя иерсиниоза определяется адгезивностью, колонизационными свойствами, инвазивностью, способностью противостоять защитным реакциям хозяина, цитотоксичностью и энтеротоксигенностью. Гены, контролирующие патогенные свойства возбудителя, находятся

в составе хромосомы и плазмиды рYV. Плазмидные детерминанты кодируют:

- а) феномен кальцийзависимого роста;
- б) синтез ряда белков наружной мембраны и секретируемых, которые обеспечивают адгезию (фибриллы), устойчивость к фагоцитозу и бактерицидному действию сыворотки крови, цитотоксичность.

Хромосомные детерминанты кодируют:

- а) синтез белков наружной мембраны (103 КД, 17 КД), обеспечивающих инвазию (внутриклеточное проникновение возбудителя) и устойчивость к действию сыворотки крови;
- б) продукцию энтеротоксина (сходного по функции и антигенной структуре с холерогеном и токсином ЭТКП);
- в) у «американских» штаммов – синтез сидерофоров (низкомолекулярных соединений, обеспечивающих снабжение возбудителя ионами железа) (Portnoy et al., 1981; Portnoy et al., 1984; Heesemann et al., 1986; Michelis et al., 1990; Cornelis, 1998; Cheng and Schneewind, 1999; Tardy et al., 1999).

Возбудитель иерсиниоза является факультативно-внутриклеточным паразитом. У человека иерсиниоз проявляется в различных формах. При этом доминирует энтероколит, сопровождающийся кашице водянистыми испражнениями, частично с примесью слизи и крови.

Часто встречается форма течения заболевания как псевдоаппендицит (мезентеральный лимфаденит). В 6 % случаев исследования человеческого аппендикса обнаруживается *Y. enterocolitica*. Значительней, чем острая фаза, при этой инфекции является фаза осложнений, при которой могут возникать артриты, заболевания кожи и даже смертельно протекающий сепсис (Х. Наттерман, 1987).

Иерсиниозом болеют и сельскохозяйственные животные. Как отмечает S. Christensen (1980), обсемененность свиней в различных хозяйствах значительно колеблется – от 6 до 49 %. менее инфицированы свиньи на небольших фермах. Эти животные бывают не только носителями иерсиний, у них регистрируют и кли-

нически выраженное заболевание, проявляющееся диареей или генерализацией инфекции, оканчивающейся гибелью животного. Лабораторные животные (взрослые мыши, кролики, морские свинки) малочувствительны к возбудителю иерсиниоза, поэтому патогенные свойства (вирулентность) штаммов рекомендуют изучать на специально разработанных экспериментальных моделях (на культурах ткани, мышцах-сосунках, конъюнктивальной пробе на морских свинках, энтеральной пробе на крольчатах и др.). У человека патогенез иерсиниоза варьирует в зависимости от характера и выраженности патогенного потенциала возбудителя, а также от восприимчивости макроорганизма. Попадая через рот (с инфицированной пищей или водой), возбудитель проявляет адгезивные свойства к эпителию тонкого кишечника, колонизирует его нижние отделы; выделяемый энтеротоксин способствует развитию симптомов энтероколита; иерсинии поражают также лимфоидный аппарат кишечника - внедряются в пейеровы бляшки с инициацией незавершенного фагоцитоза (в профессиональных и непрофессиональных фагоцитах), с током лимфы попадают в мезентериальные лимфоузлы, что нередко сопровождается развитием мезаденита или абсцессов; довольно часто, особенно у ослабленных лиц, отмечается диссеминация возбудителя с формированием очагов инфекции в различных органах и тканях, что сопровождается соответствующей внекишечной симптоматикой. Заболевание имеет тенденцию к осложненному (артриты, узловатая эритема и др.) и рецидивирующему течению, связанному с нередкими инфекционно-аллергическими реакциями и длительной персистенцией возбудителя в организме (Bissett et al., 1990; Bucci et al., 1991; Kontiainen et al., 1994; Munk Petersen et al., 1996; Stolk-Engelaar and Hoogkamp-Korstanje, 1996; Maki-Ikola et al., 1997; Bottone, 1999; Anonymous, 2000).

Бактериологические методы идентификации иерсиний

В условиях возрастающего интереса к проблеме заболеваемости людей и животных кишечным иерсиниозом особенно важное значение приобретают вопросы идентификации и дифференци-

ации возбудителей этой мало изученной инфекции. Анализ результатов типирования иерсиний позволяет дать объективную оценку их роли в этиологии заболеваний человека (Смирнов И. В., Ценева Г. Я., 1992).

Материалом для бактериологического исследования служат пробы фекалий (свежие порции или ректальные смывы), мочи, молока (из каждой доли вымени после сдаивания первых порций), содержимое кишечника, лимфатические узлы, кусочки органов вынужденно убитых животных.

Идентификацию изучаемых культур осуществляют по показателям (определение рода бактерий и определение рода иерсиний).

Для облегчения работы по идентификации иерсинии рекомендуется использовать схему (рисунок 1).

Классическим способом доказательства этиологической роли того или иного бактериального агента и возникновении инфекционного заболевания является выделение и идентификация возбудителя (М. О. Биргер, 1982). В случае кишечных иерсиний идентификация облегчается их способностью расти при низких температурах и в присутствии некоторых химических агентов, вызывающих гибель или торможение роста других микроорганизмов (Ющенко Г. В., Дунаев В. И., 1980; Королук А. М., 1983). Однако, само по себе выделение культуры *Y. enterocolitica* от больного не свидетельствует однозначно о ее патогенетической роли, поскольку она может быть сопутствующей. Заключение о патогенетической роли может быть сделано только с учетом клинико-эпидемиологических данных и оценки вирулентности выделенной культуры.

К сожалению, бактериологический метод исследования далеко не всегда позволяет выделить и идентифицировать возбудителей иерсиниоза. Причинами могут быть поздние сроки исследования, проведение его на фоне антимикробной терапии, внутриклеточная локализация возбудителя и, соответственно, его низкая концентрация в посевном материале, как и в результате конкурентного влияния сопутствующей микрофлоры, отсутствие адекватных питательных сред для накопления и выделения чистых культур.

3.1.4. ПСЕВДОМОНОЗ И ПСЕВДОМОНАДЫ. БАКТЕРИЯ – *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

(Материал подготовлен по результатам исследовательской работы А. Г. Шестакова, Д. А. Васильева)

Псевдомоноз (синегнойная инфекция) – инфекционное заболевание, вызываемое *Pseudomonas aeruginosa*, наносящее экономический ущерб. Псевдомонозом болеют различные виды сельскохозяйственных животных, в том числе птиц, норок, рыб. Сельскохозяйственные животные – источники возбудителя псевдомоноза, пищевое сырье и продукты – факторы передачи человеку.

Развитие патологии при псевдомонозе животных очень разнообразно. У крупного рогатого скота псевдомоноз поражает, в первую очередь, репродуктивную систему. При этом, размеры экономического ущерба определяются эмбриональной смертностью, удлинением периода от отела до плодотворного зачатия, выбраковкой ценных в племенном отношении производителей и выбраковкой коров по причине мастита (Больных В. Т., 1987). При осеменении животных спермой, контаминированной синегнойной палочкой, установили, что у 30-40 % наступает нарушение репродуктивной функции и рождается нежизнеспособный молодняк. По их же данным из 928 аборт, зарегистрированных в ФРГ, 161 (17,3 %) произошли по причине псевдомоноза (Михайлов Н. Н., 1975). В период 1971-72 гг. было проведено 268 абортированных плодов коров, 121 пробу содержимого матки и 637 проб спермы быков. Синегнойная палочка была выделена из 0,7 % плода, 2,5 % содержимого матки и 5,0 % проб спермы. При этом выделенные штаммы синегнойной палочки всегда были патогенными (Кремлёв Е. П., 1974). Попадая со спермой в половые пути самок *P.aeruginosa* вызывает гибель гамет при осеменении, зигот или эмбрионов на разных стадиях эмбриогенеза, аборт и гибель новорожденных в первые дни жизни (Михайлов Н. Н., 1974). Некоторые авторы, считают

P.aeruginosa одним из основных возбудителей мастита, заболевание которым ведет к снижению молочной продуктивности, ухудшению качества молока, увеличению потребности в обслуживающем персонале, повышению себестоимости продукции (Heeschen W., 1985). При всех формах мастита (серозном, катаральном, гнойно-катаральном) у коров патогенную синегную палочку выделяли и другие учёные (Дзюбак А. П. и соавт., 1974). При изучении распространения псевдомонад на племенных станциях установлено, что оборудование станции было контаминировано бактериями *P.aeruginosa* в 66,6 % случаях, поверхность кожи животного в области крупа – 77,7 %, предметы ухода за животными – 66 - 70 %, неиспользованная подстилка 40 %, препуциальная слизь племенных быков – 57,2 %, сперма в 53,4 % случаев (Балашов Н. Г., Родина В. Н., 1971; Палий Г. К. и соавт., 1976). В ветеринарной практике отмечено, что микробные ассоциации псевдомонада с другими микроорганизмами встречаются очень часто в родовых путях животных. Проводя бактериологическое обследование абортированных плодов, содержимого матки и спермы быков, отметил, что патогенные штаммы псевдомонада часто обнаруживались в ассоциациях с бактериями кишечной группы, бактериями рода *Proteus*, с представителями кокковой и споровой микрофлоры (Кремлёв Е. П. 1974). Частые микробные ассоциации при патологии гениталий описывают авторы, исследуя из различных хозяйств 113 коров с клиническими и скрытыми формами эндометритов. Объектом изучения были патологические выделения и влагалищная слизь. При этом 98,2 % случаев (111 проб) были выделены различные виды условно-патогенных микробов, в том числе в 35 (31,5 %) случаях – в монокультуре и в 76 (68,5 %) случаях – в различных ассоциациях. Всего было выделено 186 штаммов гемолитических микроорганизмов. В наибольшем количестве (23,6 %) выделены стафилококки. Псевдомонад составлял 5,9 %. Псевдомонад в сочетании со стрептококками, стафилококками зачастую можно выделить из вымени коров, больных маститом (Казеев Р. В. и соавт., 1989).

Многие авторы полагают, что *P.aeruginosa* является нередко осложняющим, а в отдельных случаях и основным этиологическим фактором при заболевании у телят. Они указывают, что синегнойная палочка довольно часто выделяется из патологического материала павших от диспепсии и больных телят на животноводческих фермах Кубани (Шипицын А. Г., 1981). Значимость синегнойной палочки в патологии новорожденных телят отмечается также и в других работах (Корж Б. А. и соавт., 1990).

Псевдомонад приносит ощутимые убытки и в свиноводстве (Мороз И. Г., 1986). Характеризуя роль *P.aeruginosa* в патологии свиней, учёные замечают, что псевдомонад вызывает высокую смертность у поросят и заболевания половой системы у племенных хряков-производителей (Больных В. Т. и соавт., 1987), заболевания репродуктивной системы у свиноматок, маститы (Никогосян А. В., 1990), эндометриты, аборт, мертворождения, рождения слабого, гипотрофичного молодняка (Ралка И. П., 1998).

Псевдомонады выделяются также у овец (Sensacovic J. W. et al., 1974) и лошадей (Appleton A.K. et al., 1986).

Чувствительными к возбудителю синегнойной инфекции оказались и пушные звери. Наиболее подробно изучена роль псевдомонад как возбудителя псевдомонадоз норок. В России псевдомонадоз норок впервые был зарегистрирован на Сахалине в 1967 году, в результате которой погибло 5000 норок (Данилов Е. П., 1968). Данное заболевание широко распространено во многих странах с развитием звероводства (Янишевская М. Н., 1983; Jones L. F. et al., 1973). Взрослые лисы и песцы так же являются чувствительными к возбудителю синегнойной инфекции.

Псевдомонады регистрируют и среди птиц. Заболевание птицы наблюдается при скармливании инфицированных псевдомонада кормов (Африканов С. Г. и соавт., 1985). О роли псевдомонад в патологии птиц указывают ряд учёных (Африканов С. Г. и соавт., 1988; Радчук Н. А. и соавт., 1986). Они отмечают, что

среди птиц наиболее восприимчивы к псевдомонозу куриные эмбрионы и цыплята первых дней жизни. Так, куриные эмбрионы гибли при экспериментальном заражении их 5-ю миллионами микробных клеток по ХАО в первые сутки, а цыплята (2-5-дневного возраста) гибли на первые-третьи сутки с явлениями септицемии и токсикоза при внутрибрюшинном заражении в дозе 100-500 млн.м.к. Эти же авторы указывают, что вспышки псевдомоноза в птицеводствах сопровождаются большим отходом и браковкой переболевшей птицы, низкой выводимостью цыплят по причине значительной гибели эмбрионов в период инкубации яиц (Андреева Н. Л. и соавт., 2004; Кожин Ю. В., 2004).

Микробный пейзаж форели был представлен условно-патогенными бактериями аэромонадно-псевдомонадного комплекса, которых обнаруживали на коже и некоторых внутренних органах рыбы (желчный пузырь, печень, почки). Микрофлора сеголетков и годовиков карпа была представлена псевдомонадами и аэромонадами. Бактерии родов *Pseudomonas* и *Aeromonas* значительно преобладали в микробном пейзаже угря, их обнаруживали на коже, жабрах и всех внутренних органах рыбы. Кроме того, в ассоциации с доминирующими группами бактерий, в микрофлоре угря были встречены вибрионы и энтеробактерии, которые также относятся к возбудителям заболеваний рыб (Авдеева Е. В., 2006).

Вопрос о естественной среде обитания псевдомонад, обладающих громадным метаболическим потенциалом, сложен, нередко трудно определить, какая из сред обитания основная, дополнительная и (или) случайная. Принято считать, что псевдомонады часто выделяется из почвы, накопленная к настоящему времени информация недостаточна для отнесения ее к микроорганизмам, широко распространенным в почве. Еще более сложен вопрос о том, является ли этот вид псевдомонад свободноживущим, поскольку не исключена возможность ее заноса в почву с водой, из растений, а так же из кишечника животных и человека (Ramphai R. et al., 1985). Изучая контаминацию псевдомонадами объектов окружающей среды (1795 проб), ее присутствие было

обнаружено в подземной питьевой воде (16,3 % случаев), воде открытых водоемов (10,5%), пищевых продуктах (4,0 %), аптечном материале (1,3 %), смывах (0,9%), испражнениях людей (9,4 %) (Васильев М. П. и соавт., 1976; Джупина С. И., 2001). Установлено достаточно частое обнаружение псевдомонад в объектах окружающей среды (Влодавец В. В., 1986). Тот факт, что бактерии рода *Pseudomonas* давно существует на Земле и с течением времени не исчезают, подтверждают учёные, обнаружив их (по свойствам близким к *P.aeruginosa*) в ледниковой толще Антарктиды, возраст которой 2100-2500 лет (Сорокина Т. А., Абызов С. С., 1986). *P.aeruginosa* способна выживать в почве, воде, на различных объектах внешней среды, в организмах животных, человека, рыб, пчел, в кормах (Больных В. Т. и соавт., 1987; Исакова Х. И., 2010; Цинзерлинг В. Ф. и соавт., 1984) и вызывать инфекции у самых различных видов животных и растений (Кочергина-Никитская Е. В., 1987; Elsheikh E. S., 1985). Некоторые авторы считают, что резервуаром и промежуточными хозяевами псевдомонад могут быть растения, у которых отмечаются различные типы поражений: разрастание тканей (на стеблях фасоли), мягкую и сухую гниль, изменение цвета растительной ткани (картофель, морковь, лук) (Гвоздяк Р. И. и соавт., 1987). Физиологические свойства и огромный метаболический потенциал синегнойной палочки хорошо согласуются с причислением этой псевдомонады к свободноживущим видам микроорганизмов (Беляков В. Д., и соавт., 1990). Такое заключение опирается на способность этого вида синтезировать ряд вторичных метаболитов (синильную кислоту, пиоцины), подавляющих рост широкого круга микроорганизмов.

Получены интересные сведения о распространении *P.aeruginosa* в воде. В соответствии с общениями (Rhame F. S. et al., 1980), она часто выделяется в сточных водах, в речной воде (Алтон Л. В., 1983; Ali Luzan A., 1982; Bartell P. F. et al., 1968; Habez H. M. et al., 1987; Dholakia P. M. et al., 1985; Piddock L. J. V. et al., 1985). Стоки боев содержат значительные количества микроорганизмов этого вида.

В целом считается, что псевдомонады чаще выявляются в почве богатой органическими соединениями, из водных источников теплых климатических регионов. В регионах с холодным климатом псевдомонады не является нормальным обитателем поверхностных вод, поступает в них из кишечника животных и человека.

Исходя из того, что в открытых водоемах, не сообщаящихся со сточными водами, этот микроорганизм не выявляется, а обнаруживается только во время купального сезона, человек и животные контаминируют водные источники, являясь основным резервуаром микроорганизма (Kandas I., 1981).

При исследовании 606-ти проб воды открытых водоемов и сточных вод выявили значительное загрязнение водной среды *P.aeruginosa* от 23 до, 100 % проб речной воды и 100 % проб сточных вод. В связи с такими результатами, авторы предлагают внести выделение псевдомонады в схему комплексного санитарно-биологического анализа воды, как санитарно-гигиенического критерия ее чистоты (Алешня В. В. и соавт. 1982).

При изучении экологических условий циркуляции *P.aeruginosa* во внешней среде и в связи с возросшей ролью данного вида в патологии людей, учёные выделяли 30 культур синегнойной палочки из воды, 31 культуру из почвы, 101 культуру из фекалий сельскохозяйственных животных и 14 культур от больных людей. Причем, культуры, выделенные от людей и животных, отмечались наличием многих факторов патогенности и полирезистентность к антибиотикам (Литовченко П. П., Чернобровый Н. П., 1981). Благодаря широкому и не всегда оправданному применению антибиотиков в условиях стационаров наблюдается селекция вирулентных, высокорезистентных штаммов *P.aeruginosa* (Дзюбак С. Т., 1984).

Усиление роли *P.aeruginosa*, как возбудителя спорадических, эпидемических заболеваний и тяжелых инфекционных осложнений у людей (Адаме М., 1961; Акатова Н. С. и соавт., 1975; Беляков В. Д. и соавт., 1990; Борисова О. К., и соавт., 1983; Бродинова Н. С. и соавт., 1990; Саакян Н. Н. и соавт., 1986; Кали-

на Г. П., 1985; Литовченко П. П. и соавт., 1981; Колкер И. И. и соавт., 1977; Сорокина Т. А., Абызов С. С., 1986; Clements J. A., 1962). Как уже было отмечено ранее, псевдомонады настолько широко распространены, что неудивительно и большое значение ее в патогенезе многих заболеваний человека и животных. Однако, надо отметить. Что зачастую клиническое проявление заболевания и длительность его могут варьировать в широких пределах. Причиной этого, как правило, являются ассоциативные формы болезни, возникающие в результате одновременного воздействия на организм нескольких видов условно-патогенных микроорганизмов.

Послеубойное обсеменение тушек птицы происходит в ходе технологического процесса убоя и обработки. Микрофлора поверхности тушек представлена главным образом аэробными бесспорными палочками из родов *Pseudomonas* (до 70...75 %) (Колончин К. В. и соавт., 2010; Смирнов А. М. 2006). Для более полного удаления микроорганизмов применяют комбинированную обработку молока, сочетая бактофугирование с пастеризацией. При этом из молока удаляют до 99,9 % бактерий. До переработки молоко должно храниться в охлажденном состоянии при температуре до 2-4 для создания условий, замедляющих развитие в нем микроорганизмов. При температуре 2-4 развитие большинства микроорганизмов в молоке приостанавливается, однако могут размножаться психрофильные бактерии рода *Pseudomonas* и некоторые другие микроорганизмы. Содержание микроорганизмов (бактерии родов *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*) в свежесобранном тихоокеанском креветках составляет от $8,6 \times 10^2$ до $1,3 \times 10^6$ КОЕ/г. Более 70 % микрофлоры замороженных креветок составляют грамположительные бактерии родов *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Microbacterium*, *Corynebacterium*, а также грамотрицательные микроорганизмы – родов *Flavobacterium*, *Cytophaga*, *Pseudomonas* и др. В охлажденных омары преобладают бактерии родов *Pseudomonas*, *Acinetobacter*. Условно-патогенные и токсигенные микроорганизмы обнаруживаются редко, а если выявляются, то

в очень малых количествах (Нечаев А. Ю., 1995). В мясе и соке охлажденных льдом устриц и мидий содержится большое количество мезофильных микроорганизмов. В процессе хранения количество мезофильных микроорганизмов снижается, а психрофильных увеличивается. В микрофлоре охлажденных устриц и мидий преобладают *Lactobacillus* и *Pseudomonas*.

Псевдомонады были выделены из сырой мороженой свинины, говяжьего мяса, фляжного молока, из готовых блюд на предприятиях общественного питания и из других пищевых продуктов (Ali Luzan A., 1982). При исследовании 60 образцов *Fast food* и традиционной блюда, из *Mathabib* и салат были выделены *P. aeruginosa*. Появление *P. aeruginosa* при температурах (20,30,40 °C) от традиционных продуктов питания из разных ресторанов, а при 10 °C и 50 °C не были выделены. Из *Fast Food* были выделены при 10, 20, 30, 40 °C, а при 50 °C не были (Saadia M., Hassanein Easa, 2010). При исследовании 300 проб мяса из говядины (n=100), курицы (n=100), chevron (n=100) были выделены 6 (2 %) культур *P. aeruginosa* из говядины (Iroha I. R. et al.,2011).

Описаны вспышки пищевых токсикоинфекций псевдомонадной этиологии и обнаружение *Ps. aeruginosa* в пищевых продуктах, особенно богатых белками (мясо, рыба), что характеризует последние как возможный источник пищевой токсикоинфекции. Острые кишечные инфекции псевдомонадной этиологии клинически протекают в виде диарей той или иной тяжести, особенно тяжело у детей, пожилых людей и больных хроническими заболеваниями, а при пищевых токсикоинфекциях – со всеми признаками этиопатогенеза этого типа заболеваний (Huang Meizi. et al.,2003, Shen Ying. et al.,2010, He Lanxiang, et al.,2012).

P. aeruginosa вызывает порчу белковых пищевых продуктов (в первую очередь мясомолочных) (Стефанов, 1997). Псевдомонады характеризуются высокой протеолитической и липолитической активностью, способны сбраживать углеводы с образованием кислот, продуцировать слизь. Развитие и биохимическая активность этих бактерий затормаживаются при pH ниже 5,5 и при 5 – 6 %-ной концентрации поваренной соли. Псевдомонады

являются антагонистами многих бактерий и плесеней, т.к. вырабатывают антибиотические вещества. В установленном температурно-влажностном режиме хранения в охлажденном мясе активно размножаются и становятся преобладающими неспорообразующие грамотрицательные палочки родов *Pseudomonas*. Наиболее активно размножаются те штаммы бактерии рода *Pseudomonas*, которые обладают антагонистическими свойствами в отношении других микроорганизмов. Через несколько недель бактерии рода *Pseudomonas* составляют 90% микрофлоры охлажденного мяса. Эти бактерии выделяют активные ферменты, расщепляющие белки и жиры, а также вырабатывают слизь. Они являются возбудителями гниения охлажденного мяса, которое хранится сверх допустимого срока (Лузина Н. И., 2004; Ashok Kumar et al., 2011). Бактерии рода *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* *P. fluorescens*,) гидролизуют составные части яйца с образованием специфических продуктов гниения, благодаря которым белок становится зеленым. При развитии бактерий *Proteus vulgaris* и некоторых представителей рода *Pseudomonas* появляется черная гниль. Содержимое яйца разжижается и становится коричневого или черного цвета. Образовавшиеся газы часто разрывают скорлупу, а содержимое выливается на соседние яйца и загрязняет их.

На фоне псевдомонады могут возникнуть вторичные бактериальные инфекции, которые сыграют важную роль в развитии необратимых процессов. Может быть и наоборот, когда псевдомонада, попадая в организм, провоцирует заболевание. В связи с этим при диагностике возбудителя псевдомонады и изучении патогенеза болезни необходимо обращать внимание на наличие и роль микробных ассоциаций. Встречаемость псевдомонады среди других возбудителей инфекционных осложнений с годами увеличивается (с 3,4 % в 1965-1971 гг. до 11,2 % в 1968 г.). Причем 39-46 % штаммов были выделены из мочи, 28-39 % – из послеоперационных ран. Авторы отмечают, что в 60 % случаев штаммы псевдомонады встречаются в составе полимикробных ассоциаций и этому способствует тот факт, что с годами чувствительность псевдомонады к антибиотикам снижается. Так, по сравнению с

1985 годом она снизилась в отношении гентамицина с 80,4 до 65,3 %, тобрамицина – с 87,7 до 76,2 %, стрептомицина – с 73,9 до 52,0 %. В этиологии и патогенезе хронического заболевания легких и плевры у человека основная роль принадлежит энтеробактериям и *P.aeruginosa*. По их данным, в отмытой мокроте в трахеобронхеальном экссудате больных хроническим заболеванием легких и плевры в большинстве случаев содержится сложная ассоциация микробов, одним из сочленов которой являются *P.aeruginosa* ($54,9 \pm 6,9\%$) или энтеробактерии ($56,9 \pm 6,9\%$ – *E.coli*), *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *K. Pneumoniae* (Ахова А. В., 2011; Борисова О. К. и соавт., 1983).

Бактерии *Pseudomonas aeruginosa* при инфицировании восприимчивых видов реализуют факторы вирулентности, связанные с синтезом экзотоксинов (гемотоксин, лейкоцидин, цитотоксины) и эндотоксина липополисахаридной природы, что обуславливает многообразие клинических проявлений болезней, вызываемых данной группой бактерий. При бессимптомной персистенции псевдомонад в организме бактерионосителей может происходить контаминация пищевого сырья, что обуславливает социальную значимость профилактических мероприятий в начале «пищевой цепи» (в животноводстве, птицеводстве и перерабатывающей промышленности) (Gram et al., 2002; Huang Meizi. et al., 2003; Shen Ying. et al., 2010; Iroha I. R. et al., 2011; Dóra Márta, 2011; He Lanxiang, et al., 2012). При мониторинге и сборе информации распространенности возбудителей инфекционных болезней наблюдается статистически достоверная тенденция роста множественной лекарственной устойчивости бактерий (Кальницкая О. И., 2012; Панин А. Н., Куликовский А. В., 2014; Тарасова И. И. и соавт., 2014; Aiello D. et al., 2010; Vjarnsholt T., 2011; He Xianyu, 2014). Учитывая социальную и экономическую значимость проблемы к числу приоритетных задач относится изыскание антибактериальных препаратов, эффективность которых определяется экологической безопасностью и широким спектром действия, в том числе, по отношению к бактериям *P.aeruginosa* с множественной лекарственной

устойчивостью вследствие повышенного синтеза экзополисахаридов, формирующих биопленки, замедляющих диффузию антибактериальных препаратов (Чеботарь И. В. и соавт., 2012).

Рост штаммов *Ps. aeruginosa* на стандартных средах

Нами исследованы тинкториальные и культуральные свойства 4-х референс-штаммов *P. aeruginosa* для определения стабильности свойств и их обоснованного использования при составлении бактериологической схемы выделения и идентификации *P. aeruginosa* в объектах внешней среды, пищевом сырье и пищевых продуктах.

Все референс-штаммы *P. aeruginosa*, окрашенные по методу Грама, были представлены мелкими грамотрицательными палочками. Подвижность клеток *P. aeruginosa*, отмечали у всех референс-штаммов. Мы изучили характер роста колоний референс-штаммов *P. aeruginosa* на стандартных средах. Эти бактерии образовывали, в основном, плоские колонии, или мелкие выпуклые в центре, края ровные или бахромчатые, поверхность гладкая, а так же складчатая. Поскольку однотипных колоний не было, то использовать морфологию колоний как дифференциально-диагностический признак, по нашему мнению, не целесообразно. Далее мы провели изучение сравнительной характеристики пигментов у референс-штаммов бактерий *P. aeruginosa*. Образование пигментов бактериями *P. aeruginosa* рассматривается рядом авторов, как ключевой и видообразующий признак при внутриродовой дифференциации. В связи с этим мы попытались охарактеризовать пигменты, продуцируемые референс-штаммами *P. aeruginosa*, и установили вариабельность этого признака при росте *P. aeruginosa* на МПА. Основными пигментами референс-штаммов были пиоцианин и флюоресцеин (от бледно-желтого до зеленого), классического сине-зеленого оттенка не образовывалось. Наиболее интенсивная пигментация у штаммов *P. aeruginosa* проявлялась в течение 3-х суток после культивирования, и особенно сильно при аэрировании среды. В результате исследований мы пришли к выводу, что пигментообразование у

P. aeruginosa можно рассматривать как дифференциально-диагностический признак, но только как дополнительный, не определяющий. Морфология клеток при окраске по методу Грама и подвижность клеток *P. aeruginosa* были использованы нами в схеме выделения и идентификации псевдомонад в дальнейших исследованиях. Показана возможность усовершенствования или замены существующих стандартных сред в схемах выделения и идентификации бактерий *P. aeruginosa* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов.

Биохимические свойства и антибиотикочувствительность референс-штаммов *Pseudomonas aeruginosa*

Характеристика биохимических свойств референс-штаммов *P. aeruginosa* и определение их антибиотикочувствительности, позволили нам использовать полученные данные в подборе тестов бактериологической идентификации *P. aeruginosa* из внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов.

Из полученных данных мы сделали вывод, что окисление глюкозы является характерным признаком для всех штаммов. Следовательно, этот признак можно использовать для дифференциации *P. aeruginosa* от бактерий, защелачивающих глюкозу. Оксидазный и каталазный тесты были также положительны у всех референс-штаммов *P. aeruginosa*. Установлено, что эти штаммы имеют ферменты аргининдегидролазу, нитратредуктазу, способны утилизировать цитрат натрия и ацетат натрия.

Определили антибиотикочувствительность штаммов *P. aeruginosa* к гентамицину, амикацину, ампициллину, цефазолину, эритромицину, доксициклину, левомицитину, тетрациклину, фурадонину и фурагину. Отмечена устойчивость *P. aeruginosa* к нитрофурановым препаратам, что согласуется с данными литературы.

Конструирование накопительной среды для *Pseudomonas aeruginosa*

На основании анализа данных литературы для клеток *P. aeruginosa* в среде накопления в качестве источника углеро-

да и энергии был выбран сукцинат натрия, а предпочтительным источником азота – L-аргинин (Weyant, 1996; Покровский, 2002).

Соли KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , MgSO_4 , NaCl обеспечивают биохимические процессы и стабилизируют осмотическое давление в клетках *P. aeruginosa*. В качестве ингибитора посторонней микрофлоры в среде накопления, на основании антибиотикочувствительности был выбран фурадонин, в концентрации 150 мг/л. Все компоненты среды, кроме аргинина и фурадонина смешивали в 1 л. дистиллированной воды, автоклавировали при 1,1 атм 120 °С в течение 15 мин. Затем в остывшую до 45 °С вносили навески аргинина и фурадонина. Концентрации компонентов среды накопления подбирали экспериментально. Состав среды накопления: вода дистиллированная – 1000мл, сукцинат натрия – 20,0 г, KH_2PO_4 – 0,5 г, K_2HPO_4 – 1,5 г, MgSO_4 – 0,5 г, NaCl – 5,0 г, L-аргинин – 2,0 г, фурадонин – 150 мг. pH готовой среды накопления – 7,0. Для определения чувствительности среды накопления мы засекали штамм *P. aeruginosa* в концентрации 10 м.к./мл. Через 24 ч термостатирования при температуре 37 °С мы определяли количество живых клеток *P. aeruginosa* в среде накопления. Количество КОЕ на МПА составило 4196. Результаты свидетельствуют о высокой чувствительности среды. Фурадонин ингибирует широкий спектр ассоциантов. Рост *P. aeruginosa* происходит по всей высоте среды и характеризуется помутнением поверхностной пленкой, придонным ростом. Выраженность придонного роста зависит от концентрации клеток *P. aeruginosa*. Таким образом, была сконструирована и зарегистрирована среда накопления УГСХА-Р.а.1, для выделения *P. aeruginosa* в концентрации 10 м.к./мл.

Усовершенствование плотной селективной среды с цетримидом

По результатам анализа роста *P. aeruginosa* на плотных средах, из нескольких селективных агентов (ТТХ, ЦПХ, цетримид) наиболее оптимальным компонентом в составе плотной селективной среды, включенной в схему идентификации *P. aeruginosa*, был выбран цетримид. Концентрацию цетрими-

да подбирали экспериментально. Состав плотной селективной среды: вода дистиллированная – 1000 мл, МПБ – 20 г, агар микробиологический – 15 г, цетримид – 0,3 г. Способ приготовления: все компоненты смешивали в холодной воде, доводили до кипения и автоклавировали при 121 °С 20 минут. Цвет среды серо-желтый. Колонии штамма № 128 *P. aeruginosa* средние, круглые с волнистым краем, гладкие, слабо пигментированы. Пигмент бледно-зеленый. Специфичность селективной среды определялась сравнительным высевом чистых суточных культур бактерий *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* на селективную среду. Культивировали при 37 °С в течение 96 часов. Контролем жизнеспособности являлся посев указанных бактериальных культур на МПА и культивирование при 37 °С в течение 96 часов. Отмечено, что на селективной среде растут *P. aeruginosa*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*. По результатам наших опытов, более высокие концентрации цетримиды в среде угнетают рост *P. aeruginosa*. Эта модифицированная селективная среда использована как среда второго порядка в схеме выделения и идентификации *P. aeruginosa* и зарегистрирована как селективная среда УГСХА-Р.а.2.

Конструирование и подбор тестов бактериологической дифференциации *Pseudomonas aeruginosa*

Для целей бактериологической дифференциации псевдомонад были сконструированы следующие тесты: тест «А», тест «В», тест «С», тест «D». Тест «А» – основан на использовании ацетамида в качестве источника углерода в анаэробных условиях. Тест «А» содержит неорганические соли и ацетамид в качестве единственного источника углерода. Ацетамид (амид уксусной кислоты) дезаминируется бактериями, проявляющи-

ми ациламидазную активность. *P. aeruginosa* способна к восстановлению нитратов (денитрификация) до свободного азота, что можно использовать как полезный диагностический признак. Мы поставили перед собой задачу установить возможность использования ацетамида бактериями в *P. aeruginosa* в анаэробных условиях в присутствии нитрата калия. Для исследования способности к денитрификации и утилизации ацетамида в анаэробных условиях использовали тест А по прописи: вода дистиллированная – 1000 мл, ацетамид 10 г., KH_2PO_4 – 0,5 г, K_2HPO_4 – 1,5 г, MgSO_4 – 0,5 г, NaCl – 5,0 г, KNO_3 – 2 г., феноловый красный 0,012 г., агар-агар – 15 г. Все компоненты среды смешивали в 1000 мл дистиллированной воды и нагревали до полного растворения компонентов. После стерилизации в автоклаве при 1,1 атм. пробирки подвергали резкому охлаждению под струей холодной воды, с целью уменьшения в среде парциального давления кислорода. Часть исследуемой колонии с селективной среды захватывали бактериологической петлей и уколом вносили в нитратно-ацетамидную среду. Культивирование проводили в термостате при 37 °С 24 ч. Положительной реакцией считали изменение окраски среды с желтой на красную или малиновую, а также образование пузырьков N_2 в толще среды или разрывов среды.

Тест «В» – основан на отсутствии роста *P. aeruginosa* на агаре с 2г/л хлорида бария. Мы поставили перед собой задачу изучить возможность применения МПА с добавлением хлорида бария, в схеме идентификации бактерий *P. aeruginosa*. Для решения поставленной задачи необходимо было изучить рост штаммов бактерий *P. aeruginosa* на вышеупомянутой среде тест «В». В МПА, добавляли хлорид бария из расчета 2 г/л. Среду стерилизовали в автоклаве при 1,1 атм 121 °С. Суточную бульонную культуру *P. aeruginosa* штрихом засевали на поверхность скося и помещали в термостат на 24 ч при температуре 37 °С. Через указанное время проводили учет результатов. Рост ингибировался у всех штаммов *P. aeruginosa*.

Тест «С» основан на окислении глюкозы в аэробных условиях с использованием модифицированной нами среды Хью-Лейфсона. Этот тест использован в бактериологической схеме для дифференциации *P. aeruginosa* от бактерий не способных к окислению глюкозы, либо защелачивающих ее (например *Alcaligenes faecalis*). Предложенный нами состав теста «С»: вода дистиллированная 1000 мл, агар-агар 20 г., D-глюкоза 10 г., пептон 2 г., хлорид натрия 5 г., сульфат магния 0,5 г., гидрофосфат калия 1,39 г., дигидрофосфат калия 0,73 г., бромтимоловый голубой 0,03 г. Все компоненты среды смешивали и нагревали до полного растворения, кроме глюкозы. Глюкозу добавляли в последний момент, среда разливалась по пробиркам и автоклавировалась при 0,5 атм. 20 мин. Пробирки остужали для формирования скола. Посев производят бактериологической петлей на поверхность косяка. Положительной реакцией считается изменение цвета индикатора с зеленого на желтый на поверхности скола.

Для целей идентификации *P. aeruginosa* мы включили тест «D», основанный на разжижении желатина. В рамках исследований, связанных с разработкой тестов идентификации бактерий *P. aeruginosa*, мы изучили протеолитическую активность выделенных штаммов бактерий *P. aeruginosa*. Тест «D» содержал МПБ, с добавлением 150 г/л сухого желатина. Расплавленную среду автоклавировали при 0,5 атм., в течение 15 мин и разливали в пробирки по 5 мл. Штаммы бактерий *P. aeruginosa* уколом засевали в столбик желатина и помещали в термостат при 37 °C на 24 ч. Параллельно ставили контрольные не засеянные пробирки. После извлечения засеянных пробирок с желатином и контроля из термостата, все пробирки помещали в холодильник с температурой +6 °C на 15 мин. Спустя указанное время проводили учет результатов. Среда с желатином в засеянных пробирках оставалась жидкой, в то время как контрольная не засеянная среда застывала столбиком. Протеолиз желатина наблюдался у всех штаммов бактерий *P. aeruginosa*.

**Усовершенствование бактериологической схемы
выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa*
из объектов внешней среды, пищевого сырья
и пищевых продуктов**

При усовершенствовании бактериологической схемы нами были выбраны следующие свойства *P. aeruginosa*: отношение *P. aeruginosa* к окраске по Граму, наличие у *P. aeruginosa* ферментов цитохромоксидазы, каталазы, аргининдегидролазы, желатиназы, способность к окислению глюкозы в аэробных условиях, способность к утилизации ацетамида, денитрификация, чувствительность к хлориду бария, чувствительность к специфическому бактериофагу. Усовершенствованная схема выделения и идентификации бактерий *P. aeruginosa* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов представлена на рисунке 2.

Таким образом, предложенная схема выделения и идентификации *P. aeruginosa* в объектах внешней среды, пищевом сырье и пищевых продуктах позволяет выделять и идентифицировать бактерии до вида, исключая возможных ассоциантов.

С использованием разработанной схемы из сточных вод города Ульяновска, проб молочных продуктов, проб мяса с рынков города Ульяновска, без органолептических признаков порчи, нами было выделено 35 штаммов из которых 4 штамма не образовывали пигменты. Беспигментные «полевые» штаммы *P. aeruginosa* № Д888, № 17, № 91, № 5 лизировались диагностическим биопрепаратом специфического бактериофага и давали характерные реакции на разработанных нами тестах.

3.1.5. АЭРОМОНОЗ И АЭРОМОНАДЫ. БАКТЕРИИ - *AEROMONAS HYDROPHILA*

(Материал подготовлен по результатам исследовательской работы Т. И. Канаевой, Д. А. Васильева)

Бактерии рода *Aeromonas* были идентифицированы еще в конце XIX века, но длительное время их считали сапрофитами, циркулирующими в воде открытых водоемов. Аэромонады широко распространены в окружающей среде: их выделяют из речной и морской воды, сточных вод, почвы, от гидробионтов (рыб, кальмаров, крабов, креветок и т.п.) (Khadori N., Fainstein V. 1988). Так, *Aeromonas salmonicida* является возбудителем фурункулеза (аэромоноза) лососевых, который был впервые описан Эммерихом и Вайбелем еще в 1894 году в Германии. В. Шеперклаус (1930) в качестве возбудителя аэромоноза (инфекционной водянки) карпов описал бактерию *Achromobacter punctatum* (*Aeromonas punctata*). Бактерии рода *Aeromonas* выделяют из растений и теплокровных животных (Khadori N., Fainstein V. 1988). Известны случаи контаминации данным микроорганизмом овощей поступающих в розничную продажу (Isay Saad Susana Marta, Iaria Sebastiao Timo, Furianetto Sirdeia M. Perrone. 1995). Доказана восприимчивость домашних и диких птиц к *Aeromonas hydrophila* (Shane S. M.; Gifford D. H. – 1985). Аэромонады обнаруживаются и в молочных продуктах. В большом количестве микроорганизмы вида *Aeromonas hydrophila* встречаются в сыром, необработанном молоке, а также в пастеризованных сливках, особенно при недостаточном охлаждении, при этом вызывая органолептические изменения у указанных продуктов запаха и вкуса (рыбный запах) (Г. Кильвайн - 1979). Есть данные о контаминации куриных яиц бактерией *Aeromonas hydrophila* (G. C. Jacobs, M. A. Nicholl et al. 2003).

Внимание медицинских работников эти бактерии привлекли лишь во второй половине 70-х начале - 80-х годах, когда была выявлена их энтеротоксигенная активность (Adams D.,

Atkinson H., Woods W., 1982). Поэтому в 1986 году во время работы 14-го Международного конгресса микробиологов в Манчестере было проведено специальное рабочее совещание по проблеме аэромонадной инфекции. Данные бактерии признаны факультативными патогенами не только для людей с ослабленным иммунитетом, но и как потенциально способные вызывать гастроэнтериты у здоровых людей (Н. А. Чайка, О. И. Семенова – 1987). В мае, 1988, бактерии рода *Aeromonas*, стали подлежать регистрации в Калифорнии, это был первый штат США, в котором начали диагностировать острые пищевые инфекции, вызванные *Aeromonas hydrophila*. С 1 мая 1988 г. до 30 апреля 1989 г. клиницисты и клинические лаборатории в Калифорнии сообщили о 225 изолятов микроорганизмов рода *Aeromonas*, выделенных от 219 пациентов (Megraud F. 1986).

У здоровых людей заражение аэромонадами происходит непосредственно при контактах с объектами окружающей среды или опосредованно через мясные, рыбные, молочные продукты, а так же продукты растительного происхождения (Bercoff E., Esperou H., Pariente E. et al., 1985).

Считается, что контаминация пищевых продуктов бактериями *Aeromonas* может быть:

- первичная, т.е. прижизненное проникновение возбудителя в органы и ткани животных, являющихся продуцентами продуктов питания;
- вторичная, т.е. контаминация пищевых продуктов в процессе их получения, переработки, транспортировки, хранения и реализации (Rahim Z., 1986).

За счет первичной контаминации может происходить бактериальное обсеменение таких продуктов, как мясо, молоко, яйца, а также рыба и другие гидробионты. Вторичной контаминации подвержены все без исключения продукты питания на любой стадии их продвижения от места получения до потребителя. При этом фактором передачи возбудителей аэромонадной инфекции являются выделения животных, в т.ч. птиц и грызунов, почва или вода открытых водоемов. Не исключено попадание микро-

организмов в мясопродукты из кишечника сельскохозяйственных животных при нарушении правил их убоя и разделки туш. Контаминация продуктов питания аэромонадами возможна от людей (больных, носителей). Наконец, вторичная контаминация продуктов питания не исключается посредством членистоногих (мух, тараканов) (Boillard J., Droumaguet Y., Floch Th. et al., 1984). У детей такая инфекция возникала на фоне искусственного вскармливания или длительного лечения антибиотиками при соматических заболеваниях (Беляков В. Д., 1990).

Аэромонады обычно выделяют при спорадических случаях острых кишечных заболеваний, однако описаны и вспышки, во время которых эти микроорганизмы рассматривали как возможный этиологический фактор групповых диарейных заболеваний (Bhat P., Shanthakumari S., Rajan D., 1974).

В эпидемиологии аэромонадных гастроэнтеритов, которые в разных странах составляют от 2 % до 10 % в структуре острых кишечных заболеваний бактериальной природы, определенную роль помимо больных людей и инфицированных продуктов питания или объектов внешней среды могут играть бессимптомные бактерионосители и реконвалесценты. Это следует учитывать при выявлении источников инфекций и определении факторов передачи возбудителей (Blatz D., 1979).

Инфицирующая доза бактерий вида *A. hydrophilia* для людей неизвестна. С одной стороны, при проведении экспериментов на добровольцах при приеме внутрь даже очень больших (до 10^{11}) количеств бактерий этого вида заражение не наступало, что, казалось бы, свидетельствует об очень высокой инфицирующей дозе. С другой стороны, известны случаи, когда гастроэнтеритом заболевали дайверы, случайно глотнувшие во время погружения совершенно незначительное количество морской воды, т.е. инфицирующая доза в этом случае была наоборот очень мала. Объясняются такие парадоксы тем, что о механизме патогенности *A. hydrophilia* известно достаточно мало, поэтому остается предположить, что не все штаммы этого вида бактерий патогенны для человека, либо для заражения необходимо совпа-

дение нескольких факторов. В любом случае опасность заражения более велика для детей до 7 лет и для людей с ослабленным иммунитетом (Brauer C., Scheftel J. et al., 1985).

Burgos A. с соавт. (1991) в своих исследованиях доказали, что процент микробоносительства наиболее высок среди лиц в возрасте до 13 и свыше 40 лет. У мужчин возбудитель обнаруживается в 1,5 раз чаще, чем у женщин.

Аэромонады обнаруживают во внешней среде, а также у больных людей и животных повсеместно, хотя в южных широтах их выделяют значительно чаще. *A. hydrophila* являются возбудителями острых кишечных заболеваний в странах Африки и юго-восточной Азии, где эти бактерии выделяют от 3-50 % больных с диарейным синдромом. Аэромонадные гастроэнтериты зарегистрированы также в ЮАР, Австралии и многих странах Европы: Италии, Франции, Нидерландах и т.д. Сезонный рост числа заболеваний, вызванных аэромонадами, наблюдается обычно летом. В это же время увеличивается частота обнаружения аэромонад и в пресной или морской воде, что дает основание считать воду одним из факторов передачи возбудителей (Altwegg M, 1986).

Misra S. и Sarkar S. (1990) установили существование сезонных различий в количественном содержании бактерий *A. hydrophila* в воде и планктоне. В донных же отложениях они регистрировались на высоких уровнях в течение всего года. Авторами выявлено наличие прямой корреляционной связи между количествами микробов *A. hydrophila* и общими уровнями сапрофитов. Распространение изучаемых микроорганизмов находилось в прямой зависимости от наличия в воде органических веществ и в обратной от концентраций растворенного кислорода, а мутность воды была прямо пропорциональна их количественному содержанию в донных отложениях. Venkateswaran Kasthuri и Nakano Hiroyuki (1991) показали, что распределение бактерий *A. hydrophila* в воде зависит в значительной степени от содержания пищевых субстратов (азотных солей и органических веществ).

Исследования проведенные на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской ГСХА по изучению распространения бактерий *A. hydrophila* и выявлению сезонных различий в количественном содержании данных микроорганизмов в воде открытых водоемов подтвердили эти данные. Были исследованы 189 проб воды открытых водоемов Ульяновской области (128 проб озёрной воды и 60 проб речной воды). Из озёрной воды данный микроорганизм выделяли в 9,1 % исследуемых проб. Из речной воды – в 2,7 % проб. По нашим данным, наибольшее количество выделяемых бактерий приходится на период мая-августа. Из 42 случаев выделения бактерий *A. hydrophila* из воды открытых водоемов показатели сезонности по месяцам распределяются следующим образом: январь – 0, февраль – 0, март – 2, апрель – 2, май – 5, июнь – 10, июль – 12, август – 9, сентябрь – 2, октябрь-декабрь - 0. Данная закономерность практически соответствует общепринятой тенденции сезонности в количественном содержании бактерий *A. hydrophila* в воде.

Аэромонады могут иметь существенное значение в этиологии диарейных заболеваний не только в прибрежных странах с жарким и влажным климатом, но и в достаточно умеренных широтах. В частности, по данным «Public Health Laboratory Service» (Лондон), в Великобритании только за 1985-1986 гг. было зарегистрировано 690 больных, у которых острые кишечные заболевания были обусловлены аэромонадами. При этом необходимо отметить, что в 1986 г. число больных по сравнению с 1985 г. увеличилось более чем в 1,4 раза - соответственно было зарегистрировано 405 и 285 случаев аэромонадной инфекции (Rahim Z., Aziz K., 1986). Как и во многих других странах, в Великобритании отмечается отчетливая летне-осенняя сезонность аэромонадных гастроэнтеритов (Agger W., McCormic J., Gurwith J., 1985).

Рост сапрозоонозов, регистрирующийся повсеместно в последние годы, связывают с народно-хозяйственной деятельностью. В частности, для заболеваний, передающихся водным путем, имеет значение загрязнение рек стоками промышлен-

ных предприятий. Высказывается опасение о возможном росте инфекции, вызываемой аэромонадами у рыб как следствие эвтрофикации водных бассейнов (Osborne J. A., Fensch G. E., Charba J. F. - 1989). Экспериментальные исследования, проведенные Н. П. Погореловой и др. (1999) показали, что выживаемость аэромонад в образцах воды, взятых в зонах расположения крупных предприятий, на 4 - 5 недели превышает по сроку выживаемость этих бактерий из проб воды, взятых вдали от предприятий. Следовательно, *A. hydrophila* обладают экологической пластичностью, необходимой для сапрофитов.

Гетерогенность аэромонадных популяций есть следствие, как модификационной изменчивости, так и процесса адаптации микроорганизмов к условиям среды обитания (Бухарин О. В., Гриценко В. А., 2000).

Развитие инфекционного процесса и патогенез при аэромонозе

Существующая с начала 80-х годов в России классификация пищевых отравлений в настоящее время является весьма спорной (Бухарин О. В., Гриценко В. А., 2000). В основу классификации были положены этиологический и патогенетический принципы (Штенберг А. И., 1991). Главным образом, спорные положения, коснулись группы пищевых отравлений микробной природы. В период создания классификации и в последующие годы детально изучались патогенные свойства микроорганизмов. Установлено, что условно-патогенные микроорганизмы обладают широким спектром факторов патогенности, занимая промежуточное место между непатогенными и патогенными микроорганизмами (Калина Г. П., Харитонов Н. С., 1982; Хмелевская Г. В. с соавт., 1990).

Сейчас признано, то что мы считаем условно-патогенными микроорганизмами, наряду со склонностью к сапрофитному образу жизни, способны к образованию экзо- и эндотоксинов, и при поступлении в организм одномоментно в определённых заражающих дозах вызывают заболевания, не передающиеся

непосредственно от восприимчивой особи к другой восприимчивой особи. Они попадают в макроорганизм другим путём – алиментарным. Поэтому к этиологическим факторам пищевых отравлений микробной природы отнесены микроорганизмы, которые на период создания классификации пищевых отравлений, соответствовали понятию условно-патогенных микроорганизмов а также другие малоизученные к тому времени бактерии (цитробактеры, гафнии, клебсиеллы, иерсинии, аэромонады) (Калина Г. П., Харитонов Н. С., 1982). Таким образом, бактерии *A. hydrophila*, по существующей классификации, относятся к группе бактерий вызывающих пищевые отравления, но не обладающих контагиозностью, хотя на данный момент известно, что аэромонады, как и некоторые другие отнесенные к этой категории микроорганизмы (эшерихии, клебсиеллы, иерсинии, псевдомонады, вибрионы и некоторые другие) способны вызывать острые кишечные инфекции (Ванханен В. Д., Денисов К. А., 1991). В связи с этим в ряде публикаций высказывались мнения о том, что включение в состав классификации пищевых отравлений указанных выше микроорганизмов «противоречит современной эпидемиологии» (Карплюк И. А., Смолянский Б. Л., 1990).

Однако, для практической медицины категория «пищевые токсикоинфекции» продолжает сохранять актуальность вследствие специфики лечебных и профилактических мероприятий, эмпирически доказавших свою целесообразность и эффективность. Во многих учебных, научных и официальных изданиях фактически нивелированы различия между пищевыми отравлениями микробной природы и острыми кишечными инфекциями с алиментарным фактором передачи (Карплюк И. А., Смолянский Б. Л., 1990).

Деление микроорганизмов, вызывающих пищевые отравления и острые кишечные инфекции, на патогенные и непатогенные было предложено считать относительным (Бондаренко В. М., 1999). Таким образом, возникла ситуация, при которой аэромонады одновременно можно отнести к патогенным, услов-

но-патогенным и непатогенным микроорганизмам. Это внесло определенные разногласия среди гигиенистов, эпидемиологов и клиницистов (Высоцкий В. В., Котлярова Г. А., 1999).

Дифференцированный подход к определению уровня вирулентности отдельных штаммов *A. hydrophila* позволяет объяснить, почему бактерии данного вида микроорганизмов оказались представленными в отчетной документации зарубежных авторов, как возбудители инфекционных заболеваний или пищевых отравлений, в то время как в нашей стране они выступают чаще как непатогенные для человека санитарно-показательные микроорганизмы (Бухарин О. В., Гриценко В. А., 2000).

Существуют два пути заражения бактерией *A. hydrophila*: алиментарный и контактный.

При попадании в пищеварительный тракт, *A. hydrophila* вызывает гастроэнтеритические симптомы. В патогенезе острых кишечных заболеваний, обусловленных аэромонадами, существенное значение имеет их токсигенная активность (образование цитотоксина, гемолизина и энтеротоксина), энтероинвазивная способность (способность преодолевать защитные приспособления организма и размножаться в нем) и наличие у многих штаммов факторов колонизации (адгезии) (Nishikawa Y., 1991). Ведущую роль в патогенезе пищевых отравлений аэромонадной природы отводят энтеротоксикозу (Козярин И. П., Слободкин В. И., 2002).

Местом действия токсинов чаще всего являются желудок и проксимальный (верхний) отдел тонкого кишечника, что клинически проявляется в виде острого гастрита либо гастроэнтерита, сопровождающихся интоксикацией и обезвоживанием организма. Заболевание характеризуется короткой инкубацией (в среднем 4-6 часов) и кратковременным течением (до 1-2 суток) без выраженных морфологических изменений в кишечнике (Постовит В., 1994; Козярин И. П., Слободкин В. И., 2002).

При острых кишечных инфекциях вызванных вирулентными штаммами *A. hydrophila*, возбудитель в организме не разрушается, а, наоборот, обеспечив взаимодействие с эпителием кишечника

(адгезию) и преодолев иммунозащитные барьеры организма хозяина, начинает интенсивное размножение на поверхности (колонизация) или внутри (инвазия) эпителиоцитов, что сказывается на продлении инкубационного периода до 3-5 суток. Наибольшему патологическому воздействию подвергаются дистальные отделы тонкого кишечника и толстый кишечник, что клинически проявляется развитием симптомов острого энтероколита. В этом случае заболевания характеризуются более продолжительным течением (свыше 5-7 суток) и выраженными морфологическими изменениями в кишечнике (Бондаренко В. М., 1999).

Способность к инвазии осуществляется целым арсеналом средств –поверхностными структурами, защищающими от фагоцитоза (капсулы, поверхностные антигены), разнообразными продуктами бактериальной клетки ферментной природы (факторы распространения), а также особенностями метаболизма бактерий *A. hydrophila*, обуславливающими их способность выживать в изменяющейся среде *in vivo* (Петровская В. Г., 1967).

Различные штаммы *A. hydrophila* отличаются по степени выражения свойств и признаков, определяющих их вирулентность. Попытаемся кратко представить материалы, характеризующие множественность факторов, участвующих в формировании вирулентности у штаммов аэромонад.

Основные патогенные свойства данных микроорганизмов определяются экзотоксинами белковой природы (энтеротоксин и цитотоксин).

К настоящему времени изучены физико-химические свойства термолабильного энтеротоксина аэромонад.

Энтеротоксин. J. D. Campbell с соавт. обнаружили энтеротоксин, серологически родственный холерному, его действием на эпителий слизистой оболочки тонкой кишки и обусловлена потеря жидкости организмом (т.е. данный токсин вызывает водяной понос за счет активации внутриклеточных ферментов, приводящих к секреции жидкости в просвет кишки). Энтеротоксин относительно термостабилен и не теряет своей активности после 10-20 мин прогрева при 56 °С, однако прогрев в течение 20 мин при

60-65 °С или же 15 мин при 80 °С приводит к полной его инактивации (Ljungh A. et al., '1977; Annapurna E., Sanyal S. C., 1977). При изоэлектрическом фокусировании на колонке с амфоляйнами энтеротоксин формирует пик с рI 5,2 (Wadstrom T. et al., 1976).

Цитотоксин (дермонекротизин). Некоторые штаммы *A. hydrophila* синтезируют особый цитотоксин белковой природы с рI 3,5, вызывающий дермонекротическую реакцию в коже и слизистых оболочках, и оказывающий цитопатогенное действие на культуру диплоидных фибробластов. Фактор этот термолабилен и после 10-минутного прогрева при 56 °С полностью инактивируется (Wadstrom T. et al., 1976). Способность аэромонад, патогенных для человека, вырабатывать энтеротоксин и цитотоксин не зависит от источника выделения: по данным D. V. Singh с соавт. (1992), 65 % изолятов из окружающей среды обладали энтеротоксигенными свойствами, а культуры, выделенные из клинического материала, характеризовались этим свойством в 55 % случаев.

Продукция токсинов бактериями рода *Aeromonas* зависит от температурных условий культивирования. Так при температуре хранения пищи в холодильнике (4 °С) цитотоксин, энтеротоксин и гемолизин вырабатывается только бактериями вида *A. hydrophila*, а бактериями вида *Aeromonas sobria* - нет. При более высоких температурах токсины синтезируются обоими видами, причем, *A. hydrophila* – более интенсивно (Krovacek K., Faris A., - 1991). По данным P. J. Gosling и F. Megraund (Elbashir A., Millership S - 1980), энтеротоксигенность и вирулентность штаммов аэромонад ассоциирована с некоторыми биохимическими свойствами, такими как положительная реакция Фогес-Проскауера, образование газа из глюкозы, ферментация маннозы, окисление глюконата и отсутствие бета-лактозидазы.

Для *A. hydrophila* один признак – способность продуцировать токсин – не определяет полностью патогенности микроба, хотя токсин и является основным фактором, ответственным за характерную клиническую картину заболевания и за гибель макроорганизма в соответствующих случаях.

В настоящее время, очевидно, что вирулентность штаммов бактерий определяется также особенностями структуры клеточной поверхности (Roberts I. S., 1996). В последние годы у аэромонад удалось обнаружить эндотоксин (О-антиген, входящий в состав ригидной клеточной стенки) липополисахаридной природы (Asao T., Kozaki S. et. al., 1986) и капсульный антиген (Y. L. Zhang et al, 2003). Эндотоксины обладают широким спектром биологической активности и способны оказывать токсическое действие на организм животных и человека. Капсула – также является одним из факторов вирулентности штаммов *A. hydrophila*. Она обладает выраженной антифагоцитарной активностью (Moxon E. R. и Kroll J. S., 1990).

Бактерии *A. hydrophila* образуют различные ферменты, расщепляющие высокомолекулярные соединения, входящие в состав тканей макроорганизма. К ним относятся, прежде всего, протеиназы, придающие вязкость межклеточному веществу за счет разрушения тканевых белков. Понижение вязкости окружающей среды, благоприятное для развития *A. hydrophila* в тканях, может осуществляться и ферментом, деполимеризующим дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) (выделяющуюся в среду при некрозе и гибели лейкоцитов в месте инфекции). Растворение сгустков фибрина, способствующее продвижению возбудителя в местном воспалительном очаге, осуществляется при посредстве фермента фибринолизина (Asao T., Kozaki S. et. al., 1986). Перечисленные ферменты, выделяемые бактериями *A. hydrophila*, могут быть отнесены в одну группу веществ, косвенно способствующих (путем изменения окружающей микроб среды) проявлению патогенных свойств возбудителя (Brubaker R., Surgalla M., 1965).

В другую группу можно объединить токсины и ферменты, выделяемые в среду и оказывающие или вернее участвующие в собственно патогенном действии микроба на макроорганизм. К ним относятся гемолизины (альфа-гемолизин с мол.м. 50*65 кД и бета-гемолизин, или «аэролизин», с мол.м. 49-53 кД), токсические вещества, вызывающие лизис клеток, в частности, эритроцитов, и лейкоцидины, поражающие лейкоциты (Wiese A., et. al., 1999).

Гемолизин и аэролизин. Способность к образованию гемолитических зон при росте на кровяном агаре весьма часто регистрируется у культур *A. hydrophila*. При культивировании *in vitro* некоторые штаммы *A. hydrophila* активно секретируют гемолизин в среду (Bernheimer A. W., Avigad L. S., 1974), в то время как у других штаммов он накапливается в виде связанного с клетками неактивного предшественника, а в жидкую фазу попадает лишь после аутолиза. А. W. Bernheimer предложил секретируемый гемолизин обозначать термином «аэролизин», а название «гемолизин» оставить за токсином, связанным с микробными клетками. Данные токсины способны к повреждению мембраны гликопротеинов и образованию пор. Гемолизин и аэролизин – термолабильные белки, теряющие активность после 20 мин прогрева при 50 °С.

Наряду с токсинами, непосредственно действующими на клетки и ткани организма, бактерии рода *Aeromonas* могут образовывать ферменты, не обладающие токсическим действием, но способные образовывать вещества, усиливающие общую интоксикацию организма. К ним относят уреазу и декарбоксилазу аминокислот (Qureshi N., et.al., 1988).

Все перечисленные факторы патогенности в естественных условиях действуют одновременно, в совокупности создавая патологический процесс при данной инфекции, каким бы значительным или незначительным не был эффект их взятых в отдельности.

Приведённые данные свидетельствуют, что микроорганизмы вида *A. hydrophila* продуцирует продукты различной природы, которые способны вызвать патологические процессы в тканях макроорганизма.

Патогенез развития болезни у млекопитающих на сегодняшний день представляется следующим:

В связи с раздражением слизистой оболочки нарушается всасывательная, секреторная, моторная функции желудочно-кишечного тракта. Возбуждается блуждающий нерв, что приводит к усилению моторики желудка, спазму и как следствие, желудочным болям. Возбуждается и рвотный центр, поэтому при

течении инфекции возможна рвота. В желудке накапливаются токсины, поддерживающие воспаление. Всасываясь в кровь, они вызывают интоксикацию организма (Burke V., Gracey M., Robinson J. et al., 1983).

У особей с ослабленным иммунитетом может развиваться септицемия и в этом случае инфекция приобретает угрожающий жизни характер, поражая мозг, кости, почки, глаза, мягкие ткани. В результате у пациентов с таким заражением может развиваться пневмония, менингит, остеомиелит, септический артрит, гангренозные поражения кожи и т.п. При повреждениях кожи бактерии *A. hydrophila* вызывают воспаление рыхлой клетчатки. Механизм развития ответной реакции организма на внутрикожное попадание микроорганизма следующий. При контактном пути заражения на чужеродный антиген реагируют иммунные клетки (нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги), которые мигрируют в очаг введения антигена (*Aeromonas hydrophila*) и уничтожают последний с помощью цитотоксичности, лизиса и фагоцитоза. Вот почему в течение 24-48 часов на месте проникновения микроорганизма возникает папула, морфологическим субстратом которой является лимфоцитарно-макрофагальный инфильтрат, который, по сути, является источником активации иммунной системы, повышая ее реактивность. В основном в результате иммунной атаки все бактериальные клетки (*Aeromonas hydrophila*), попавшие в кожу, бывают уничтожены (Stotle A., Brunner H. - 1992).

Но при ослабленном иммунитете попавшие через поврежденную кожу бактерии *A. hydrophila* вызывают острое диффузное воспаление кожи и/или подкожной клетчатки, сопровождающееся болью и повышением температуры тела, лимфангиитом и регионарной лимфаденопатией. Данному определению соответствуют разнообразные патологические процессы (импетиго, эризипеллоид, диабетическая стопа и др.) (Colwell R., McDonell M., DeLey J., 1986).

В целом, обобщая имеющийся литературный материал можно конкретизировать следующие показатели, что поражения желудочно-кишечного тракта, вызванные аэромонадами, протекают

с характерными симптомами – водянистая диарея, которая наблюдается практически у всех больных, и небольшое повышение температуры (50-75 % больных). Нередкие признаки – рвота и боли в области живота, отмечаемые в 30-60 % случаев. У части больных в фекалиях обнаруживают кровь и слизь. У большей части больных диарея прекращается через 1-2 дня, но в 10–15 % случаев заболевание продолжается 1,5-2 нед, а у отдельных больных и дольше (Baman S, 1980). Reina Jordi с соавт. (1993) считают, что более 12 % заболеваний вызванных бактерией *Aeromonas hydrophila* носят хронический характер.

Для эпидемиологического анализа аэромонадной инфекции разработана схема типирования возбудителей по соматическому 0-антигену (можно дифференцировать не менее 44 серогрупп) и жгутиковому Н-антигену (известно более 10 вариантов) (Brenden R., 1986). Esteve Consuelo с соавт. (1993) изучавшие состав поверхностных белков и липополисахаридов бактерий *Aeromonas hydrophila*, говорят о большом разнообразии поверхностных специфичных антигенов, что имеет большое значение для их распознавания.

Аргументирована возможность применения электрофореза белков аэромонад в полиакриламидном геле для изучения эпидемиологических особенностей аэромонадной инфекции на отдельных территориях и среди различных групп населения (Brook I et.al., 1985). В последние годы изучается возможность фаготипирования бактерий. Исследованиями Fukuyama Masafumi с соавт. (1992) дифференцированн 51 % выделенных ими штаммов *A. hydrophila* на 28 фаговаров.

Разработка бактериологического метода выделения и идентификации микроорганизмов *Aeromonas hydrophila* из пищевых продуктов

Длительное время аэромонады относили к семейству *Vibrionaceae*, в которое также входят вибрионы, фотобактерии, плесимонады. С помощью метода молекулярной гибридизации было показано, что *Aeromonas* даже с энтеробактериями име-

ют значительно больше сходства, чем с вибрионами. Поэтому предложено выделить аэромонады в самостоятельное семейство *Aeromonadaceae*. Типовой род семейства – *Aeromonas*, который включает виды: *hydrophila*, *cavia*, *salmonicida*, *sobria*, *media* и др. Виды аэромонад делятся на подвиды и биотипы (Canonica F., Pisano M., 1985).

Опираясь на данные Берджи (1998), приводим следующую классификацию бактерий рода *Aeromonas* (таблицы 6-7).

Род *Aeromonas* разделяют на две основные группы: подвижные аэромонады (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. cavia*) и неподвижные (*A. salmonicida*). Инфекцию у человека чаще вызывают подвижные аэромонады, наибольшее значение среди которых имеют *A. hydrophila*. Это можно объяснить тем, что бактерии, имеющие органы движения, более приспособлены к поиску компонентов, необходимых для конструктивных и энергетических целей, и обладают более высокими адаптационными возможностями в изменяющихся условиях. Способность к активной подвижности за счет жгутиков облегчает бактериям проникновение через мукозный гель и прикрепление к эпителиальным клеткам кишечника. Поэтому этиологическое значение в заболевании имеют только подвижные представители рода *Aeromonas*.

В нулевые годы появились сообщения о разделении вида *Aeromonas hydrophila* на следующие биовары:

A. hydrophila subsp. *dhakensis*;

A. hydrophila subsp. *hydrophila*;

A. hydrophila subsp. *ranae*;

A. hydrophila subsp. *anaerogenes*;

A. hydrophila subsp. *decolorationis*,

имеющих сходные биохимические характеристики, композицию ДНК и последовательность нуклеотидных образований. Но, несмотря на утверждения таксономистов, этот вопрос продолжает дискутироваться. Фенотипические свойства некоторых подвидов представлены в таблице 7 (Huys G. et al, 2003). *A. hydrophila* subsp. *hydrophila* и *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes* различают по

Таблица 6. Дифференциация подвижных видов рода *Aeromonas* по биохимическим признакам.

Признак	<i>A.hydrophila</i>	<i>A.caviae</i>	<i>A.eucrenophila</i>	<i>A.schubertii</i>	<i>A.sobria</i>	<i>A.veronii</i>
образование индола	+	+	+	-	+	+
Проба с метиловым красны	+	+	B	+	-	+
Реакция Фогеса-Проскауэ	+	-	-	-	B	+
Использование цитрата (среда Симмонса)	B	B	-	B	-	+
Образование H ₂ S	+	-	-	-	-	-
Гидролиз мочевины	-	-	-	-	-	-
Фенилаланиндезаминаза	-	-	B	B	+	(+)
Лизиндекарбоксилаза	B	-	-	+	+	+
Аргининдигидролаза	+	+	+	+	+	-
Орнитиндекарбоксилаза	-	-	-	-	-	+
Гидролиз желатины	+	+	+	+	+	(+)
Рост в присутствии KCN	+	+	+	-	-	B
Использование малоната	-	-	-	-	-	-
Образование кислоты из Д-глюкозы	+	+	+	+	+	+
Образование газа из Д-глюк	+	-	+	-	-	+
Образование кислоты из						
Адонитола	-	-	-	-	-	-
L-арабинозы	+	+	+	-	-	-
Д-арабитола	-	-	-	-	-	-
Целлобиозы	-	(+)	+	-	B	(+)
Дульцитол	-	-	-	-	-	-
Эритритол	-	-	-	-	-	-
Д-галактозы	+	+	+	+	+	+
Глицерол	+	B	+	B	B	+
Мио-инозитола	-	-	-	-	-	-
Лактозы	B	B	-	-	-	-
Мальтозы	+	+	+	+	+	+
Д-маннитола	+	+	+	-	B	+
Д-маннозы	(+)	B	+	+	+	+
Мелибиозы	-	-	-	-	-	-
В-метил-Д-глюкозида	B	-	-	-	B	(+)
Рафинозы	-	-	-	-	-	-
L-рамнозы	-	-	-	-	-	-
Салицина	+	+	+	-	-	+
Д-сорбитола	-	-	-	-	B	-
Сахарозы	+	+	B	-	B	+
Трегалозы	+	+	+	+	B	+
Д-ксилозы	-	-	-	-	-	-
Гидролиз эскулина	+	+	+	-	-	+
Мукат, кислота	-	-	-	-	-	-
Тартрат (среда Джорданса	-	-	-	-	-	+
Использование ацетета	B	B	B	B	B	(+)
Липаза (кукурузн масло)	B	+	-	+	-	+
ДНКаза	+	+	+	+	+	+
Восстановление нитрата	+	+	+	+	+	+
Оксидаза	+	+	+	+	+	+
Цитрат (среда Кристенсена	-	B	-	+	-	+
Просветление среды с тирозином	+	B	B	+	B	(+)

Таблица 7. Дифференциация неподвижных видов рода *Aeromonas* по биохимическим признакам.

Признак	<i>A. media</i>	<i>A. salmonicida</i>			
		<i>achromogenes</i>	<i>Masoucida</i>	<i>salmonicida</i>	<i>smithia</i>
образование индола	B	+	+	-	-
Проба с метиловым красны	+	+	+	+	-
Реакция Фогеса-Проскауэ	-	-	+	-	-
Использование цитрата (среда Симмонса)	B	-	-	-	-
Образование H ₂ S	-	-	+	-	+
Гидролиз мочевины	-	-	-	-	-
Фенилаланиндезаминаза	B	-	-	-	-
Лизиндекарбоксилаза	-	B	B	B	-
Аргининдигидролаза	+	+	+	+	(-)
Орнитиндекарбоксилаза	-	-	-	-	-
Гидролиз желатины	+	+	+	+	+
Рост в присутствии KCN	+	-	-	-	
Использование малоната	-	-	-	-	
Образование кислоты из Д-глюкозы	+	+	+	+	(+)
Образование газа из Д-глюк	-	-	+	+	(+)
Образование кислоты из					
Целлобиозы	+	-	-	-	-
Дульцитола	-	-	-	-	
Эритритола	-	-	-	-	
Д-галактозы	+	+	+	+	-
Глицерола	B	B	B	B	(-)
Мио-инозитола	-	-	-	-	-
Лактозы	B	-	-	-	-
Мальтозы	+	+	+	+	-
Д-маннитола	+	-	+	+	-
Д-маннозы	+	+	+	+	
Мелибиозы	-				
В-метил-Д-глюкозида	-				
Рафинозы	-	-	-	-	-
L-рамнозы	-	-	-	-	
Салицина	B	B	B	B	
Д-сорбитола	-	-	-	-	(-)
Сахарозы	+	+	+	-	B
Трегалозы	+	+	+	+	-
Д-ксилозы	-	-	-	-	-
Гидролиз эскулина	B	-	+	+	-
Мукат, кислота	-	-	-	-	
Тартрат (среда Джорданса	B	-	-	-	
Использование ацетета	B				
Липаза (кукурузн масло)	B	+	+	+	-
ДНКаза	+	+	+	+	+
Восстановление нитрата	+	+	+	+	
Оксидаза	+	+	+	+	+
Цитрат (среда Кристенсена	-	-	-	-	
Просветление среды с тирозином	B				

-0-10% штаммов положительные, (-) 11-25 % штаммов положительные, в -26-75 % штаммов положительные, (+) 76-89 % штаммов положительные, +90-100 % штаммов положительные

газообразованию при ферментации глюкозы (*A. hydrophila*) и по отсутствию такового у *A. anaerogenes* (А. И. Блинов, Н. А. Глушанова, 1997).

Из таблицы 8 видно, что биовары *Aeromonas hydrophila* различаются по некоторым биохимическим свойствам.

Биохимические свойства *Aeromonas*

Таблица 8. Дифференциация биоваров *Aeromonas hydrophila* по биохимическим свойствам.

	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>dhakensis</i>	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>hydrophila</i>	<i>A. hydrophila</i> subsp. <i>ranae</i>
Производство коричневого пигмента	-	-	-
Газ из глюкозы		+	+
Гидролиз эскулина	+	+	-
Гидролиз крахмала		+	
Образование индола	+	+	+
Лизиндекарбоксилаза	+	+	+
орнитиндекарбоксилаза	-	-	-
Аргининдигидролаза	+	+	+
L-арабиноза*	-	+	-
Арбутин*	+	+	+
Д-целлобиоза*	-	-	-
Лактоза *	+	+	+
Д-маннитол*	+	+	+
D-мелибиоза*	-	-	-
Д-сахароза*	+	+	-
Салицин *	+	+	-
L-арабиноза **	-	+	-
D-целлобиоза**	-	d-	-
Д-сахароза **	+	+	-
Салицин**	+	+	-
Пиразинамидаза		+	
Мочевина	+	-	+
Alpha-méthyl-D-mannoside*	-	+	-
Капрат *	+	-	-
Cis-аконитат *	+	-	-
DL-аспартат *	+	-	-
Изобутират *	+	+	-
L-фукоза *	-	+	-
L-глицин *	+	+	-

+ : 85 % положительных штаммов

- : 85 % отрицательных штаммов

* : Assimilation.

** : Acidification

Бактерии рода *Aeromonas* являются недостаточно изученными. Они обладают похожими свойствами по культуральным, морфологическим, биохимическим и другим свойствам. Поэтому дифференциация данных бактерий затруднительна.

Аэромонады (*Aeromonas*) – род изогнутых палочковидных, кокковидных или нитевидных аспорогенных монотрихальных хемоорганотрофных факультативно-анаэробных грамотрицательных эубактерий. Размеры 1-4х2-8 мкм. Г+Ц 53-63 мол. %. Растут при 20-30 °С, pH 7,0, на простых питательных средах. Некоторые виды способны расти на минеральных средах с источником углерода в виде глюкозы и аргинина. Добавление в среды 7,5 % натрия хлорида замедляет рост *Aeromonas*. Тип ферментации углеводов бродильный и дыхательный. Непостоянно с образованием кислоты ферментируют глюкозу, мальтозу, трегалозу, крахмал, глицерин, желатин, казеин, продуцируют ДНК-азу, оксидазу, каталазу, фосфатазу, выделяют аргининдегидрогеназу, редуцируют нитраты. Не ферментируют адонит, инозит, дульцит, ксилозу, мочевины. Не чувствительны к тетрациклинам, аминогликозидам, полимиксину.

Но в первую очередь, для идентификации, целесообразно применять следующие тесты, дифференцирующие бактерию *Aeromonas hydrophila*: морфология с окраской по Граму, OF-тест, т. е. тип расщепления глюкозы – окисление (О) или ферментация (F), определение ферментов в тестах на цитохромоксидазу и нитратредуктазу (редукция нитратов в нитриты).

На основании тестов, указанных в таблице 9, приведены характеристики рода *Aeromonas* и некоторых других микроорганизмов относящихся к разным семействам, однако присутствие которых в пробах материала и рост на питательных средах возможны (Голубева И. В. с соавт., 1985). Как видно, для *Aeromonas* характерными признаками являются палочковидная форма клеток, грамотрицательная окраска, расщепление глюкозы ферментацией, присутствие цитохромоксидазы и способность восстанавливать нитраты в нитриты.

Устойчивость

Имеются данные о том, что аэромонады, обладая психрофильными свойствами, способны сохраняться в контаминированных ими продуктах, таких как говядина, ростбиф, свинина и др., находящихся в бытовых холодильниках при 2 - 10 °С (Colaco S., 1982). Более того, температура +5 °С благоприятствует их размножению и продуцированию вирулентных факторов (Графова Т. И. - 1985). Порча продуктов питания обусловлена наличием у микроорганизмов рода *Aeromonas* экзоэнзимов (Aytac S. Aykut, Ozlas L Jesim - 1992). Однако уже при нагреве до 70 °С бактерии *Aeromonas hydrophila* гибнут через 10 мин. (Boxmie E. Rose and Anita J. G. Okaend - 1998). Jiang Yunsheng с соавт. (1999) изучили жизнеспособность *Aeromonas* в печени крабов, приготовленных разными способами. Установлено, что *Aeromonas hydrophila* гибнет при температуре 65 °С за 10 мин, а при 90 °С — за 1 мин. В винной продукции в первые 5 минут инактивируется до 50 % бактерий, и через 24 ч в данном субстрате сохраняется до 33 % аэромонад.

При изучении биологических свойств бактерий *Aeromonas hydrophila* мы определяли их температурную устойчивость.

Таблица 9. Дифференциация бактерий рода *Aeromonas* от некоторых других грамотрицательных микроорганизмов по морфологии, типу расщепления глюкозы, присутствию цитохромоксидазы и способности восстанавливать нитраты в нитриты.

Микроорганизмы	морфология	OF-тест	Цитохромоксидаза	Редукция нитратов
<i>Aeromonas</i>	Прямые палочки с закругленными концами, располагаются поодиночке, парами, цепочками, подвижные (монотрихи) или неподвижные	F	+	+
<i>Enterobacteria-ceae</i>	Небольшие полиморфные палочки, подвижные (перитрихи) или неподвижные	F	—	+
<i>Pseudomonas</i>	Прямые или изогнутые одиночные палочки, подвижные (моно- или лофотрихи), без капсул, часто образуют пигмент синего, зеленого, фиолетового и др. цвета	O	+	X
<i>Moraxella</i>	Однородные или полиморфные, короткие толстые палочки, часто кокковидные, неподвижные	—	+	X
<i>Alcaligenes</i>	Одиночные палочки, кокковые или кокковидные формы, подвижные (перетрихи)	—	+	X
<i>Acinetobacter</i>	Короткие толстые палочки или кокковидные формы, парно или цепочками, неподвижные	O, -	—	—

Примечание: O — окисление, F — ферментация, - отсутствие активности

В опыте были использованы 1 референс-штамм бактерии *Aeromonas hydrophila* и 12 штаммов выделенных нами из различных объектов окружающей среды и патологического материала, а так же пищевых продуктов. Рост бактерий проверяли на жидкой среде (мясо-пептонный бульон, МПБ) и плотной среде (триптико-соевый агар, TSA, Difco), при -4, +5, +30, +41, +45 °С., в течение от 1 до 4 суток. Наблюдали следующие результаты: рост бактерий *Aeromonas hydrophila* при -4 °С не наблюдался, но при высевании из пробирок с замороженными бульонными культурами на агар и инкубации чашек в термостате при оптимальной температуре (30 °С), наблюдался характерный рост бактерий *Aeromonas hydrophila*. При температуре +5 °С в пробирках наблюдали помутнение спустя 48 часов, в то время как на чашках, выросли мелкие колонии уже через 24 часа. Температура +30 °С является оптимальной для роста бактерий *Aeromonas hydrophila*, спустя 24 часа в пробирках наблюдается характерное помутнение, а на чашках с TSA рост округлых, с ровными краями, светло-бежевых колоний, до 3 мм в диаметре. Температура +41 °С считается уже не приемлемой для роста аэромонад, однако 10 из 12 выделенных нами штаммов росли при данной температуре как в пробирках с бульоном, так и на чашках с агаром. Референс-штамм также имел характерный рост на данных средах, спустя 24 часа. А вот при температуре +45 °С не наблюдалось ни помутнения в пробирках, ни роста колоний на чашках с TSA. Таким образом, мы выяснили, что выделенные нами штаммы имели характерный рост как при +5 °С, так и при +41 °С. Эти данные необходимо учитывать при дифференциальной диагностике бактерий *Aeromonas hydrophila*. Кроме того, результаты исследований позволяют применять нагревание до 41 °С как метод инактивации сопутствующей микрофлоры.

Исследование жизнеспособности бактерий *Aeromonas hydrophila* в образцах контаминированной рыбы при обработке ее в микроволновой печи показало, что «полной гибели микроорганизмов не наблюдается» (Щедрина Н. А., Карцев В. В., 2004). В связи с этим возникают определенные риски, связанные с ис-

пользованием микроволнового нагрева для приготовления пищи. Устойчивость аэромонад к колебаниям температуры от низкой к высокой доказывает их эвритермность и адаптационные возможности как возбудителей сапронозной инфекции. В связи с этим представляют интерес исследования В. Statner и др., показавшие, что у многих штаммов аэромонад, изолированных из окружающей среды, температура 37 °С является оптимальной для кинетики роста и белкового синтеза (Н. П. Погорелова, Л. А. Журавлева, Ф. Х. Ибрагимов, Г. В. Ющенко - 1999).

Продолжительность жизнедеятельности указанного микроорганизма в воде достигает 60 дней и зависит от содержания других бактерий; так в присутствии *P. aeruginosa* она значительно увеличивается (Warfaurton Donald W., McCormick John K., Bowen Bruce - 1994).

Бактерии *Aeromonas hydrophila* растут в пределах широкого диапазона pH среды 5,5 – 9,0, что объясняется наличием биопленок (Stagnaro Stella M., Chiale Carlos, Frade Horacio - 2000). Оптимальный рост также, как и оптимальная продукция экзотоксина и экзофермента наблюдается при слабощелочном начальном pH среды (Majeed K. N., MacRae I. C. - 1993).

Восприимчивость *Aeromonas hydrophila* к антибиотикам

Aeromonas hydrophila имеет высокую резистентность к антимикробным веществам. Исследования G. Castro-Escarpulli (2003) показали, что наибольшую резистентность штаммы *Aeromonas hydrophila* показывали к ампициллину, карбенициллину, цефалотину, клиндамицину, и пенициллину (98,9 %; 97,8 %; 95,9 %; 97,7 % и 100 % соответственно). Напротив, все штаммы были восприимчивы к амикацину, канамицину, ципрофлоксацину, неомицину и нитрофурантоину (G. Castro-Escarpulli et.al., 2003).

На кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской ГСХА мы провели исследования восприимчивости аэромонадных штаммов к антибиотикам методом диффузии в агар с применением дисков, которые содержали: кло-тримазол (КОТ), ципрофлоксацин (ЦИП), цефалотин (ЦФТ),

цефатоксим (ЦТК), мономицин (МОН), нистатин (НИС), линкомицин (ЛИН), цефазолин (ЦЗ), бензилпенициллин (ПЕН), доксициклин (ДОК), амикацин (АН), энрофлоксацин (ЭНР), кларитромицин (КТМ), цефалексин (ЦФЛ), цефтриаксон (ЦР), фурагин (ФГ), ванкомицин (ВА), оксациллин (ОКС), амфотерин В (АМ), тетрациклин (ТЕТ), эритромицин (ЭРИ), олеандомицин (ОЛЕ), ампициллин (АМП), фурадонин (ФД), офлоксацин (ОФ), гентамицин (ГЕН), левомецетин (ЛЕВ), стрептомицин (СТР). Наибольшую резистентность штаммы *Aeromonas hydrophila* показали к пенициллину и нистатину (1,8 % и 3,7 % чувствительных штаммов соответственно). Вопреки литературным данным, к ампициллину были резистентны только 70,1 % штаммов. Напротив 100 % восприимчивость аэромонадные штаммы показали к следующим антибиотикам: клотримазол (КОТ), ципрофлоксацин (ЦИП), цефалотин (ЦФТ), цефатоксим (ЦТК), мономицин (МОН), линкомицин (ЛИН), цефазолин (ЦЗ), доксициклин (ДОК), амикацин (АН), кларитромицин (КТМ), цефалексин (ЦФЛ), цефтриаксон (ЦР), фурагин (ФГ), ванкомицин (ВА), оксациллин (ОКС), амфотерин В (АМ), олеандомицин (ОЛЕ), фурадонин (ФД), офлоксацин (ОФ).

Бактериологическая схема выделения и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila*

Немаловажным является поиск методов ранней и надежной идентификации возбудителя инфекции в патологическом материале, пробах из объектов окружающей среды, пищевого сырья и пищевых продуктов, поскольку своевременная и правильная идентификация – один из решающих факторов успеха.

В настоящее время в России единственным нормативным документом по методам определения аэромонад в различных видах исследуемого материала являются Методические рекомендации «Методы исследований объектов окружающей среды и патологического материала на аэромонады», разработанные в Московском научно-исследовательском институте гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана в 1980 году. Пробы воды и их разведения

высевают по 0,5 мл в жидкую среду накопления, в состав которой входят: сульфат магния, K_2HPO_4 , желатин, крахмал (среда А-1). Через 24 ч инкубирования посевов в термостате при температуре 30°C производят пересев на плотную дифференциально-элективную среду, в состав которой кроме перечисленных компонентов (среда А-1) входят: водный раствор кристаллического фиолетового и трифенилтетрахлорид (среда А-2). Посевы на плотной элективной среде инкубируют в термостате при температуре 28-30 °С в течение 42-48 ч. Характеристика колоний аэромонад на плотной дифференциально-элективной среде (среда А-2): крупные с вишневым центром и узким бесцветным ободком. Однако использование предлагаемых дифференциально-селективных питательных сред А-1 и А-2 не позволяет достаточно квалифицированно проводить работу по выявлению аэромонад в пищевых продуктах. Среды А-1 и А-2 являются многокомпонентными, требуют дополнительных затрат на приобретение ряда дорогих химических реактивов и ингредиентов. Окончательная идентификация аэромонад требует постановки дополнительных тестов, что усложняет исследование и увеличивает продолжительность. Кроме того, в упомянутом документе отсутствуют какие-либо ссылки, касающиеся исследования на наличие аэромонад в пищевых продуктах.

Для выделения и идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila* разработано мало схем. Можно использовать следующие питательные жидкие среды: глюкозный бульон, среду Кесслера, бульон Хоттингера и др. К таким средам прибегают многие исследователи. Подкупает простота, отсутствие необходимости приготовления специальной среды и возможность использования среды для одновременного обнаружения и других микроорганизмов (Калина Г. П., 1988). Применение в качестве сред накопления неселективных традиционных сред с известной условностью может дать удовлетворительный результат лишь при исследовании «чистых» объектов с незначительным содержанием сопутствующей микрофлоры. Применение неселективных сред накопления при исследовании объектов даже с умерен-

ным уровнем биологического загрязнения не дает эффективного результата для выделения бактерий *Aeromonas hydrophila*.

Аэромонады хорошо растут на мясо-пептонном бульоне (МПБ) при 37 °С. По прошествии 24 ч мы наблюдали равномерное помутнение бульона с образованием серовато-серебристой поверхностной пленки и хлопьевидного белого осадка (Сидоров М. А., 1995). На мясо-пептонном агаре (МПА) данные бактерии образуют выпуклые, округлые, блестящие, полупрозрачные с беловато-желтым оттенком колонии. Однако при исследовании материала содержащего обильную смешанную микрофлору идентификация *Aeromonas hydrophila* на этих средах затруднена.

В качестве селективных агентов пользуются веществами различной химической природы. Перечень химических и биологических ингибиторов, предложенных для включения в плотные питательные среды, весьма обилен (Калина Г. Н., 1984). Теоретически все ингибиторы могут быть использованы также в жидких средах накопления. Из ингибиторов, которые были применены в жидких средах, следует упомянуть ампициллин, к которому *Aeromonas* обладает высокой устойчивостью, превосходящей устойчивость большинства микроорганизмов, составляющих *A. hydrophila* конкуренцию в объектах окружающей среды (G. Castro-Escarpulli et.al., 2003). Этот антибиотик добавляют в среды до 30 мг/л. Распространенными и давно применяющимися являются среды с ацетамидом и цетримидом (Вуль С. М., 1978). Эти вещества обладают умеренно выраженной активностью в отношении грамположительной кокковой микрофлоры. Действие ацетамида и цетримиды на некоторых представителей энтеробактерий, особенно родов цитробактер, клебсиелла и протей, гораздо слабее, в связи с чем на ацетамидных и цетримидных средах различных модификаций нередко вырастают не только аэромонады и псевдомонады (для которых и предназначены эти среды), но и другие грамотрицательные бактерии. Положительные результаты, полученные при использовании сред, селективных для *Pseudomonas aeruginosa*, позволяют рассчитывать, что и другие среды, предложенные для выделения псевдомонад,

могут быть использованы для выделения *Aeromonas hydrophila*, например среда Мак – Конки, содержащая относительно слабый ингибитор – желчные соли (Калина Г. Н., 1988).

В качестве жидкой среды накопления многие авторы (Boxmie E. Rose and Anita J. G. Okaend, 1998, L. Soler, F. Marco, 2003) предлагают использовать соевый бульон с добавлением 10 мг/мл ампициллина (TSBA). Исследуемый материал в пропорции 1:10 добавляют к TSBA и инкубируют при 28 °С в течение 18-24 часов. Эту же среду накопления рекомендует SURAJ B. BALODA (1995), который пишет об обнаружении аэромонад в питьевой воде.

Калина Г. П. упоминает о среде Козера (1988). К 1 л дистиллированной воды добавляют 1,5 г фосфата натрия-аммония, 1 г фосфата калия однозамещенного, 0,2 г сульфата магния, 2,5-3 г цитрата натрия. Раствор стерилизуют в автоклаве при 1 атм 15 мин, прибавляют к нему 10 мл 0,5 % спиртового раствора бромтимолового синего и разливают в стерильные пробирки, после чего добавляют 2 МЕ пенициллина на 1 мл исследуемой жидкости. Этот же автор предлагает использовать модифицированную среду Bonde, в которой заменяют пенициллин кристаллическим фиолетовым как более мягким ингибитором (Калина Г. Н., 1988).

Следует указать, что принцип использования ингибиторов в селективных средах имеет ряд недостатков: устойчивость *Aeromonas hydrophila* иногда лишь незначительно превышает устойчивость сопутствующей микрофлоры и может колебаться у отдельных штаммов в обширных пределах, как и у сопутствующей микрофлоры. Уровни устойчивости тех и других к ингибитору в ряде случаев настолько близки, что малейшие колебания в его концентрации делают среду ингибиторной для *Aeromonas hydrophila* или мало ингибиторной для сопутствующей микрофлоры.

Биологически обоснованными являются методы, предполагающие использование способности микроорганизма развиваться за счет простейших неорганических веществ, применяемых

для построения высокомолекулярных соединений, с добавлением единичных органических источников углерода. Составы минеральной питательной базы в разработках разных авторов разнообразны – от минимального состава, до больших наборов (Калина Г. Н., 1988). Такие среды были разработаны для выделения и накопления сальмонелл, клебсиелл, псевдомонад и других микроорганизмов. К сожалению, для выделения и накопления аэромонад рекомендации по использованию сред ограниченного минерального состава отсутствуют.

Мы предлагаем среду для накопления *Aeromonas hydrophila* (УГСХА – 1А.н.) следующего состава:

Вода дистиллированная – 1000 мл

Дрожжевой экстракт – 4,0 г

Мальтоза – 3,5 г

K_2HPO_4 – 2,0 г

$MgSO_4$ – 5,0 г

Желатин – 50,0 г

Конго-рот – 3,0 г

Кристаллический фиолетовый – 0,1 г

Способ приготовления:

Дрожжевой экстракт вносили в холодную воду 1000 мл, после чего ее нагревали. Затем последовательно добавили калий фосфорнокислый двузамещенный и магния сульфат, мальтозу, Конго-рот (в виде 0,3 % водного раствора) и кристаллический фиолетовый (в виде 0,01 % водного раствора). Кипятили 2-3 минуты, при постоянном помешивании. В бульон внести желатин и оставить для набухания на 1 час, затем подогреть в водяной бане при 40 – 50 °С до полного расплавления желатина. После этого горячую среду фильтровали через ватно-марлевый фильтр и разлили в стерильные пробирки по 5 мл. Стерилизовать при 110 °С 30 минут.

Питательной основой этой среды является дрожжевой экстракт и мальтоза (по 4,0 г и 3,5 г соответственно). Хорошей минеральной базой оптимального состава для *Aeromonas hydrophila* является набор солей фосфата калия двузамещенного (2,0 г)

и семиводного сульфата магния (5,0 г). Соли калия, магния и фосфора стимулируют синтез микробной клетки *Aeromonas hydrophila*, а для образования бактериальных белков необходимы анионы, содержащие серу. Для уплотнения среды, а также во избежание выпадения элективного агента в осадок и равномерного распространения его во всей среде добавляется желатин (5 %), кроме того желатин является растворимым белком. Бактерии *Aeromonas hydrophila* обладают протеолитической активностью и способны разжижать желатин, что можно использовать в качестве дифференциации. Красители выступают в качестве элективного агента.

После процедуры накопления и обогащения пересевают бактерии с жидких сред на плотные питательные среды, для изучения морфологических, культуральных, биохимических и антигенных свойств, по совокупности которых определяется видовая принадлежность исследуемого микроорганизма. Аэромонады хорошо культивируются на обычных питательных средах, на агаре Дригальского, Мак-Конки, Эндо (Сидоров М. А., 1995). Исхакова Х. И. предложила использовать среду Симмонса (Исхакова Х. И., 1979). Однако, эти среды имеют один существенный недостаток – слабая ингибирующая активность в отношении ряда энтеробактерий и дрожжеподобных грибов рода *Candida*.

В европейских странах и США, в качестве плотной питательной среды чаще всего применяется триптозо-кровяной агар (он упоминается практически во всех сообщениях связанных с выделением аэромонад). Пересевают культуру со среды накопления на триптозо-кровяной агар с добавлением 5 % дефибрированной крови. Через 24 ч инкубации при температуре 28 °C наблюдается рост круглых, серых колоний *Aeromonas hydrophila* с зоной гемолиза вокруг.

Еще одна среда, которая часто упоминается в зарубежной литературе – это триптико-соевый агар. В частности L. Soler et.al. (2003) использовали триптико-соевый агар (Difco) для выделения *Aeromonas spp.* В Японии ведется много исследований по обнаружению и генетическому анализу аэромонад, а для изуче-

ния чистой культуры так же применяется триптико-соевый агар (Y. L. Zhang et.al., 2003). На этой среде рост *Aeromonas hydrophila* наблюдается в виде круглых, полупрозрачных, небольших колоний (2-3 мм), беловато-желтого цвета.

Boxmie E. Rose and Anita J. G. Okaend (1998) считают, что можно использовать крахмально – ампициллиновый агар. Бактерии выращивают на чашках с МПА, содержащим 0,2 % растворимого крахмала и ампициллин. По прошествии двух суток заливают чашки раствором Люголя. Последний дает с крахмалом синее окрашивание, колонии *Aeromonas hydrophila* окружены прозрачными неокрашенными зонами.

В зарубежной литературе есть упоминания и о селективных плотных питательных средах: Luria agar (Alberto Casco et.al., 1996), Luria–Bertani Medium (Xuanxian Peng et.al., 2002), *Aeromonas* Agar Base (Boxmie E. Rose and Anita J. G. Okaend, 1998), агаризированная среда Rippey and Cabelli (Bernagozzi Marta et.al, 1994).

В последние годы на отечественном рынке появилась готовая сухая среда, производства «Хай Медиа» (Himedia Laboratories Limited, Индия). Среда основана на прописи Ryan. Она является модификацией среды XLD, широко применяемой для выделения протеев и других энтеробактерий, а также *Aeromonas spp.* и *Plesiomonas spp.* Добавление ампициллина повышает селективность среды.

Компания Merck KGaA предлагает основу m-*Aeromonas* Селективного агара (ADA-V) с ампицилином и ванкомицином, которая соответствует рекомендациям Агентства Соединенных Штатов по охране окружающей среды (USEPA) и описана в методе 1605 - метод мембранных фильтров для определения и учета *Aeromonas* в воде.

Сидоров М. А. с соавт. (1995) рекомендует для выделения *Aeromonas hydrophila* среду Шмитца – Шанделье следующего состава: к 100 мл 3 %-ного мясо-пептонного агара добавляют 10 мл 3 %-ного стерильного водного раствора краски конгорот, 5 мл 30 %-ного стерильного раствора сахарозы, 0,5 мл 4 %-ного

водного раствора гидроокиси натрия. Готовая среда прозрачная, рубиново-красного цвета, колонии *Aeromonas hydrophila* – черного. Но и эта среда имеет свои недостатки из-за дефицитности некоторых компонентов.

В рамках наших исследований мы изучали специфичность действия трёх селективных сред, А2, ТВА с ампициллином, среда Шмита-Шантелье. Специфичность определяли по спектру подавления роста ассоциантов (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*; *Proteus mirabilis*; *Citrobacter*; *Escherichia coli*; *Morganella morganii*; *Proteus vulgaris*; *Klebsiella pneumoinae*; *Enterobacter*; *Pasteurella multocida*; *Providencia rettgeri*; *Yersinia pseudotuberculosis*; *Yersinia enterocolitica*; *Listeria monocytogenes*; *Staphylococcus*). Посев производили из суточных культур бактерий, культивировали при 37 °С в течение 24 часов. Контроль производили на МПА. Контрольный посев культивировали при 37 °С в течение 24 часов. Результаты приведены в таблице 10.

Испытанные среды обладают специфичностью, но имеется возможность роста ассоциантов. Отсутствие ингибиторов в среде А2 позволяет выживать и расти на ней большинству бактерий из сопутствующей микрофлоры (*Pseudomonas*

Таблица 10. Специфичность существующих селективных сред. для *Aeromonas h.*

№	Вид бактерий	Среда А2	ТВА с ампициллином	Среда Шмита-Шантелье	Контроль МПА
1	2	3	4	5	6
1	<i>A. hydrophila</i> 01 реф.	+	+	+	+
2	<i>A. hydrophila</i> 02 реф.	+	-	+	+
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	+	+
4	<i>Pseudomonas putida</i>	+	-	+	+
5	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	+
6	<i>Staphylococcus</i>	-	-	-	+
7	<i>Citrobacter</i>	+	-	-	+
8	<i>Escherichia coli</i>	+	-	+	+
9	<i>Listeria monocytogenes</i>	-	-	-	+
10	<i>Morganella morganii</i>	-	-	-	+
11	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	+
12	<i>Klebsiella pneumoinae</i>	+	+	-	+
13	<i>Enterobacter</i>	+	+	-	+
14	<i>Pasteurella multocida</i>	-	-	-	+
15	<i>Providencia rettgeri</i>	+	-	-	+
16	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	+	+	-	+
17	<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	-	-	+

aeruginosa, *Pseudomonas putida*; *Citrobacter*; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; *Enterobacter*; *Providencia rettgeri*; *Yersinia pseudotuberculosis*; *Yersinia enterocolitica*). ТВА, хотя и содержит элективный агент, все же не обладает высокой специфичностью. Кроме того, ТВА с ампициллином пропускает антибиотикочувствительные и негемолитические штаммы. Отсюда следует, что селективные свойства испытанных сред недостаточны.

В лаборатории кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ Ульяновской ГСХА была разработана плотная селективная среда УГСХА – 2А.н. В универсальном варианте селективная среда должна удовлетворять следующим требованиям: обеспечивать рост 100 % штаммов конкретного вида микроорганизма, даже при наличии единичных клеток в пробе; полностью подавлять рост любых видов сопутствующей микрофлоры; не изменять видовые свойства исследуемого микроорганизма; быть простой в изготовлении и не содержать дефицитных или дорогостоящих компонентов (Рожавин М. А., Бугаева Е. И., 1986). Состав плотной селективной среды (прототипом которой послужила среда накопления УГСХА – 1А.н.), следующий:

Вода дистиллированная – 1000 мл

Агар-агар – 15 г

Дрожжевой экстракт – 4,0 г

Мальтоза – 3,5 г

K_2HPO_4 – 2,0 г

$MgSO_4$ – 5,0 г

Желатин – 50,0 г

Конго-рот – 3,0 г

Кристаллический фиолетовый – 0,1 г

Цвет среды красно-коричневый (рисунок 4).

Определение специфичности действия селективной среды является важнейшим из критериев для подобного рода сред. Была проведена серия экспериментов по определению специфичности. Брали суточные культуры *Aeromonas hydrophila*; *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*; *Proteus mirabilis*; *Staphylococcus*; *Citrobacter*; *Escherichia coli*; *Listeria*

monocytogenes; *Morganella morganii*; *Proteus vulgaris*; *Klebsiella pneumoniae*; *Enterobacter*; *Pasteurella multocida*; *Providencia rettgeri*; *Yersinia pseudotuberculosis*; *Yersinia enterocolitica*. Производили посев вышеуказанных бактерий на селективную среду УГСХА – 2А.н.. Культивировали посеvy при 37 °С 24 часа. Результаты определения специфичности приведены в таблице 11.

Результаты, приведенные в таблице 11, свидетельствуют, что на среде УГСХА – 2А.н., растут бактерии *Aeromonas hydrophila*, возможные ассоцианты не растут или имеют отличный рост колоний. Таким образом, плотная селективная среда обладает специфичностью.

Разработка среды для внутривидовой дифференциации *Aeromonas hydrophila*

Как уже упоминалось в нулевые годы появились сообщения о разделении вида *Aeromonas hydrophila* на следующие биовары: *A. hydrophila* subsp. *dhakensis*; *A. hydrophila* subsp. *hydrophila*; *A. hydrophila* subsp. *ranae*; *A. hydrophila* subsp. *anaerogenes*; *A. hydrophila* subsp. *decolorationis*, имеющих сходные биохимические характеристики, композицию ДНК и последовательность нуклеотидных образований (Huys G. et al, 2003).

Внутривидовую дифференциацию основывали на различие следующих ферментативных свойств: кислотообразование из L-арабинозы и D-сахарозы, гидролиз мочевины и образование газа. Для этих целей нами была разработана дифференциально-диагностическая среда следующего состава: МПБ – 1000 мл, L-арабиноза – 10 гр, D-сахароза – 1 гр, натрий хлорид – 5 гр, агар-агар – 20 гр, феноловый красный (0,2 % раствор в 50 % этиловом спирте) – 12 мл. Готовую среду разлили в пробирки по 6 мл и стерилизовали при 112 °С 30 мин. После чего скосили, оставив столбик высотой 2 см. Принцип действия данной среды основан на способности бактерий образовывать кислоту при расщеплении сахаров, что улавливается с помощью индикатора (фенолового красного), окрашивающего среду в желтый цвет. В среде сахароза имеется в малой концентрации (0,1 %). Поэ-

тому в аэробных условиях (в скошенной части агара) бактерии, ферментирующие только сахарозу, утилизируют ее полностью в первые часы роста. К моменту учета реакции (18-24 часа) для своего питания они используют уже пептоны, имеющиеся в среде в качестве белковой питательной основы. При этом в скошенной части происходит образование аммиака и подщелачивание среды (красный цвет). В столбике же желтый цвет сохраняется, так как, хотя сахароза также за этот срок ферментирована, кислые конечные продукты ее расщепления в анаэробных условиях еще сохраняются и поддерживают низкое значение pH. Получается желтый столбик и красный скос.

Штаммы бактерий, сбраживающие сахарозу и арабинозу, вызывают подкисление среды во всей пробирке (желтый столбик и скошенная часть). Арабиноза (1 %) входит в состав среды в концентрации, превышающей в 10 раз концентрацию сахарозы. Поэтому через 18-24 ч инкубации арабиноза еще не исчерпана и в скошенной части (в аэробных условиях), вследствие чего кислая реакция сохраняется как в столбике, так и в скошенной части агара. Однако позднее после 48 ч инкубации посева здесь также будет наблюдаться щелочение (покраснение скошенной части среды) за счет расщепления пептонов.

Если бактерии при ферментации углеводов как конечный продукт метаболизма образуют газ, появляются разрывы среды различных размеров или скопление газа на дне пробирки, приподнимающее весь столбик агара.

Данный метод внутривидовой диагностики позволяет сократить набор дифференциальных сред до минимума, к тому же он менее трудоемок и требует меньших затрат времени и посуды.

С помощью сконструированной нами среды осуществили внутривидовую дифференциацию выделенных штаммов. Два штамма выделенные из проб воды открытых водоемов Ульяновской области можно отнести к *A. hydrophila subsp. dhakensis*, еще 2 штамма – к *A. hydrophila subsp. anaerogenes*, все остальные выделенные нами штаммы являются биоварами *A. hydrophila subsp. hydrophila*. Исследование штаммов *A. hydrophila subsp.*

Таблица 11. Специфичность селективной среды. для *Aeromonas h.*

№	Вид бактерий	Рост на селективной среде
1	2	3
1	A.h. 01 <i>реф.</i>	+
2	A.h. 02 <i>реф.</i>	+
3	A.h. №37	+
4	A.h. №39	+
5	A.h. №43	+
6	A.h. №48	+
7	A.h. P4	+
8	A.h. P9	+
9	A.h. P8a	+
10	A.h. P8e	+
11	A.h. P10	+
12	A.h. P11	+
13	A.h. P12	+
14	A.h. P13a	+
15	A.h. P13b	+
16	A.h. P14	+
17	A.h. Oз	+
18	A.h. 1a	+
19	A.h. 4a	+
20	A.h. 5a	+
21	A.h. 11a	+
22	A.h. 13a	+
23	A.h. 2б	+
24	A.h. 1в	+
25	A.h. 3в	+
26	A.h. 1г	+
27	A.h. 2г	+
28	A.h. 5e	+
29	A.h. 6e	+
30	A.h. 5d	+
31	A.h. 7d	+
32	A.h. 8d	+
33	A.h. 9d	+
34	A.h. 10д	+
35	A.h. 11д	+
36	A.h. 1e	+
37	A.h. 5e	+
38	A.h. 6e	+
39	A.h. 7e	+
40	A.h. 1з	+
41	A.h. 2з	+
42	A.h. 3з	+
43	A.h. 5з	+
44	A.h. 6з	+
45	A.h. 8з	+
46	A.h. 10з	+
47	A.h. M1	+

№	Вид бактерий	Рост на селективной среде
48	A.h. M6	+
49	A.h. X	+
50	A.h. П1	+
51	A.h. П3	+
52	A.h. П4	+
53	A.h. П5	+
54	A.h. П9	+
55	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
56	<i>Pseudomonas putida</i>	-
57	<i>Proteus mirabilis</i>	-
58	<i>Staphylococcus</i>	-
59	<i>Citrobacter</i>	-
60	<i>Escherichia coli</i>	-
61	<i>Listeria monocytogenes</i>	-
62	<i>Morganella morganii</i>	-
63	<i>Proteus vulgaris</i>	-
64	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
65	<i>Enterobacter</i>	-
66	<i>Pasteurella multocida</i>	-
67	<i>Providencia rettgeri</i>	-
68	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-
69	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-

hydrophila на сероводород показало, что данный подвида можно разделить на две группы: образующие H_2S (14 штаммов) и не образующие H_2S (22 штамма).

Методы идентификации *Aeromonas hydrophila*

Анализ литературных источников и результаты собственных исследований позволили выявить следующие направления методов идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila*.

Фенотипическая идентификация

Проводится с помощью лабораторных бактериологических тестов идентификации. Для установления видовой принадлежности лучше всего использовать следующие тесты, которые наиболее полно характеризуют бактерию *Aeromonas hydrophila*: образование индола, проба с метиловым красным, реакция Фогеса-Проскауэра, образование H_2S , гидролиз мочевины, лизиндекарбоксилаза, аргининдигидролаза, орнитиндекарбоксилаза, образование газа из глюкозы, кислотообразование из глюкозы, L-арабинозы, мальтозы, D-маннитола, сахарозы, гидролиз эскулина.

Но в первую очередь, целесообразно применять следующие тесты по идентификации бактерий *Aeromonas hydrophila*: морфология с окраской по Граму, OF-тест, т. е. тип расщепления глюкозы – окисление (О) или ферментация (F), определение ферментов в тестах на цитохромоксидазу и нитратредуктазу (редукция нитратов в нитриты).

Определение типа расщепления глюкозы (OF-тест) проводят с помощью среды Хью – Лейфсона, содержащей: пептон 2 г, хлорид натрия 5 г, фосфат калия двузамещенный 0,3 г, глюкоза 10 г, бромтимоловый синий 0,03 г, агар-агар 3 г, дистиллированная вода 1000 мл. В этой среде в качестве углевода используется глюкоза, ферментация которой характерна для *Aeromonas*, хотя могут быть применены и другие углеводы. При ферментативном процессе исходное расщепление глюкозы происходит в анаэробных условиях первичным фосфорилированием до образования соединения глюкоза-6-фосфат. Окислительный процесс расщепления глюкозы в отличие от этого начинается не с фосфорилирования, а с прямого окисления карбоксильной группы с образованием глюконовой кислоты и протекает в присутствии атмосферного кислорода. Для постановки OF-теста испытуемую культуру засевают уколом в столбик среды в двух пробирках, в одну из которых затем поверх среды наслаивают стерильное вазелиновое масло. Посевы проводят маленькой петлей, не доводя ее до дна пробирки на 5-6 мм, инкубируют при 37 °С в течение 1-4 сут. Так как в среду в числе других компонентов входит агар в небольшой концентрации (что создает полужидкую консистенцию среды), при учете реакции могут быть определены также газообразование и подвижность. Изменение цвета среды в обеих пробирках на желтый свидетельствует о расщеплении глюкозы ферментацией (F), изменение аналогичного характера только в открытой пробирке (не залитой вазелиновым маслом) – об окислительном процессе (O).

Значимыми тестами, отличающими бактерии рода *Aeromonas* от ряда других бактериальных родов, являются также определение цитохромоксидазы и способности восстанавливать нитраты

в нитриты, свидетельствующей о присутствии у них нитратредуктазы.

Цитохромы – железосодержащие гемопротеиды, которые в завершающем этапе аэробного дыхания доставляют кислороду электроны (водород) с последующим образованием воды. Из числа цитохромов в составе некоторых грамотрицательных бактерий содержится цитохром С. Благодаря ферменту оксидазе, свойственной *Aeromonas*, происходит окисление цитохрома С, который способен использовать некоторые красители в качестве искусственных акцепторов водорода, обуславливая их переход в окрашенное состояние. Тест на оксидазу можно проводить по Эрлиху, для которого нужны 1% водный раствор диметил-пара-фенилендиамин и 1 % спиртовой раствор α -нафтола.

Вариант 1: на поверхность 18-24 ч агаровой культуры (колония или газон сплошного роста) в чашке Петри наносят 1 каплю 1 % раствора диметил-пара-фенилендиамина и сразу же добавляют 1 каплю 1 % спиртового раствора α -нафтола.

Вариант 2: на поверхность чистого предметного стекла наносят полную петлю микробной культуры, взятой со скошенного агара, в виде бляшки. С помощью пастеровской пипетки на бляшку наносят 1 каплю 1 % раствора диметил-пара-фенилендиамина, а на нее 1 каплю α -нафтола и наблюдают за реакцией.

Регистрация результатов осуществляется в течение 1-3 мин после нанесения реактивов. При положительной реакции отмечается ярко-синяя окраска микробной культуры в месте аппликации реактивов. При отрицательном результате микробная культура в местах нанесения реактивов не изменяет своей первоначальной серовато-беловатой окраски (Boxmie E. Rose and Anita J. G. Okaend, 1998). Этот метод называют классическим, он часто подвергался модификациям. Одной из них является широко применяемый за рубежом метод Ковача, предусматривающий использование одного реактива – 1 % водного раствора пара-тетраметилфенилендиамина, который наносят на культуру (несколько капель). При положительной реакции через 20-30 с появляется темно-красное окрашивание.

Микроорганизмы, обладающие редуктазой, способны извлекать кислород из нитратных соединений, например из нитрата калия (KNO_3), восстанавливая их в нитритные (KNO_2). В естественной среде обитания бактерии *Aeromonas hydrophila* этот процесс обычно протекает в анаэробных условиях. При этом могут быть восстановлены и другие продукты – аммоний, свободный азот, окись азота и гидрооксиламин. Для выявления редукционной активности микроорганизмов применяют тест, который выявляет нитриты. Для этого в питательную среду, содержащую нитрат калия, вносят одну петлю суточной агаровой культуры и инкубируют при 37 °С в течение 4 сут. Состав тест – реактивов следующий: (1) сульфониловая кислота – 8 г, уксусная кислота (5 % раствор) – 1000 мл. (2) а-нафтиламин – 5 г или диметил-а-нафтиламин – 6 г, уксусная кислота (5N раствор) – 1000 мл. Для выявления нитритов в пробирку с инкубированной средой добавляют по 1 мл тест – растворов (1) и (2). При положительной реакции через несколько минут появляется красное окрашивание, а при отрицательной – цвет среды не меняется (Голубева И. В. с соавт., 1985).

Обмен веществ всех организмов обуславливается деятельностью ферментов. Стабильность ферментативных систем бактерий позволяет использовать биохимические свойства бактерий в сочетании с их морфологическими, культуральными и другими постоянными признаками для определения видов и типов бактерий. Для обнаружения ферментов исследуемую культуру микробов засевают на специальные дифференциально-диагностические питательные среды.

Для определения образования индола используют среды, содержащие аминокислоту триптофан и служат питательной основой для размножения бактерий. Обладающие ферментом триптофаназой бактерии *Aeromonas hydrophila* расщепляют триптофан, образуя индол (орто-бензопиррол), пировиноградную кислоту и аммиак. При добавлении к 2-суточной бульонной культуре тест-реактива Эрлиха или Ковача (кислотно-спиртовой раствор пара-диметиламинобензальдегида) образовавшийся индол всту-

пает с ним в реакцию, давая розовое или красное окрашивание (реакция на индол положительная). Можно использовать индикаторные бумажки, помещая их под пробку над средой.

Реакции Фогеса – Проскауэра и с метиловым красным проводят для определения путей ферментации глюкозы с образованием ацетилметилкарбинола (ацетоин) и 2,3-бутиленгликоля. Для постановки этих реакций используют среду Кларка, в которой выращивают бактерии в течение 2-5 сут. После добавления 5-6 капель спиртового раствора метилового красного к 2 мл культуры реакция считается положительной при появлении ярко-красного окрашивания. Реакция Фогеса-Проскауэра основана на добавлении сначала а-нафтола, затем раствора КОН. При положительной реакции в верхней части среды появляется красное окрашивание.

Определить образование H_2S можно с помощью дифференциально-диагностических сред Клиглера, Олькеницкого, трехсахарного агара с солями железа и др. Индикаторные бумажки, пропитанные раствором ацетата свинца, как рекомендуют некоторые авторы, использовать нельзя, так как этот метод может приводить к ложноположительным результатам.

Для выявления фермента уреазы использовали те же среды с добавлением мочевины. Бактерии, обладающие ферментом уреазой, способны производить гидролиз мочевины, образуя в виде конечных продуктов аммиак и углекислоту, тем самым изменяя pH среды в щелочную сторону, что и показывает индикатор. Штаммы, не обладающие ферментом уреазой, цвет среды не изменяют (отрицательная реакция).

Аргининдигидролаза исследуется по методу Меллера на среде следующего состава (в г): пептон – 1, пиридоксин (витамин В₆) – 0,005, глюкоза – 0,5, бромкрезоловый пурпурный – 0,01, крезол-рот – 0,005, L-аргинин – 10, мясная вода – 5 мл, дистиллированная вода – 1 л. Пробирку с 3-5 мл этой среды засевают суточной агаровой культурой бактерий. Инкубируют при 28 °С на протяжении 7 суток. О разложении аргинина будет свидетельствовать появление в пробирке фиолетового окрашивания. Аналогичным

образом, только с использованием орнитина вместо аргинина исследуется наличие у бактерий орнитиндекарбоксилазы.

Для обнаружения сахаролитических ферментов исследуемую культуру бактерий засевают в питательные среды Гисса. Обычно это 5 пробирок: с глюкозой, лактозой, маннитом, мальтозой и сахарозой. При некоторых исследованиях для более углубленного изучения биохимических свойств микроорганизма ряд Гисса дополняют другими углеводами. Для бактерии *Aeromonas hydrophila* более точную идентификацию можно получить используя глюкозу, L-арабинозу, мальтозу, D-маннитол, сахарозу, а также инозит и ксилозу.

Дифференциацию от представителей родов *Vibrio*, *Plesiomonas* и *Photobacterium* осуществляют с помощью вибриостатика О/129 (2,4-диамино-6,7-диизопропилптеридина, подавляющего рост бактерий перечисленных родов, и не активного по отношению к *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Luciobacterium*). Но в последние годы появляется много сообщений о резистентности вибрионов к О/129. Существует и другой, ускоренный метод дифференциации бактерий рода *Vibrio* и *Aeromonas*, подразумевающий применение трихлоруксусной кислоты (ТХУ). В пробирку с 8 мл МПБ засевают исследуемую культуру, убирают в термостат, где подращивают культуру в течение 12 – 18 ч при 37 °С. Затем к содержимому в пробирке приливают 0,5 мл 20 % (по массе) раствора ТХУ перемешивают встряхиванием. В случае если в пробирке выращивались бактерии рода *Vibrio*, содержимое пробирок через 2 – 3 мин окрашивается в розовый цвет. Если в пробирке содержаться бактерии рода *Aeromonas* феномен окрашивания при добавлении ТХУ не наблюдается. Окрашивание проявляется за счет образования комплекса ТХУ со специфическими продуктами жизнедеятельности вибрионов (И. Т. Андрусенко, С. Г. Благороднов, Н. С. Благороднова, А. П. Шепелов, Е. А. Ведьмина, 1984). Бактерии *Aeromonas hydrophila* же обладает толерантностью к некоторым кислотам с рН 3,5. Изучение механизмов этого явления показало, что происходит синтез специальных протективных белков обеспечивающих защиту меток *A. hydrophila*

от повреждающего действия кислот (Carcin Kevin L., Foster John W., Bej Asim K., 1994). Велись исследования по разработке более простых и экономичных методов, позволяющих одномоментно определить большое число биохимических свойств возбудителей различных инфекционных заболеваний (Меджидов М. М., Гриднева Н. И., Пономарева Л. С. и др., 1994). Особое внимание при этом уделяется возможности серийного промышленного выпуска и стандартизации тест-систем. Предложен ряд методов для ускоренной индикации микробов с использованием безуглеродных сред, куда вносятся специальные шаблоны, содержащие ферментируемый субстрат. Предложены углеводно-бумажные диски для экспресс определения биохимических свойств ряда микробов (Bromfendrenner Y., Schlesiger M. L., 1980). Разработан метод использования таблетирования углеводов (Курбанова И. З., Кочеровец В. И., Магомедова П. И., Сапронова Е. В., 1992), метод получения полимерных тест-пленок с углеводами (Меджидов Ш. М., Омарова С. М., 1998). Сущность указанных методов заключается в том, что бумажные диски, таблетки или полимерные пленки, пропитанные углеводами, многоатомными спиртами или аминокислотами, помещают в чашки Петри с МПА, засеянные культурой, в которых и происходит разложение углевода микроорганизмами. В зоне диффузии углевода отмечается изменение цвета среды и регистрируется газообразование. Хотя и имеются сообщения о положительных результатах использования таблеток и полимерных пленок (Никитин В. М., Плугару С. В., 1973), тем не менее они не нашли применения в практических лабораториях, что объясняется трудностью изготовления этих препаратов, нестандартностью и сложной методикой их применения. Более результативными оказались исследования по разработке методик ускоренной биохимической индикации бактерий с помощью углеводно-бумажных дисков (УВД). Были разработаны бумажные диски, пропитанные углеводом, индикатором pH и покрытые защитной пленкой (Методические указания по применению физико-химических методов контроля питательных сред // Министерство здравоохранения СССР, ГИСК им. А. А. Тарасе-

вича № 1610.- М., 1977. - 29 с.). Приоритет в разработке методов использования УБД для ускоренной диагностики инфекционных заболеваний принадлежит отечественным исследователям (Блохина И. Н., Лавровская В. М., Альтман Р. Ш., 1978). Так в Нижегородском институте эпидемиологии и микробиологии разработаны уже упоминавшиеся нами системы индикаторных бумажных дисков (СИБ) и налажен их выпуск. Совместно с институтом им. Л. А. Тарасевича была проведена работа, показавшая возможность идентификации бактерий при помощи СИБ, и созданы наборы для ориентировочной и полной идентификации бактерий (Блохина И. Н. с соавт., 1978). В процессе длительного исследования группы штаммов чистой культуры могут претерпевать генетические изменения. Поэтому культуры, используемые в конце исследования, могут содержать несколько измененные организмы по сравнению с теми, которые изучались вначале. Однако при условии правильного хранения культур с самого начала работы можно всегда иметь источник микроорганизма с первоначальными свойствами (Герхардт Ф. с соавт., 1984). Для хранения *Aeromonas hydrophila* можно применять полужидкий голодный агар. Принцип действия основан на том, что невысокое содержание питательных веществ понижает жизнедеятельность бактерий, особенно в условиях хранения при 4-6 °С. Замедленные процессы обмена веществ ограничивают скопления метаболитов, что в свою очередь положительно влияет на сохранение исходных свойств штамма. Состав: на 1000 мл питательного бульона, содержащего 0,6 – 0,9 % общего азота, рН 7,2 – 7,4 , добавляют 2 – 4 г агара. Культуру засевают уколом в толщу среды, помещают в термостат и после 18-часового выращивания оставляют для хранения. Штаммы хранят при 4 – 6 °С, пересевают через 2 – 3 месяца (Голубева И. В., 1985).

Фенотипическое определение вирулентных факторов бактерии *A. hydrophila*

Фенотипическое определение вирулентных факторов бактерии *A. hydrophila* включает следующие тесты используемые нами и показавшие хорошие результаты.

- Гемолитическая активность

Проверяют на плотной среде с добавлением 5 % дифибринированной крови. Культуру пересевают на среду и инкубируют при 22 и 37 °С в течение 24 ч. Присутствие ясной бесцветной зоны, окружающей колонии указывает на гемолитическую активность (Boxmie E. Rose and Anita J. G. Okaend, 1998).

- Протеолитическая активность (гидролиз казеина и желатина)

Некоторые виды микроорганизмов продуцируют и выделяют во внешнюю среду протеолитические ферменты – протеазы, катализирующие расщепление белков. Для выявления этих ферментов культуру микроба засевают в питательную среду, содержащую тот или иной белок (Boxmie E. Rose and Anita J. G. Okaend, 1998).

- Нуклеазная активность

G. Castro-Escarpullia et.al. (2003) предложили дезоксирибонуклеазы определять на пластинах агара ДНК с 0.005 % метиленовым зеленым. Культуру переносят на пластины и инкубируют при 37 °С в течение 24 ч. Розовый ореол вокруг колоний указывает на активность нуклеазы.

В России разработаны Методические указания по определению патогенности аэромонад по степени ДНКазной активности, утв. Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода России 09.12.97 г., № 13-4-2/1116. Навеску ДНК (дезоксирибонуклеиновой кислоты) из расчета 200 мг на 100 мл среды растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, подщелоченной 1n раствором NaOH, вносят в расплавленный мясо-пептонный агар и стерилизуют однократно текучим паром 50 мин. Перед посевом агар расплавляют и стерильно добавляют на каждые 100 мл среды 0,8 мл 10 %-ного CaCl. После посева культуры, чашки инкубируют в термостате при температуре 25-30 °С в течение 48 часов. Затем на поверхность среды наносят 8-10 мл 1n раствора HCl, чашки слегка покачивают для равномерного смачивания поверхности среды. Через 10 мин, кислоту сливают и учитывают результат. Соляная кислота осаждает только полимерную ДНК, образуя хлопьевидный

преципитат, в результате чего среда становится матовой. ДНК, деполимеризованная дезоксирибонуклеазой, продуцируемой бактериями, не осаждается, и вокруг этих макроколоний образуются прозрачные зоны.

Можно использовать готовую среду фирм «Difco» или «Gibco».

- Интенсивность метаболических процессов по адсорбции красителя Конго-рот

Дело в том, что по данным Edward E. Ishiguro, Teresa Ainsworth, Trevor J. Trust и William W. Kay (1985) Конго-рот способен к специфическому связыванию с поверхностными белками, отвечающими за вирулентность. Проведенные данными авторами исследования показали, что штаммы бактерий, выделенные от больной рыбы, имеющие в клеточной поверхности белки известные как А-слой (А) < вовлеченный в ядовитость (вирулентность), формировали ярко красные колонии на триптозо-соевом агаре, содержащем 30 мг/мл Конго красного. Они резко отличались от бесцветных или светло-оранжевых колоний авирулентных мутантов не имеющих А-слоя (А). О способности высоко вирулентных штаммов бактерий *Aeromonas hydrophila* к связыванию краски Конго-рот говорят и некоторые отечественные авторы (Бухарин О. В. с соавт., 1998, В. С. Рукосуев, А. А. Жаворонков, 1999).

Считается, что вирулентность *Aeromonas hydrophila* обусловлена сочетанием множественных свойств штамма и присутствие некоторых факторов вирулентности у бактерий не является обязательным условием их патогенности (Mateos Diana, Anguita Juan, Rivero Octavio, Naharro German, Paniagua Carmen, 1992). Выявлены, различия в вирулентности биоваров *Aeromonas hydrophila* (Janda J. Michael, Kokka Robert P., 1991).

Разработка бактериологического метода выделения и идентификации *Aeromonas hydrophila*

Разработку данного бактериологического метода проводили, используя свойство разработанных сред: накопительной и плотной селективной.

Производили посевы исследуемого материала одновременно на среду накопления и плотную селективную среду. Спустя 24 часа культивирования при температуре 37 °С наблюдали рост характерных колоний на среде УГСХА – 2А.н. На среде УГСХА – 1А.н. наблюдали разжижение желатина. Второй этап: со среды накопления пересеивали культуру на плотную селективную среду УГСХА – 2А.н. Культивировали еще 24 часа при 37 °С. Выделенные бактерии окончательно идентифицировали по тинкториальным и культуральным свойствам, а также тестов на оксидазу, индол, сероводород, мочевины, OF-теста, реакции на углеводы (глюкозу, сахарозу, мальтозу, манит, инозит, ксилозу и арабинозу), наличию аргининдегидрогеназной активности, наличию лизин- и отсутствию орнитиндекарбоксилазной активности. Для фенотипического определения вирулентных факторов определяли наличие гемолитической активности у выделенных штаммов на триптозо-кровяном агаре (Difco) с добавлением 5 % диффинированной крови. ДНКазную активность на среде DNA BA (Difco). На данных средах вокруг колоний *Aeromonas hydrophila* спустя 48 ч культивирования наблюдалась широкая зона лизиса. Таким образом, испытанный метод позволяет проводить выделение и идентификацию вида *Aeromonas hydrophila* за 72 часа (рисунок 5).

С помощью сконструированной нами полужидкой дифференциально-диагностической среды можно осуществить идентификацию до подвида (рисунок 6).

С помощью предложенной схемы (рисунок 7) нами было выделено 52 штамма бактерий вида *Aeromonas hydrophila* из проб от объектов окружающей среды, пищевого сырья и пищевых продуктов. Нами были исследованы пробы морской рыбы, поступающей на рынки города Ульяновска в замороженном состоянии, а так же речной рыбы из местных водоемов. Кроме того, проводились исследования по обнаружению аэромонад в пробах воды из открытых водоемов Ульяновской области, сточных водах и водопроводной воде Ульяновска. Также были исследованы пробы сырого молока, мяса и мясных продуктов, яйца, овощи и

фрукты на контаминацию *Aeromonas hydrophila*. Результаты исследования различных проб см. в таблице 12 и рисунке 7.

Из рисунка 7 видно, что наибольший процент выделенных бактерий *Aeromonas hydrophila* приходится на открытые водоемы, сточные воды и речную рыбу. Из таких продуктов, как яйца, овощи, фрукты, а так же мяса и мясных продуктов изучаемых бактерий не выделено.

Изучение морфологических и тинкториальных свойств выделенных бактерий *Aeromonas hydrophila*.

Выяснение морфологии клеток и отношения к окраске по Грамму следует считать первоочередным, так как при этом исследовании могут быть выявлены характерные морфологические особенности (например, кокковая форма и др.), которые сразу же без других тестов дадут представление о микроорганизме. Все 52 выделенных штамма по Грамму окрашивались отрицательно (рисунок 8).

Для электронной микроскопии препараты наносили из бульонной культуры на сеточки с углеродной подложкой. Фиксировали 2 % O_5O_4 в течении 1,5 – 2 мин. Остаток культуры смывали какодилатным буфером (pH – 7,2).

Окрашивали объект 2 % фосфорно-вольфрамовой кислотой в течение 2 мин. Просматривали в электронном микроскопе JEM – 7A (Япония). Благодаря данным световой и электронной микроскопии мы установили, что выделенные нами *Aeromonas hydrophila* прямые палочки с закругленными концами, располагаются поодиночке, парами, цепочками, подвижные (монотрихи). Бактерии имеют капсулу, микрокапсулу, кроме жгутиков в некоторых штаммах просматриваются пили (рисунок 9).

Изучение биологических свойств бактерий *Aeromonas hydrophila*

Наиболее полно характеризуют ферментативные свойства бактерий вида *Aeromonas hydrophila* следующие тесты: определение цитохромоксидазы, образование индола, проба с метиловым красным и реакция Фогеса-Проскауэра, ферментация глюкозы, мальтозы и маннитола с образованием кислоты, неспособность

к сбраживанию инозита и ксилозы. Результаты по ферментации углеводов, образованию газа, H_2S и гидролизу мочевины см. в таблице 8. Все выделенные штаммы *Aeromonas hydrophila* были оксидазоположительными (рисунок 10), образовывали индол, давали положительные результаты в реакции с метиловым красным и реакции Фогеса-Проскауэра (рисунок 11).

На среде Хью-Лейфсона изменение цвета наблюдалось во всех пробирках, это говорит о том, что все выделенные микроорганизма относятся к факультативным анаэробам (рисунок 12).

Наличие аргининдигидролазы, лизиндекарбоксилазы и орнитиндекарбоксилазы проверяли с помощью микротест-систем (рисунок 13). При этом наблюдали изменение цвета среды в лунках с тест-реактивом на аргининдигидролазу (положительная реакция), цвет среды не менялся в лунках с тест-реактивами на лизиндекарбоксилазу и орнитиндекарбоксилазу (отрицательная реакция)

Подвижность определяли методом посева уколом в полужидкий агар (рисунок 14).

Из таблицы 13 видно, что не все штаммы одинаково реагируют с углеводами, гидролизуют мочевину, образуют сероводород. По-видимому, это связано с наличием внутри вида деления на биоварианты. Для фенотипического определения вирулентных факторов определяли наличие гемолитической активности у выделенных штаммов на триптозо-кровяном агаре (Difco) с добавлением 5 % дифибринированной крови.

Таблица 12. Результаты исследования объектов окружающей среды, пищевого сырья и пищевых продуктов на контаминацию бактериями *Aeromonas hydrophila*.

№ п/п	Название и количество проб	Контаминация бактериями <i>Aeromonas hydrophila</i> (кол-во выделенных штаммов)
1	Замороженная морская рыба (36 проб)	+ (2 штамма)
2	Свежая речная рыба (62 пробы)	+ (7 штаммов)
3	Вода из открытых водоемов (189 проб)	+ (24 штаммов)
4	Сточные воды (158 проб)	+ (16 штаммов)
5	Водопроводная вода (57 проб)	+ (1 штамм)
6	Молоко (31 проб)	+ (2 штамма)
7	Мясо и мясные продукты (43 пробы)	-
8	Яйца (11 проб)	-
9	Овощи (6 проб)	-
10	Фрукты (4 пробы)	-

«+» случаи контаминации *Aeromonas hydrophila*

«-» отсутствовала контаминация *Aeromonas hydrophila*

Таблица 13. Результаты изучения биохимических свойств «полевых» штаммов *Aeromonas hydrophila*.

Штаммы	Тесты								
	Газообразование	Глюкоза	Сахароза	Манинит	Инозит	Арабиноза	Сорбит	Образование сероводорода	Уреаза
A.h. 01 реф.	+	+	+	+	-	+	-	-	-
A.h. 02 реф.	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Морская рыба									
P _{8a}	+	+	+	+	+	+	-	+	-
P _{8r}	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Речная рыба									
P ₄	+	+	+	+	-	+	-	+	+
P ₉	+	+	+	+	-	+	-	+	-
P ₁₀	+	+	+	+	-	+	-	-	-
P ₁₁	+	+	+	+	-	+	-	+	-
P ₁₂	+	+	+	+	-	+	-	+	-
P _{13a}	+	+	+	+	-	+	-	-	-
P _{13b}	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Вода открытых водоемов									
1a	+	+	+	+	-	+	-	+	-
4a	+	+	+	+	-	+	-	+	-
5a	+	+	+	+	-	+	-	+	-
11a	+	+	+	+	-	+	-	+	-
13a	+	+	+	+	-	+	-	+	-
2б	+	+	+	+	-	+	-	-	-
5д	+	+	+	+	-	+	-	+	-
7д	+	+	+	+	-	+	-	+	-
8д	+	+	+	+	-	+	-	+	-
9д	+	+	+	+	-	+	-	+	-
10д	+	+	+	+	-	+	-	+	-
11д	+	+	+	+	-	+	-	+	-
1е	+	+	+	+	-	+	-	+	-
5е	+	+	+	+	-	+	-	+	-
6е	+	+	+	+	-	+	-	+	-
7е	+	+	+	+	-	+	-	+	-
1з	+	+	+	+	-	+	-	+	-
2з	+	+	+	+	-	+	-	+	-
3з	+	+	+	+	-	+	-	+	-
5з	+	+	+	+	-	+	-	+	-
6з	+	+	+	+	-	+	-	+	-
8з	+	+	+	+	-	+	-	+	-
10з	+	+	+	+	-	+	-	+	-
11з	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Сточные воды									
37	+	+	+	+	-	+	-	+	-
39	+	+	+	+	-	+	-	+	-
43	+	+	+	+	-	+	-	+	-

48	+	+	+	+	-	+	-	+	-
П1	+	+	+	+	-	+	-	+	-
П2	+	+	+	+	-	+	-	+	-
П3	+	+	+	+	-	+	-	+	-
П4	+	+	+	+	-	+	-	+	-
П5	+	+	+	+	-	+	-	+	-
1г	+	+	+	+	-	+	-	+	-
2г	+	+	+	+	-	+	-	+	-
5г	+	+	+	+	-	+	-	+	-
6г	+	+	+	+	-	+	-	+	-
1в	+	+	+	+	-	+	-	+	-
3в	+	+	+	+	-	+	-	+	-
X	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Водопроводная вода									
A ₇	+	+	+	+	-	+	-	+	-
Молоко									
M ₁	-	+	+	+	-	+	-	-	-
M ₆	-	+	+	+	-	+	-	-	-

«+» положительно реагирующие штаммы

«-» отрицательно реагирующие штаммы

Таблица 14. Результаты изучения факторов вирулентности «полевых» штаммов *Aeromonas hydrophila*.

Штаммы	Гемолитическая активность	Протеолитическая активность	ДНКазная Активность
A.h. 01 <i>реф.</i>	+	+	+
A.h. 02 <i>реф.</i>	+	+	+
Морская рыба			
P _{8a}	-	+	+
P _{8г}	-	+	+
Речная рыба			
P ₄	+	+	+
P ₉	+	+	+
P ₁₀	-	-	-
P ₁₁	-	-	-
P ₁₂	+	+	-
P _{13a}	+	+	-
P _{13б}	+	+	-
Вода открытых водоемов			
1а	+	+	+
4а	+	+	+
5а	+	+	+
11а	+	+	+
13а	+	+	+
2б	+	+	+
5д	+	+	+
7д	+	+	+
8д	+	+	+
9д	+	+	+
10д	+	+	+
11д	+	+	+

1е	+	+	+
5е	+	+	+
6е	+	+	+
7е	+	+	+
1з	+	+	+
2з	+	+	+
3з	-	+	+
5з	+	+	+
6з	+	+	+
8з	+	+	+
10з	+	+	+
11з	+	+	+
Сточные воды			
37	+	+	+
39	+	+	+
43	+	+	+
48	+	+	+
П1	+	+	+
П2	+	+	+
П3	+	+	+
П4	+	+	+
П5	+	+	+
1г	+	+	+
2г	+	+	+
5г	+	+	+
6г	+	+	+
1в	+	+	-
3в	+	+	-
Х	+	+	+
Водопроводная вода			
A ₇	-	+	-
Молоко			
M ₁	+	+	+
M ₆	+	+	+

«+» положительно реагирующие штаммы

«-» отрицательно реагирующие штаммы

Протеолитическую активность проверяли на питательном бульоне с желатином. ДНКазную активность на среде DNA BA (Difco). Результаты представлены в таблице 13 и рисунках 15-18.

Таким образом, все выделенные штаммы отличаются по вирулентности. Так, наиболее вирулентными могут считаться штаммы *Aeromonas hydrophila*, выделенные из сточных вод и открытых водоемов, а так же молока.

3.1.6. АЭРОМОНОЗ, ВЫЗЫВАЕМЫЙ БАКТЕРИЯМИ *AEROMONAS SALMONICIDA*

(Материал подготовлен по результатам исследовательской работы Н. Г. Куклиной, Д. А. Васильева)

Впервые род *Aeromonas* описал в своей работе Санарелли в 1891 году, хотя Циммерман уже в 1890 году в Хемнице смог выделить *Bacillus punctatus* из питьевой воды, а Эрнст в 1890 году выделил из тканей лягушки *Bacillus rancida*, но описания этих видов оказалось недостаточно для однозначного присвоения их к современному роду *Aeromonas* (Schubert, 1968).

Позднее по признаку подвижности бактерии рода *Aeromonas* были разделены на две основные группы – мезофильные (подвижные) штаммы, оптимальная температура роста которых 35-37 °С и связаны с различными инфекциями у человека и психрофильные (неподвижные) штаммы, для которых благоприятная температура роста - 22-25 °С и являющиеся причиной заболеваний рыб (Janda, 1991) .

В издании Bergeys Manual of Systematics Bacteriology 1997 года, род *Aeromonas* включен в семейство *Vibrionaceae*. Однако, после проведенного исследования рРНК-ДНК гибридизации представителей данного семейства, было выяснено, что род *Aeromonas* существенно отличается от других родов в семействе *Vibrionaceae* и должен быть выделен в отдельное семейство *Aeromodaceae* (Martinez-Murcia et al., 1992). Результаты исследований ДНК-гибридизации хорошо коррелируют с биохимическими исследованиями. (Altwegg, et al, 1990).

На основании метода ДНК-ДНК гибридизации род *Aeromonas* разделен на 14 видов (геномогрупп) (Carnahan, et al., 2005). Позже число видов в роду увеличилось до 17 (Yanez, et al., 2003). К настоящему времени признаны следующие виды – *Aeromonas* – *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas bestiarum*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas caviae*, *Aeromonas media*, *Aeromonas eucrenophila*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas veronii*, *Aeromonas*

jandaei, *Aeromonas schubertii*, *Aeromonas trota*, *Aeromonas allosaccharophila*, *Aeromonas encheleia*, *Aeromonas popoffii* и *Aeromonas culicicola* (Soler et al., 2004), *Aeromonas molluscorum* (Minana-Galbis et al., 2002), *Aeromonas sharmiana* (Saha et al., 2006), *Aeromonas bivalvium* (Minana-Galbis et al., 2007), *Aeromonas tecta* (Demarta et al., 2008).

В 1963 году было получено первое сообщение о нетипичном виде *Aeromonas salmonicida* (Smith, 1963).

Возникновение «отклоняющихся» или «нетипичных» штаммов вызвало переосмысление систематики вида *Aeromonas salmonicida*. Сначала было разделение на две подразновидности, *A. salmonicida subsp. salmonicida* и *subsp. achromogenes* (Schubert, 1967). Затем на основе биохимических характеристик было предложено разделение на типичные и нетипичные штаммы без деления на подвиды (McCarthy, 1977). Исследования McCarthy и Roberts (1980) указали на существование трех главных групп среди *A. salmonicida*: типичные штаммы, нетипичные штаммы, поражающие рыбу, семейство лососевых и нетипичные штаммы, поражающую рыбу, относящуюся к другим семействам рыб. Три группы соответственно назвали *A. salmonicida subsp. salmonicida*, *subsp. achromogenes* (также содержащий бывший *subsp. masoucida*) и *subsp. nova* (McCarthy, Roberts, 1980). Позже произошло разделение на следующие подвиды: *subsp. salmonicida*, *subsp. achromogenes* и *subsp. masoucida* (Попов, 1984), *subsp. smithia* (Austin et al., 1989) и *subsp. pectinolytica* (Pavan et al., 2000).

Скандинавская группа исследователей, совместно с представителями Норвегии, Швеции, Дании, Финляндии, Фарерских островов и Исландии выпустила руководство по надзору и диагностике заболеваний у культивируемых лососей. В первом выпуске 1992 года, *A. salmonicida* разделен на две группы на основе фенотипических свойств: *A. salmonicida subsp. salmonicida* и другие штаммы *A. salmonicida*, включая *subsp. achromogenes*, *subsp. masoucida* и т.д. (Midtlyng et al., 1992). В следующем выпуске руководства номенклатура *Aeromonas* была пересмотрена. Было

определено, что фурункулез и язвенный дерматит может быть вызван как *A. salmonicida subsp. salmonicida*, так и *A. salmonicida subsp. achromogenes*, *subsp. masoucida*, *subsp. nova* и другими нетипичными штаммами (Midtlyng et al., 2000).

Биологические, морфологические и культуральные признаки бактерии вида *A. salmonicida*

Бактерии вида *A. salmonicida* представляют собой короткие грамотрицательные палочки, которые могут быть соединены между собой в пары или цепи (Austin, 2012).

Редко подвижные. Поверхность покрыта S-слоем, играющим значительную физиологическую роль – усиливает клеточную филаментацию и чувствительность к некоторым антибиотикам (Garduno, Phipps, Kay, 1994, Noonan, Trust, 1997). Оптимальная температура роста 22–25 °C. Максимальная температура роста в питательном бульоне 34, 5 °C (Griffin et al., 1953). Колонии на мясо-пептонном агаре после 24 ч. заостренные. После 48–72 ч колонии округлые, выпуклые, полупрозрачные, цельные и хрупкие. (Altwegg, 1999).

Поверхность *A. salmonicida* заключена в белковую оболочку, поверхностный слой которой составляет преимущественно А-белок и липополисахариды.

На кровяном агаре морфология колоний сходная и некоторые подвиды могут производить гемолиз после 2–4 суток. (Millership, 1996).

Пигментация колоний, обычно желтоватая; отсутствие пигментации отражено серовато-белым цветом колонии. Коричневый, растворимый пигмент появляется после 24 ч. и достигает максимального цвета через 48-72 часа.

При посеве культур на среду Эндо с молоком, в отличие от бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, которые растут от розового до малинового цвета колоний, аэромонады растут в виде бледно – розовых с оранжевым оттенком круглых, иногда плоских колоний с протеолитической зоной и с характерным запахом (Дугажурпова, 2012).

Атипичные штаммы *A.salmonicida* способны к секреции экзотоксинов PL, LCATA, AsaPL, P2 – металложелатиназы и сериновой казеиназы (Gudmundsdottir, et al, 2003).

Aeromonas salmonicida subsp. salmonicida способна образовывать коричневый водорастворимый пигмент на агаре, содержащем 0,1 % эскулин или фенилаланин, также образует гемолиз на агаре из бычьей крови, способна к гидролизации эскулина, образование индола не происходит, способна к образованию газа из D – глюкозы, ферментирует салицин и l-арабинозу. (Griffin, Snieszko, Diamanka, et al, 2014). Геном данного подвида, кроме того содержит гены трех типов пили (Boyd, et al, 2008).

Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes (Smith, 1963). Обычно не производит коричневый, водорастворимый пигмент, если не выращен на специфической среде, такой как триптико-соевый или триптико-кровяной агар.

Образует индол, аргинин положителен, образует кислоту из в – маннитола, и ассимилирует N-ацетил глюкозамин. Не образует газ из D – глюкозы, эскулин не гидролизуется; на кровяном агаре гемолиза не происходит.

Aeromonas salmonicida subsp. masoucida (Kimura, 1969)

Не производит коричневый, водорастворимый пигмент на агаре; производит гемолиз на кровяном агаре; может гидролизировать эскулин; аргинин положителен; образует газ из D – глюкозы; ферментирует l-арабинозу; не ассимилирует N-ацетил глюкозамин.

Aeromonas salmonicida subsp. pectinolytica (Pavan, Abbott, Zorzopulos and Janda, 2000). Колонии были изолированы из сильнозагрязненных рек.

Aeromonas salmonicida subsp. smithia (Austin, McIntosh and Austin, 1989),

Неподвижный, примерно 1–2 мм в размере, с закругленными концами. Культуры на триптико – соевом агаре (TSA) разделяются на «шероховатые», «гладкие», и «G-фазные» колонии (Duff, 1937). Через несколько часов после начала культивирования начинает производить коричневый растворимый пигмент.

Метаболизм ферментативный. Оптимальный рост при 4–25 °С, при 30 °С и в 0–2 % растворе NaCl рост отсутствует. Каталаза- и оксидаза положителен, способен к образованию сероводорода, способен к ферментации фосфатазы и фосфоамидазы, не способен к образованию индола, аргинина, лизина, орнитина, фенилаланина. ДНКазы положителен, разжижает желатин, не гидролизует эскулин, не производит гемолиз (Austin et al., 1989). Патогенен для рыбы, гибель в течении 24–72 ч. В анальном отверстии и на плавниках видны внешние кровоизлияния и гниль. Происходит накопление асцитической жидкости в брюшной полости, наряду с обширной кровоточивостью мышц, разжижением внутренних органов и гастроэнтеритом.

В 2004 году из каменной камбалы (*Kareius bicoloratus* L.) был выделен и исследован новый штамм *A. salmonicida*. На основании исследования его биологических характеристик (морфологических, культуральных, физиологических, биохимических и серологических), а также на основании результатов исследования молярных % Г-Ц пар, этот штамм отнесен к новому подвиду *flounderacida* (Zhang, et al, 2004).

Патогенность бактерии *Aeromonas salmonicida*

Некоторые авторы считают, что высоковирулентные виды аэромонад как облигатные патогены встречаются довольно редко, а основную роль в возникновении аэромоноза играет группа условно патогенных аэромонад с приобретенной или индуцированной вирулентностью, приобретающих эти свойства в результате воздействия определенных факторов внешней среды или пассирования через организм рыб (Юхименко и др., 2000).

Вирулентные аэромонады отличаются высокой степенью инвазивности (инфективности) за счет наличия у них выраженных адгезивных свойств и способности проникать не только через тканевые барьеры, но и внедряться в эпителиальные клетки (Leung, 1996; Соколова и др., 2000; Иренков, Борисова и др., 2001). Кроме того, в структуре бактериальной клетки присутствует липополисахарид, на который у рыб может возникать им-

мунная защитная реакция, при этом его количество не влияет на степень поражения тканей и органов (Boltana, et al., 2014).

Адгезины у аэромонад являются атрибутом приспособления к условиям окружающей среды и необходимы для запуска инфекционного процесса патогенными бактериями (Шимко, Широгорова, 1991; Вовк, 2007).

Исследования, проведенные В. Ф. Борисенко (1991), свидетельствуют, что степень дезоксирибонуклеазной активности аэромонад, выделенных от больных рыб, находится в прямой зависимости от способности вызывать патологический процесс. Вирулентные аэромонады, обладающие ДНК-азной активностью, выделенные из патологического материала от рыб с признаками острого течения болезни, постоянно дают положительный результат при постановке биопробы на карпах.

Aeromonas salmonicida – болезнетворный микроорганизм, вызывающий инфекционные заболевания рыб. Клинический фурункулез – септическая болезнь, которая проявляется как молниеносная, острая, подострая или хроническая форма (McCarthy 1977, McCarthy & Roberts 1980). Острые формы вызывают высокую смертность, в то время как в подострых и хронических формах начало болезни более постепенное и смертность относительно низкая (McCarthy 1977).

При изучении трех предполагаемых генов вирулентности – *Aer*, *HLY*, *alt* – наиболее распространенным геном является *HLY* (Zhou, et al., 2013).

Aeromonas salmonicida, как и другие виды *Aeromonas*, обладает следующими факторами патогенности – продукция адгезина, гемолизина, лецитиназы, амилазы, липазы, протеазы, дезоксирибонуклеазы, усваивают конго-красный (Журавлева, 1998).

Основным летальным токсином *A. salmonicida* является глицерофосфолипид – холестеринацилтрансфераза (Hussain, et al., 2000).

A. salmonicida subsp. salmonicida содержит токсин ADP-рибозилтрансфераза, обнаруживающий сходство с экзотоксинами синегнойной палочки и цитотоксином различных видов иерсиний

(Braun, et al., 2002). Данный токсин является белком, выделяемый при помощи секреторной системы III типа (Burr, et al., 2005).

Подвид *Aeromonas salmonicida subsp. achromogenes* производит токсичные металлопептидазы, относящиеся к группе внеклеточных пептидаз являющиеся достаточно вирулентным при поражении рыб (Arnadottir, et al., 2009).

A. salmonicida поражает в первую очередь желудочно-кишечный тракт рыб, что объясняется особенностью муцинового слоя кишечника (Padra, et al, 2014).

Для более полного понимания факторов вирулентности был изучен геном *A. salmonicida*. Данное исследование показало наличие большого количества генов, определяющих факторы вирулентности, в тоже время отсутствующих у других видов бактерий рода *Aeromonas* (Reith, Singh, Curtis, 2008).

У карпа под воздействием патогенных аэромонад и псевдомонад зафиксировано необратимое изменение структуры ядер эритроцитов – конденсация ядерного хроматина вблизи мембраны (Волынкин, 2007).

Хроническое течение аэромоноза вызывает сдвиг в системе антиоксидантной защиты. Отмечено уменьшение значений каталазы, пероксидазы, церулоплазмينا. Развивающийся патологический процесс в организме рыб при инфицировании ускоряет интенсивность свободно-радикальных реакций, в результате в органах и тканях накапливаются токсические перекиси липидов, концентрация малонового диальдегида увеличивается в среднем в два раза. Емкости системы антиоксидантной защиты при этом недостаточно для стабилизации процессов окисления в пределах нормального уровня, что выражалось в снижении концентрации фосфолипидов в крови рыб и активности ферментативного звена антиоксидантов. Избыточная активация процессов свободнорадикального окисления и является одним из факторов патогенеза данной болезни (Дрошнев, 2010, Борисова, 2003, 2004).

Аэромонозы рыб

Фурункулез (аэромоноз лососевых рыб) – инфекционная болезнь лососевых рыб, культивируемых в рыбоводных хозяйствах или обитающих в реках, озерах и открытых водоемах (морях). Возбудителем болезни является бактерия *Aeromonas salmonicida*, относящаяся к роду *Aeromonas*, семейству *Aeromonadaceae*.

Эпизоотология

Фурункулезом болеют палия, ручьевая и радужная форель, проходные тихоокеанские и атлантические лососи, реже рыбы из других семейств.

Наиболее восприимчивы к фурункулезу рыбы старше двухлетнего возраста.

Источником фурункулеза являются больные и переболевшие, а также дикие и сорные рыбы-бактерионосители.

Перенос возбудителя происходит при пересадке и миграции рыб-бактерионосителей, через оплодотворенную икру, инфицированную в процессе получения половых продуктов от больных производителей, а также с водой, орудиями лова, рыбоводным инвентарем, тарой, спецодеждой и обувью обслуживающего персонала (Видишев, 2011).

Заражение рыб происходит через поврежденные жабры и кожу, а также пищеварительный тракт.

Заболевание рыб фурункулезом наиболее часто проявляется весной и летом, но при неблагоприятных условиях может возникнуть и в осенне-зимний период, а у проходных лососевых рыб – в период нерестовых миграций в пресноводные реки.

Возникновению болезни способствуют повышение температуры воды, загрязнение водоема органическими веществами, слабая проточность, снижение уровня растворенного в воде кислорода, уплотненные посадки, кормление неполноценными кормами, другие болезни, снижающие резистентность организма рыб.

Инкубационный период у лососевых рыб продолжается в среднем 2-10 дней в зависимости от температурных условий и физиологического состояния рыбы. У рыб несальмонид инкубационный период 3-30 дней.

Микробиологические методы идентификации бактерии вида *Aeromonas salmonicida*

Бактериологическая диагностика основана на выделении культуры *Aeromonas salmonicida*.

Первичные посевы из крови, асцитной жидкости, печени, почек, селезенки осуществляли на чашки Петри с агаром Эндо и инкубировали в термостате при температуре 26 - 28 °С в течение 48 часов. Полученные изолированные колонии отсевали на скошенный МПА для получения чистой культуры и инкубировали при той же температуре 18 – 20 часов.

Групповую дифференциацию выделенных бактерий проводили с использованием окраски по Граму классическим методом и синькой Леффлера. Для определения оксидазной активности применяли диметил-парафенилендиамина дигидрохлорид. Культуры пересевали в пробирки со средой Хью-Лейфсона с целью определения родовой принадлежности бактерий по ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях. Биохимические свойства аэромонад и энтеробактерий изучали на пластинах биохимических дифференцирующих энтеробактерии (ПБДЭ) (Гончарова, 2012).

Посевы делают из крови, внутренних органов и не вскрытых абсцессов больных рыб на пластинчатые плотные питательные среды: мясо-пептонный агар или агар Хоттингера, агар Д и выдерживают при температуре 18-25 °С в течение не менее 48 часов.

В посевах на жидких питательных средах возбудитель растет, образуя рыхлый осадок и тонкую сероватую пленку, в то время как весь столбик среды остается прозрачным. Через 7-10 дней поверхностный слой бульона приобретает коричневый цвет, который в дальнейшем усиливается и распространяется на всю среду. Слабовирулентные формы *Aeromonas salmonicida* дают гладкие, выпуклые колонии и помутнение бульона в первые сутки. На плотных питательных средах вырастают уплощенные колонии с гладкой блестящей поверхностью и ровными краями, диаметром около 3 мм. Через 2-3 дня питательная среда приобретает

коричневый цвет в результате диффундирования в нее из колонии образующегося водорастворимого пигмента (меланина).

Все виды, входящие в род изучаемых нами бактерий грамотрицательные, каталоположительные, оксидазоположительные. Образуют кислоту из глюкозы, D-галактозы, мальтозы. Не образуют кислоту из дульцитола, лактозы и D-ксилозы. Разжижают желатину, восстанавливают нитраты, продуцируют ДНКазу, не гидролизуют мочевины. Не используют малонат. Наблюдается рост как в отсутствии NaCl, так и в присутствии 1 % р-ра NaCl. Положительны по аргининдигидролазе и отрицательны по орнитиндигидролазе. Результаты тестов по фенилаланиндигидролазе отрицательны.

В настоящее время в России используются следующие нормативные документы по методам определения аэромонад в различных видах исследуемого материала: Методические рекомендации «Методы исследований объектов окружающей среды и патологического материала на аэромонады», разработанные в Московском научно-исследовательском институте гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана в 1980 году; Инструкция о мероприятиях по профилактике и мерах борьбы с фурункулезом лососевых рыб (Министерство сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации. 26 ноября 1997 № 13-4-2/1090); Инструкция о мероприятиях по борьбе с аэромонадой карповых рыб (Министерство сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации. 17 августа 1998 №№ 13-4-2/1366).

Согласно методическим рекомендациям «Методы исследований объектов окружающей среды и патологического материала на аэромонады» пробы воды и их разведения высевают по 0,5 мл в жидкую среду накопления, в состав которой входят: сульфат магния, K_2HPO_4 , желатин, крахмал (среда А-1). Через 24 ч инкубирования посевов в термостате при температуре 30 °С производят пересев на плотную дифференциально-селективную среду, в состав которой, кроме перечисленных компонентов (среда А-1), входят: водный раствор кристаллического фиолетового и трифенилтетрахлорид (среда А-2). Посевы на плотной селективной среде инкубируют в термостате при температуре 28-30 °С в те-

чение 42-48 ч. Характеристика колоний аэромонад на плотной дифференциально-селективной среде (среда А-2): крупные с вишневым центром и узким бесцветным ободком. Однако, использование предлагаемых дифференциально-селективных питательных сред А-1 и А-2 не позволяет достаточно квалифицированно проводить работу по выявлению аэромонад в пищевых продуктах. Среда А-1 и А-2 являются многокомпонентными, требуют дополнительных затрат на приобретение ряда дорогих химических реактивов и ингредиентов.

Согласно инструкции о мероприятиях по борьбе с аэромонадом карповых рыб и инструкции о мероприятиях по профилактике и мерам борьбы с фурункулезом лососевых рыб, диагноз ставится на основании эпизоотических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений, результатов бактериологического исследования и положительной биопробы.

При бактериологической диагностике посевают из крови, внутренних органов и не вскрывшихся абсцессов больных рыб на пластинчатые плотные питательные среды: мясо-пептонный агар или агар Хоттингера, агар Д и выдерживают при температуре 18-25 °С в течение не менее 48 часов. В посевах на жидких питательных средах возбудитель растет, образуя рыхлый осадок и тонкую сероватую пленку, в то время как весь столбик среды остается прозрачным. Через 7-10 дней поверхностный слой бульона приобретает коричневый цвет, который в дальнейшем усиливается и распространяется на всю среду. Слабовирулентные формы *Aeromonas salmonicida* дают гладкие, выпуклые колонии и помутнение бульона в первые сутки. На плотных питательных средах вырастают уплотненные колонии, с гладкой блестящей поверхностью и ровными краями, диаметром около 3 мм. Через 2-3 дня питательная среда приобретает коричневый цвет в результате диффундирования в нее из колонии образующегося водорастворимого пигмента (меланина).

В данных нормативных документах описываются среды, не являющиеся селективными, и для более точной постановки диагноза требуется проведение дополнительных тестов.

В европейских странах и США, в которых выделением аэромонад занимаются уже относительно давно, в качестве плотной питательной среды чаще всего применяется триптозо-кровяной агар (он упоминается практически во всех сообщениях связанных с выделением аэромонад) (Griffin, 1953; McCarthy, 1980; Scubert, 1967; Midtlyng, et al. 2000; Colwell, et al. 1986). Пересевая культуру со среды накопления на триптозо-кровяной агар с добавлением 5 % дефибринированной крови. Через 24 ч инкубации при температуре 28 °С наблюдается рост круглых, серых колоний *Aeromonas salmonicida* с зоной гемолиза вокруг.

Еще одна среда, которая часто упоминается в зарубежной литературе – это триптико-соевый агар. В частности L. Soler et.al. (2003) использовали триптико-соевый агар (Difco) для выделения *Aeromonas spp.* В Японии ведется много исследований по обнаружению и генетическому анализу аэромонад, а для изучения чистой культуры так же применяется триптико-соевый агар (Zhang et.al., 2003). На этой среде рост *Aeromonas salmonicida* наблюдается в виде круглых, полупрозрачных, небольших колоний (2-3 мм), беловато-желтого цвета.

Boxmie E. Rose and Anita J. G. Okaend (1998) считают, что можно использовать крахмально – ампициллиновый агар. Бактерии выращивают на чашках с МПА, содержащим 0,2 % растворимого крахмала и ампициллин. По прошествии двух суток заливают чашки раствором Люголя. Последний дает с крахмалом синее окрашивание, колонии *Aeromonas salmonicida* окружены прозрачными неокрашенными зонами.

В зарубежных странах одним из способов диагностики бактерии *A. salmonicida* является ИФА диагностика, которая используется наряду со стандартными бактериологическими методиками (Hiney, et al, 1994).

Питательные среды, применяемые для выделения и идентификации аэромонад

1. Среда Эндо с молоком

К готовой среде Эндо, приготовленной по прописи на этикетке флакона, добавляют 10 % стерильного обезжиренного молока.

2. Среда А-1 (жидкая среда накопления)

Состав: вода дистиллированная – 100 мл, сульфата магния – 0,02 г, фосфата калия двузамещенного – 0,1 г, натрия хлористого – 0,5 г, желатина – 1,0 г, крахмала растворимого – 0,2 г, кристаллический фиолетовый 2,0 мл 0,01% .

Приготовление: все ингредиенты смешивают, кипятят 2-3 минуты, стерилизуют при 0,5 атм. 15 мин. После стерилизации добавляют кристаллический фиолетовый.

3. Среда А-2 (плотная дифференциально-элективная)

Состав: вода дистиллированная – 100 мл, агар – 2,0 г, желатин – 5,0 г, крахмала растворимого – 0,5 г, сульфата магния – 0,02 г, фосфата калия двузамещенного – 0,1 г, трифенилтетразолхлорид – 2,0 мл 10% водного раствора.

Приготовление: все ингредиенты смешивают, кипятят 2-3 минуты до полного растворения агара. Стерилизуют при 0,5 атм. 15 мин.

4. Аэромонад агар (питательная основа) – модифицированная версия исходной формулы XLD для поддержания роста *Aeromonas spp.* Для проб окружающей среды рекомендуется использовать ампициллиновую добавку к основной среде.

Состав на литр: дрожжевой экстракт – 3,00 г, лактоза – 1,50 г, D – сорбитол – 3,00 г, ксилоза – 3,75 г, L -аргинин HCL – 2,00 г, L –лизин – 3,50 г, натрий хлорид – 5,00 г, соли желчной кислоты – 3,00 г, тиосульфат натрия – 10,67 г, двойная соль лимоннокислого железа и лимоннокислого аммония - 0,80 г, тимолсульфоналеин – 0,04 г, бромотимольный синий краситель – 0,04 г, агар – 13,00 г.

Приготовление: смешать ингредиенты, довести до кипения. Не автоклавировать. Остудить до 48 °С и асептически добавить 2 пузырька ампицидиновой добавки (5 мг/л), если необходима повышенная селективность. Тщательно перемешать и разлить в чашки Петри.

Aeromonas salmonicida является возбудителем фурункулеза (аэромоноза) лососевых. Данное заболевание впервые было описано Эммерихом и Вайбелем еще в 1894 году в Германии (Bernoth, Ellis, Mitglung, 1997). В России впервые бактерии это-

го вида изолировали в 1989 г. от кеты из Берингова моря (Гаврюсева, и др., 2012). Долгое время считалось, что *A. salmonicida* поражает рыб только семейства Лососевые, но современные исследования показывают увеличение частоты инфицированности рыб, не относящихся к данному семейству (Janda, et al., 2010).

Кроме того, существуют исследования, указывающие на выделение *A. salmonicida* из крови человека (Tewari, Dudeja, Nandy, Das, 2014).

Возможно также использование бактерии *A. salmonicida* в составе комплексного биопрепарата для улучшения выращивания сои (Tobing, 2011).

В настоящее время не существует достаточно четкой разработанной схемы выделения, индикации и идентификации бактерии вида *A. salmonicida*, что затрудняет изучение ареала распространения указанного микроорганизма и своевременной диагностики вызываемой инфекции.

Изучение биологических, морфологических и тинкторальных свойств *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658.

В результате исследования окрашенных мазков, было выявлено, что референс-штамм *A. salmonicida* ATCC 33658 представляет собой мелкие, грамотрицательные палочки с закругленным концом (рисунок 19). Подвижность референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658 была определена на полужидком агаре, при помощи укола в столбик. В результате наблюдался рост бактерий только по линии укола, что свидетельствует о неподвижности бактерии.

Для изучения биологических свойств референс-штамма бактерии *A. salmonicida* ATCC 33658 были использованы следующие тесты: определение оксидазы, определение каталазы, определение желатиназы, определение нитратредуктазы, окисление и ферментация глюкозы (OF-тест), ферментация лактозы, способность к утилизации цитрата.

Кроме того, для наиболее полной характеристики ферментативных свойств исследуемых нами штаммов были проведены

тесты на ферментацию следующих углеводов – мальтозы, маннозы, рамнозы, раффинозы, дульцитола, ксилозы, маннита.

В результате исследования были выявлены следующие биологические свойства, присущие референс-штамму *A.salmonicida* ATCC 33658 – оксидазаположительная, каталазаположительная, разжижает желатиназу, способна к окислению и ферментацию глюкозы, способна к восстановлению нитратов в нитриты, не способна к ферментации лактозы, раффинозы, ксилозы, рамнозы, не способна к утилизации цитрата (таблица 15).

Изучение антибиотикочувствительности референс-штамма *A.salmonicida* ATCC 33658

Исследование штамма *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658 на устойчивость к ингибирующим химиотерапевтическим средствам было проведено с помощью метода диффузии в агар с применением дисков, которые содержали следующие антимикробные вещества: канамицин, норфлоксацин, оксациклин, цефалотин, ампициллин, полимиксин, стрептомицин, бензилпенициллин, цефазолин, карбенициллин, левомецитин, эритромицин, энрофлоксацин, левофлоксацин, тетрациклин, цефамандол, кларитромицин, амоксициклин, ципрофлоксацин, цефаклор, мономицин, фуразолидон, ломефлоксацин, офлоксацин, гентамицин, доксициклин, цефоперазон, бацитрацин, оптохин, линкомицин.

Выбор данных химиотерапевтических средств обусловлен необходимостью подобрать антибиотик или антимикробное вещество, к которому *A.salmonicida* устойчива, и который одновременно ингибирует рост грамположительных и грамотрицательных кокков и палочек. Результаты исследования приведены в таблице 16.

По результатам исследований, было выявлено, что штамм *A.salmonicida* ATCC 33658 устойчив к бацитрацину, оптохину, линкомицину (рисунок 20).

С целью подбора селективного компонента в питательную среду нами было проведено изучение антибиотикоустойчивости бактерий-ассоциантов. Результаты представлены в таблице 16.

Таблица 15. Результаты биохимической активности штамма *A.salmonicida* ATCC 33658

Оксидаза	каталаза	желатиназа	Нитратредуктаза	OF-тест	лактоза	цитрат	мальтоза	манноза	раffinоза	дульцитол	ксилоза	маннит	раминоза
+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-

Примечание: «+»- положительная реакция, «-»- отрицательная реакция.

Таблица 16. Устойчивость бактерий-ассоциантов к некоторым антибиотикам.

№ п/п	Название штамма	Антибиотики		
		Бацитрацин	Оптохин	Линкомицин
1.	<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 33658	-	-	-
2.	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 49140	-	-	-
3.	<i>Aeromonas sobria</i> ATCC 9071	-	-	-
4.	<i>Aeromonas caviae</i> ATCC 15468	-	-	+
5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> №128	-	-	+
6.	<i>Pseudomonas putida</i> №12633	-	-	-
7.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> №13525	-	-	-
8.	<i>Proteus mirabilis</i> №523	-	-	-
9.	<i>Bordetella bronchiseptica</i> №22067	-	-	-
10.	<i>Yersinia ruckeri</i> №6	-	-	-
11.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-
12.	<i>Klebsiella pneumonia</i> №4463	-	-	-

Примечание: «+»- неустойчивость к антибиотику, «-» - устойчивость к антибиотику.

Таблица 17. Показатель колонеобразующих единиц на основах селективных сред.

Основы селективных сред	Колонеобразующие единицы (КОЕ)														
	Чашки Петри														
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
№1	32	43	49												
	Ср 41 КОЕ														
№2				54	48	58									
				Ср 53 КОЕ											
№3							76	64	72						
							Ср 71 КОЕ								
№4										79	84	81			
										Ср 81 КОЕ					
№5													98	87	103
													Ср 96 КОЕ		

Таким образом, мы пришли к выводу что, антибиотики нельзя использовать в качестве селективного агента в питательной среде для выделения *A.salmonicida*, т.к. все бактерии-ассоцианты устойчивы к антибиотикам, также как и референс-штамм *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658.

Разработка жидкой среды накопления и дифференциально-диагностической среды для выделения *Aeromonas salmonicida*

В качестве основы конструируемой жидкой среды, изучив литературные данные, было решено использовать пептон, являющийся источником аминокислот и витаминов, а в качестве источника углерода было решено использовать глюкозу. Для определения нужной концентрации данных веществ был проведен опыт по следующей схеме.

Суспензионная бактериальная культура *A.salmonicida* ATCC 33658 1×10^9 КОЕ/г титровали 1:10. Затем брали пробирку с суспензионным разведением *A.salmonicida* в 100 бактериальных клеток в 1 мл и производили посев в чашки Петри на испытываемые прототипы накопительных сред. Посев был произведен пастеровскими пипетками, в трехкратной повторности, в три чашки Петри.

Конструирование основы для селективной среды:

№ 1 — пептон — 1,0 г; глюкоза — 3,0 г

№ 2 — пептон — 2,0 г; глюкоза — 3,5 г

№ 3 — пептон — 3,0 г; глюкоза — 4,0 г

№ 4 — пептон — 4,0 г; глюкоза — 4,5 г

№ 5 — пептон — 5,0 г; глюкоза — 5,0 г

Контроль осуществляли на МПА. Чашки Петри культивировали при температуре 28 °С в течение 24 часов. Далее производили подсчет колонеобразующих единиц (КОЕ) (таблица 17). По результатам эксперимента, можно сделать вывод, что образец № 5 имеет лучшие показатели по КОЕ. Следовательно, питательной основой конструируемой среды будет пептон и глюкоза (по 5,0 г).

Согласно литературным данным, хорошей минеральной базой оптимального состава для *A.salmonicida* является набор солей фосфата калия двузамещенного (1,0 г), сульфата магния (0,2 г), хлорида натрия (5,0 г), хлорида бария (2,0 г). Соли калия, магния, натрия необходимы для синтеза микробной клетки, для образования бактериальных белков необходимы анионы, содер-

жащие серу. Соли бария эффективно ингибируют рост бактерий — ассоциантов рода *A. salmonicida*. Следовательно, данный набор солей целесообразно включить в накопительную среду в применяемых концентрациях. Бактерии *A. salmonicida* способны окислять глюкозу, поэтому в качестве индикатора снижения рН нами добавляется бромтимоловый синий (0,03 г).

В результате сконструированная нами среда для бактерий *A. salmonicida* A.Sl.1 – УГСХА имеет следующий состав: вода дистиллированная – 1000 мл, K_2HPO_4 – 1 г, $MgSO_4$ – 0,2 г, NaCl – 5 г, пептон – 5 г, бромтимоловый синий – 0,03 г, глюкоза – 5 г, BaCl – 2 г. рН готовой среды накопления = 7,1.

Способ приготовления – в дистиллированную воду добавляют пептон, минеральные соли, глюкозу, бромтимоловый синий. Среду доводят до полного растворения частиц, разливают в стерильные пробирки по 5 мл и автоклавируют при 0,5 атм в течение 20 минут. Готовая среда прозрачная, травянисто-зеленого цвета.

При изучении антибиотикоустойчивости референс-штамма *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658 нами было выявлено, что данный вид бактерий чувствителен к практически всем группам антибиотиков и антимикробных препаратов. Поэтому при конструировании плотной среды было решено использовать краситель конго рот, который придает среде дифференциально-диагностические свойства.

Нами была разработана плотная дифференциально-диагностическая среда A.Sl.2-УГСХА следующего состава - вода дистиллированная – 1000 мл, агар-агар – 15 г, пептон – 5 г, дрожжевой экстракт – 3 г, – 1 г, $MgSO_4$ – 0,2 г, K_2HPO_4 – 1 г, глюкоза – 5 г, конго-рот – 3 г. Концентрация компонентов была подобрана экспериментальным путем.

Калий фосфорнокислый двузамещённый и магний сернокислый обеспечивают электролитный состав среды, необходимый для биохимических процессов, пептон является источником аминокислот, дрожжевой экстракт – источник органического азота, углерода и витаминов. Агар-агар является желирующим

субстратом растительного происхождения, для создания плотной консистенции среды. Краситель конго-рот придает среде ярко-красный цвет. Глюкоза – источник углерода, необходимый для питания микроорганизмов.

Способ приготовления – все компоненты смешивали и доводили до кипения. Затем автоклавировали в течение 20 минут при 112 °С. pH готовой среды накопления – 7,1. Готовая среда – насыщенного красного цвета.

Колонии референс-штамма *A. salmonicida* ATCC 33658 мелкие, округлые, черного цвета, размером 0,2-0,5 мм, с гладкой поверхностью. Цвет среды рядом с колониями изменяется на черный (рисунок 21).

Определение специфичности разработанных сред A.sl.1-УГСХА и A.sl.2-УГСХА

Для определения специфичности разработанных нами сред – жидкой среды накопления накопления A.Sl.1-УГСХА и дифференциально-диагностической среды A.Sl.2-УГСХА был проведен посев штаммов бактерий – ассоциантов других видов и родов в пробирки со средой. Параллельно был поставлен контроль роста бактерий в пробирках с МПБ и на чашках Петри с МПА. Посевы культивировали в термостате в течение 24 ч. при T - 28 °С *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658, *Pseudomonas putida* № 12633, *Pseudomonas fluorescens* №13525, *Yersinia ruckeri* № 6, *Yersinia enterocolitica*, при T - 37 °С - *Pseudomonas aeruginosa* № 128, *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *Aeromonas sobria* ATCC 9071, *Aeromonas caviae* ATCC 12633, *Proteus mirabilis* №523, *Bordetella bronchiseptica* № 22067, *Klebsiella pneumonia* № 4463, *Escherichia coli* № 4.

В результате исследования на жидкой накопительной среде были получены следующие данные – на жидкой накопительной среде отсутствует рост следующих штаммов бактерий – *Pseudomonas aeruginosa* № 128, *Pseudomonas putida* №12633, *Pseudomonas fluorescens* №13525. Помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый наблюдался у следующих бактерий – *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658, *Aeromonas*

hydrophila ATCC 49140, *Aeromonas sobrea* ATCC 9071, *Aeromonas caviae* ATCC 15468, *Proteus mirabilis* №523, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* 4.

Изучение роста бактерий-ассоциантов на дифференциально-диагностической среде показало, что *Aeromonas sobrea* ATCC 9071 имеет сходный рост колоний с *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658 – колонии мелкие, черные, размером 0,2-0,5 мм, с гладкой поверхностью. Цвет среды рядом с колониями изменяется на черный. Остальные штаммы имеют отличительный рост колоний на данной среде.

Разработка схемы выделения и идентификации бактерии *A. salmonicida*

Бактериологическая схема выделения включает в себя разработанные нами жидкую среду накопления А.Сл.1- УГСХА, дифференциально-диагностическую среду А.Сл.2-УГСХА, а также биохимические тесты, выявляющие характерные для *A. salmonicida* свойства. Данные тесты были выбраны в ходе изучения биологических и биохимических свойств и включают в себя – тест на каталазу, оксидазу, окраска по Граму, ОФ-тест, подвижность, тест на наличие нитратредуктазной активности (способности восстанавливать нитраты в нитриты), на присутствие желатиназной активности.

Этапы исследования по разработанной нами схеме.

Референс – штамм *A. salmonicida* ATCC 33658 вносят в накопительную среду А.Сл.1- УГСХА объемом 4-5 мл и помещают в термостат на 18 ч при температуре 28 °С. На жидкой накопительной среде бактерии рода *Aeromonas* дают положительную реакцию, характеризующуюся изменением цвета среды с зеленого на желтый, а также помутнением субстрата и образованием осадка.

Затем из жидкой среды накопления, бактериологической петлей делается посев на плотную дифференциально-диагностическую среду А.Сл.2-УГСХА и инкубируются 18 ч при температуре 28 °С.

На среде А. Sl.2-УГСХА бактерии *A. salmonicida* образуют колонии округлой формы, размером 0,5-1 мм черного цвета, цвет среды вокруг колоний также чернеет.

Выросшие на селективной среде А. Sl.2-УГСХА колонии параллельно исследуют по тестам.

Производят окраску по Граму и микроскопию. Клетки *A. salmonicida* выявляются как грамотрицательные палочки.

Для определения ферментов оксидазы и каталазы производят посев выросших на среде А. Sl.2-УГСХА колоний на чашки Петри с мясопептонным агаром. После инкубирования при 28 °С 18 ч на поверхность выросших на мясопептонном агаре колоний наносят 1 % раствор 2-N-диметилпарафенилендиамина для определения оксидазы и 3 % раствор перекиси водорода для определения каталазы. *A. salmonicida* является оксидазоположительной (покраснение реактива в течение 20 сек) и каталазоположительной (образование пузырьков газа).

Определяют подвижность методом укола в столбик застывшего 0,3 % мясопептонного агара. После инкубирования в течение 18 ч при 28 °С проводят учет результатов. Бактерии *A. salmonicida* неподвижны (наличие роста микроорганизмов на полужидком агаре только по линии укола). Исследуют способность восстанавливать нитраты в нитриты. Для этого производят посев при помощи бактериологической петли в МПБ с нитратом калия. После инкубирования при 28 °С 18 ч в пробирки добавляют реактив – дистиллированная вода с крахмалом и йодистым калием и 10% водный раствор хлористоводородной кислоты. *A. salmonicida* способна к нитратредуктазе – происходит темно-синее окрашивание среды (рисунок 23).

Уколом производится посев в пробирки с тестом на наличие желатиназы. После инкубирования в течение 18 ч при 28 °С проводят учет результатов. Бактерии *A. salmonicida* разжижают желатин (среда в засеянной пробирке жидкая, в контрольной пробирке среда загустевает) (рисунок 24).

Для исследования способности микроорганизмов к ферментации глюкозы в аэробных и анаэробных условиях готовят среду

Хью-Лейфсона. После инкубирования 24-48 ч при T=28 °C проводят учет результатов, *A. salmonicida* способна к ферментации глюкозы как в аэробных, так и в анаэробных условиях (изменение цвета в пробирках с зеленого на желтый как в аэробных условиях, так и в анаэробных условиях) (рисунок 25).

Таким образом, предложенная нами схема позволяет выделить бактерии *A. salmonicida* из объектов внешней среды в течение 54-84 часов (рисунок 26).

С помощью предложенной схемы нами были выделены и изучены их морфологические, тинкторальные и биохимические свойства 23 штаммов бактерий вида *A. salmonicida* из объектов водной среды г. Ульяновска и Ульяновской области.

3.1.7 ЭНТЕРОБАКТЕРИОЗЫ И БАКТЕРИИ *ENTEROBACTER SPP.*

(Материал подготовлен по результатам исследовательской работы Е. В. Сульдиной).

Энтеробактер (*Enterobacter*) – род грамотрицательных палочкообразных перитрихальных споронеобразующих бактерий, факультативных анаэробов. Энтеробактеры входят в состав микрофлоры кишечника человека, а также обитает в кишечнике некоторых видов животных, встречается в почве, воде, пищевых продуктах.

Род *Enterobacter* входит в семейство энтеробактерии (*Enterobacteriaceae*), порядок энтеробактерии (*Enterobacteriales*), класс гамма-протеобактерии (γ proteobacteria), тип протеобактерии (*Proteobacteria*), царство бактерии.

Род энтеробактер включает следующие виды: *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter dissolvens*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii*.

В настоящее время ранее входящий в род энтеробактер вид *Enterobacter agglomerans* переименован в *Pantoea agglomerans*

и отнесён к вновь образованному роду *Pantoea*. *Enterobacter aerogenes* перенесён в род *Klebsiella*. *Enterobacter amnigenus* переименован в *Lelliottia amnigena*, *Enterobacter cowanii* – в *Kosakonia cowanii*, *Enterobacter gergoviae* – в *Pluralibacter gergoviae*, *Enterobacter intermedius* – в *Kluyvera intermedia*, *Enterobacter nimipressuralis* – в *Lelliottia nimipressuralis*, *Enterobacter pyrinus* – в *Pluralibacter pyrinus*, *Enterobacter sakazakii* – в *Cronobacter sakazakii*.

Распространение бактерии рода *Enterobacter*

Энтеробактерии широко распространены в природе, бактерии выделяют из воды, сточных вод, растений, пищевого сырья животного и растительного происхождения и готовых к употреблению продуктов. Кроме этого, бактерии рода *Enterobacter* являются представителями нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта человека и животных.

В исследованиях Шевелевой С. А. с соавторами.(2014) по выявлению потенциальных микробных рисков при изготовлении и хранении готовых к употреблению пищевых продуктов выявлено значительное разнообразие остаточной микрофлоры в овощах и салатах. Всего идентифицированы представители 14 родов семейства *Enterobacteriaceae*, включая *Enterobacter* (28 % культур). Наибольшая плотность контаминации (10^3 - 10^5 КОЕ/г) установлена для бактерий вида *E. cloacae* (10^2 - 10^3 КОЕ/г). Установлено также, что после обработки сырья хлорсодержащими средствами значимо (на 11 %) повышается удельный вес антибиотикоустойчивых штаммов в популяциях энтеробактерий, контаминирующих салатную продукцию.

Ю. А. Короткевич с соавторами (2015) выделили более 90 штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, из продуктов животного происхождения (сырых мясо- и птицепродуктов, сырого молока, а также готовых к употреблению продуктов - творога, сметаны, сыров рассольных, мороженого, готовых обеденных блюд и др.), приобретенных на предприятиях розничной торговли, сети общественного питания, мясокомбинатах и птицефабриках Центрального региона России. Частота выявления

Enterobacter spp в этих исследованиях составил 9 %, это третий по значимости результат после *Campylobacter jejuni* и *E.col.*

Н. Р. Ефимочкина с соавторами (2014, 2015) опубликовали данные о проведенных выборочных микробиологических исследованиях молочных продуктов промышленного и непромышленного производства в виде кисломолочных продуктов, сыра и биомороженого. Из 10 исследуемых образцов ни один не соответствовал установленным нормативам по количеству бактерий группы кишечных палочек. Всего авторами было выделено 17 штаммов условно-патогенных бактерий, в т.ч. *Enterobacter spp.*

При исследовании 13 образцов солода зерна и смывов с оборудования предприятий по производству напитков брожения Н. Р. Ефимочкина с соавторами выявили 32 культуры грамотрицательных аэробных и факультативно анаэробных бактерий, 29,6 % штаммов из которых принадлежали к бактериям рода *Enterobacter*. Этими же авторами при изучении видового состава микрофлоры, контаминирующей крахмалсодержащее сырье для спиртового производства (пробы цельного и дробленого зерна пшеницы, ячменя, овса, клубни картофеля, полученные из нескольких регионов Российской Федерации, а также по импорту, всего 17 проб), было выделено 53 штамма грамотрицательных, ферментирующих глюкозу бактерий. По результатам идентификации наиболее часто обнаруживаемыми стали представители рода *Enterobacter* (38,0 %). Этим же коллективом проведены микробиологические исследования уровней контаминации и видового состава бактерий семейства *Enterobacteriaceae* в свежих овощах и листовых салатах. Объектами исследования были образцы новых видов сырых овощных продуктов - салаты 8 видов, нарезанные овощи и их смеси, отобранные на основных этапах производства, включая антимикробную обработку гипохлоритом натрия, мойку и упаковку продукции в пленки под вакуумом. Анализ уровня загрязненности овощной и салатной продукции энтеробактериями показал, что их удельный вес в общей сумме микробных контаминантов достаточно высок. Содержание энтеробактерий варьировало в пределах от 2,14 до 3,34 lg КОЕ/г, достигая в отдельных

пробах значений 4,38-4,74 lg, сопоставимых с общим количеством посторонней бактериальной микрофлоры (КМАФАнМ) в тех же пробах. Установлено значительное видовое разнообразие микрофлоры, контаминирующей овощную продукцию. Однако, наиболее часто обнаруживались *Enterobacter spp.* – 37 % культур.

Enterobacter sakazakii, когда-то классифицированная как *Enterobacter cloaceae*, является причиной неонатального некротического энтероколита (НЭК), неонатального менингита и сепсиса. Обычный путь распространения – сухие молочные смеси. Хотя эта бактерия рассматривается как условно-патогенный микроорганизм, некоторые штаммы образуют энтеротоксины, вызывающие гибель мышей-сосунков. *Citrobacter freundii* был идентифицирован как причина неонатальных инфекций, источником которых были смеси для младенцев.

В исследовании 18 штаммов *E. sakazakii* 4 образовывали энтеротоксин, при внутрибрюшном введении 10^8 КОЕ/мышь все 18 выделенных штаммов вызвали летальный исход у мышей-сосунков (16–18 дневных), 2 штамма вызвали летальный исход при пероральном введении. В дополнение к мышам-сосункам, потенциальная вирулентность была выявлена на монослоях клеточных линий СНО, Vero и линии клеток коры надпочечников Y-1. Уровень детской смертности колеблется от 40 до 60 %. В результате вспышки (12 случаев) в 1998 г. в отделении интенсивной терапии в Бельгии умерли 2 младенца, *E. sakazakii* был выделен из неиспользованной готовой молочной смеси и неоткрытых банок отдельной партии. В исследовании на содержание энтеробактерий в 141 образце сухой молочной смеси из 35 стран 25 % содержали *Pantoea agglomerans*, 21 % — *E. cloaceae* и 14 % – *E. sakazakii*. В исследовании 120 сухих детских смесей из Канады 8 (6,7 %) содержали *E. sakazakii*. Минимальная температура роста проверенных выделенных штаммов в последнем исследовании была 5,5–8 °С, максимальная температура роста колебалась от 41 до 45 °С, средняя составила 42,5 °С для 11 выделенных штаммов. Невыделенные штаммы росли при 4 °С (Джей, Дж.М., 2011).

Устойчивость бактерий рода *Enterobacter*

Термоустойчивость *E. sakazakii* выше, чем у большинства грамотрицательных бактерий. Для 10 штаммов (5 клинических и 5 штаммов, выделенных из продуктов питания) в восстановленных сухих молочных смесях средняя величина D 60°C составила 2,5 мин и $z = 5,82$ °C. Средняя величина D 60 °C для 5 клинических штаммов была 2,15, и 3,06 - для 5 штаммов, выделенных из продуктов. В другом исследовании значение D 58 °C 12 штаммов из регидратированной детской сухой молочной смеси колебалось от 30,5 до 591,9 с (от 0,508 до 9,865 мин). Регидратирование сухой молочной смеси, в которую был внесен наиболее термоустойчивый штамм *E. sakazakii* ($z = 5,6$ °C), обнаруженный в последнем исследовании, при 70 °C позволило достичь > 4 -log снижение числа клеток. Согласно этим исследователям, предполагают, что обычный уровень этого организма в детской молочной смеси – 1 КОЕ/100 г сухой молочной смеси, 4-D обработка должна обеспечить его отсутствие после охлаждения перед кормлением младенца. Используемый термоустойчивый штамм был наиболее устойчивым из 12 исследованных.

Клетки *E. sakazakii* в стационарной фазе, как было сообщено, были более устойчивыми к осмотическому стрессу и высушиванию, чем *E. coli* и некоторые другие бактерии; его повышенная устойчивость была связана с накоплением трегалозы клетками в стационарной фазе. Последние исследователи нашли значения D 58 °C, равные 0,27–0,50 для 5 штаммов *E. sakazakii* по сравнению с 0,40–0,50 для трех штаммов сальмонелл (Джей, Дж. М., 2011).

Отмечена устойчивость бактерий рода *Enterobacter* к применяемым в практике дезинфектантам, их находили при контроле стерильности рук у персонала операционной (Красноголовец В. Н., Киселева Б. С. 1996)

При оценке чувствительности к антисептическим препаратам клинических штаммов микроорганизмом семейства *Enterobacteriaceae* А. А. Адарченко, А. П. Красильников, О. П. Собошук (1997) отметили низкие ингибирующие концентрации хлоргексидина, цетилпиридиния, борной кислоты

для бактерий рода *Enterobacter* по сравнению со штаммами *Escherichia*, *Citrobacter*.

Согласно литературным данным все энтеробактеры отличаются высокой устойчивостью к антибиотикам: амоксициллину, амоксициллин-клавулановой кислоте, цефалотину, мезлоцилину, цефатоксиму, тобрамицину, гентамицину и др. (Морозова О. Т., Прямухина Н.С.1996).

Изучение С. Н. Золотухиным (2007) чувствительности штаммов энтеробактер, выделенных от больных диареей поросят-сосунов к 10 антибиотикам (пенициллину, стрептомицину, гентамицину, эритромицину, левомицетину, оксациллину, линкомицину, ампициллину, полимексину М, тетрациклину) показало, что все культуры были чувствительны только к гентамицину.

При тестировании чувствительности к антибиотикам микроорганизмов выделенных из продуктов животного происхождения Ю. А. Короткевич с соавторами установили, что более 30 % исследуемых штаммов *Enterobacter spp* обладали мультирезистентностью.

Н. Р. Ефимочкина с соавторами опубликовали данные об исследованиях антибиотикочувствительности 17 штаммов бактерий, выделенных из молочных продуктов. Ученые установили, что два штамма бактерий рода *Enterobacter* были устойчивы ко всем тетрациклиновым антибиотикам, ампициллину, и один из них – к хлорамфениколу.

Исследования проведенное Шипицыной И. В. с соавторами (2017) на 18 клинических штаммах бактерий *E.cloacae*, выделенных из свищей в дооперационном периоде и из очага воспаления во время операции у пациентов с хроническим остеомиелитом длинных трубчатых костей, показало наличие 100 % устойчивости их к ампициллину, цефтриаксону, амоксиклаву. Среди 16 используемых антибактериальных препаратов наибольшей эффективностью в отношении штаммов *E.cloacae*, по мнению ученых, обладали карбопенемы - имипенем и меропенем.

А. Hernandez, R. Mellado (1998) определили, что рост в присутствии ванадия приводит к фенотипу множественной лекар-

ственной устойчивости штаммов. Имеются данные о резистентности штаммов *E.aerogenes* и *E.cloacae* к токсичности кадмия, хрома, соединениям мышьяка.

Чувствительность к солевому стрессу у штаммов *Enterobacter* изучали R. Rai, G. Kieder (1996). Штаммы показывали оптимальный рост при 0.5 – 1 % NaCl на минимально безазотной среде с глюкозой в течение 28 ч инкубации, хотя лучший рост наблюдается при 3 – 2 % NaCl спустя 52 и 100 ч инкубации по сравнению с 28 часовой культурой.

В. И. Сергевнин с соавторами экспериментально установили, что штамм *E. cloacae*, обладающий неполной чувствительностью к дезинфектантам, группы четвертично-аммониевых соединений, приобретает устойчивость к препаратам в концентрации, являющейся по отношению к эталонным штаммам микроорганизмов бактерицидной, после 2–12-го воздействия.

При изучении толерантности энтеробактерий к хлорсодержащим биоцидным средствам Н. Р. Ефимочкина с соавторами установили, что только концентрации 200 и 150 мг/дм³ активного хлора подавляли рост бактерий рода *Enterobacter* либо значительно ингибировали рост штаммов на 3,5–4,7 логарифмических порядка.

А. В. Портянко, М. В. Задорожная, О. А. Сунцова и др. (2016) изучал действие пектинов на условно-патогенные микроорганизмы, в т. ч. *Enterobacter cloacae*. Исследователи зарегистрировали антимикробное действие пектинов «Я», «М», «И» уже через 3 часа у 1-5 %-ных растворов в 80-100 %, 60-100 %, 40-60 % культур *Enterobacter cloacae* (n = 5). Пектин «Ц» оказал активность в отношении 20-100 % проб после 5 часов взаимодействия бактерий с 0,5-5 %-ными растворами. При увеличении времени контакта пектинов с микроорганизмами увеличивалось и их антимикробное действие. Через 5 часов оно достигало 100% у 1-5 %-ных растворов пектинов «Я» и «М» (кроме 3 %-ного пектина «Я»), у 3-5 %-ных пектина «Ц» и 2-5 %-ных пектина «И». Через 7 часов 1-5 %-ные растворы всех пектинов и 0,5 %-ный пектин «И» губительно действовали на микроорганизм. Через 24 часа рост культуры отсутствовал (100 %) под воздействием всех пектинов.

3.2. ПОДХОДЫ К ДЕКОНТАМИНАЦИИ ПИЩЕВЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ

Наиболее распространенными методами по сохранению продукции и продлению сроков годности являются низкая температура хранения и химические способы воздействия на ферментацию, окисление и микробный рост.

В настоящее время в пищевой промышленности, используются средства, препятствующие развитию микроорганизмов, которые содержат в своем составе нитриты, сульфиты и органические кислоты, что оказывает негативное воздействие на здоровье человека.

Нитриты, как правило, используют в виде солей (нитрит натрия или нитрит калия) для подавления роста *S. aureus*, *Y. enterocolitica* и токсинпродуцирующего *Cl. botulinum* в мясной и рыбной продукции.

Сульфиты активны в отношении плесени, дрожжей и аэробных грамотрицательных бацилл. Сульфит натрия используется в качестве противомикробного агента в мягких фруктах, напитках, колбасных изделиях и свежих креветках. Использование сульфитов, как консервантов выбора, в мясной и рыбной продукции ограничено из-за разрушения тиамина, и их запрещается применять в Канаде, как пищевые добавки в мясной и рыбной продукции.

Консерванты на основе молочной кислоты (лактат) также обладают антимикробными свойствами: ингибируют рост бактерий и снижают уровень pH в продукте питания. Использование данных консервантов способствует увеличению сроков годности и улучшению химических качеств обработанной продукции.

Повышенный потребительский спрос на полуфабрикаты высокого качества с длительным сроком хранения в последние 20 лет инициировал развитие инновационных технологий, сохраняющих их естественный и свежий вид длительное время, но в то же время безопасных для здоровья человека.

В 2007 г. Yagiz опробовал способ обработки под высоким давлением как один из перспективных методов консервации морепродуктов. В процессе своего исследования он обрабатывал рыбное филе без кожи под давлением от 130 до 600 МПа, после чего хранил его при температуре 4 °С. При этом давление в 300 МПа эффективно снижало микробиологическую обсемененность продукта на несколько порядков. Данный метод с различными вариациями использовали Erkan и Briones в 2010 г. и Chouhan в 2015 г. Обработка высоким давлением значительно замедляла микробный рост, оптимально влияла на окисление липидов и внешний вид продукции.

В 2008 г. В. Giatrakou с соавт. исследовали влияние различных способов деконтаминации рыбного филе, хранившегося при 4 °С в течение 16 дней, для улучшения его качества и увеличения срока годности. В опыте они использовали следующие методы обработки: газовая модифицированная среда (5 % O₂; 50 % CO₂; 45 % N₂, обработка М), масло орегано как естественный консервант (0,1 % г/мл; обработка О), а также их комбинацию (обработка МО). Наиболее эффективным методом подавления микробной порчи оказалась обработка МО, при которой достигалось продление срока годности продукции на 8–9 дней.

В 2008 г. Mohan O. с коллегами провели исследование, в котором оценивали эффективность влияния поглотителя кислорода на срок годности стейка сома в охлажденных условиях. Поглотитель кислорода в течение 24 ч снижал концентрацию O₂ в упаковке до 0,42 %. Снижение кислорода оказывало положительное влияние на параметры качества продукции по сравнению с контрольными образцами. На основании органолептических, микробиологических и химических данных контрольные образцы оставались пригодными для употребления в пищу на 10-й день хранения, а продукция в упаковке с поглотителем кислорода – до 20 дней хранения.

N. Oral в 2008 г. с соавторами использовали антимикробный лед для продления срока годности рыбы. Чтобы предотвратить порчу пресноводной рыбы, они помещали ее в лед, состоящий из

гидролата дикого тимьяна (*Thymus serpyllum*) и водопроводной воды, хранили в течение 20 дней при 4 °С. Органолептическая оценка, микробиологические и химические анализы показали, что хранение рыбы на антимикробном льду значительно продлевало срок годности продукта от 15 до 20 дней.

В 2008 г. Gong Chen с группой ученых сравнивали три типа упаковочных систем на стабильность хранения полуфабрикатов при температуре 2 °С. Хранение в газовой модифицированной среде (80 % CO₂; 10 % O₂; 10 % N₂) практически полностью ингибировало рост аэробных и колиформных бактерий по сравнению с поливинилхлоридной и вакуумной упаковкой, что существенно увеличивало срок годности продукции.

S. Diao, L. Pastoriza в 2008 г. И. A. Gonçalves в 2009 г. описали работы, в которых применяли лед с высокой концентрацией озона. Результаты показали, что использование озона увеличивает срок годности продукции на 3–5 дней и снижает микробный рост на 91 %.

В 2008 г. B. Zambuchini с коллегами оценивали эффект эллаговой кислоты (EA) и L-аскорбиновой кислоты (L-AA)/аскорбата натрия (SA) в комбинации и индивидуально на микробиологическую чистоту свежей рыбы, хранившейся при 0 °С. Результаты показали, что добавление EA или EA в сочетании с LAA/SA приводило к задержке роста аэробных бактерий и продлевало срок хранения продукта до 10 дней по сравнению с контрольными образцами, которые оставались свежими менее 8 дней.

Mbarki и S. Moïni оценивали влияние различных доз гамма-облучения на качество охлажденной скумбрии. Свежие образцы скумбрии облучали в дозе 1,5, 3, 4,5, 6 и 7,5 кГр и хранили в холодильнике в течение 21 дня. Микробиологические анализы показали наличие мезофильных и психрофильных микроорганизмов на поверхности рыбы перед облучением. Данные микроорганизмы не обнаруживались после прохождения гаммаоблучения при дозах $\geq 1,5$ кГр. Результаты показали, что облучение усиливает скорость окисления липидов, однако примененное в

малых дозах, оно оказалось эффективным для продления срока годности до 21 дня.

Kykkidou, S. Angis, M. Kostaki в своих работах исследовали эффект эфирного масла тимьяна и упаковывание в модифицированной газовой среде на рыбное филе при температуре 4 °С. Эфирное масло тимьяна в комбинации с модифицированной газовой средой ингибировало рост *Pseudomonas* и H_2S продуцирующих бактерий. Представители *Enterobacteriaceae* обнаруживались в меньшем количестве относительно контрольных образцов. Комбинированное воздействие тимьяна в модифицированной газовой среде приводило к увеличению сроков годности свежей рыбы.

S. Aubourg (2009), V. Álvarez (2009), N. Costanzo (2014) использовали двойную систему охлаждения для увеличения сроков годности свежей рыбы, состоящую из озона и потока льда. Свежую рыбу обрабатывали в озонированном потоке льда, что приводило к снижению аэробов и психротрофов на поверхности и протеолитических бактерий в мышцах опытных тушек. Данный способ показал существенные микробиологические, биохимические и органолептические различия между обработанными и контрольными образцами.

В 2009 г. S. Mexis с коллегами провели исследование, в котором изучали комбинированное воздействие поглотителя O_2 и эфирного масла орегано на филе радужной форели при температуре 4 °С для продления его срока годности. Срок годности контрольных образцов составил 4 дня, 7–8 дней для образцов, содержащих масло орегано, 13–14 дней для образцов с использованием поглотителя O_2 и 17 дней для образцов, содержащих поглотитель O_2 вместе с маслом орегано.

В 2009 г. R. Mbarki с соавт. наблюдали влияние гамма-облучения и хранения в вакуумной упаковке на срок годности филе скумбрии. В ходе эксперимента они показали, что использование вакуумной упаковки в сочетании с низкими дозами гамма-облучения (1,5 кГр) улучшает микробиологическую чистоту,

подавляя рост и развитие микроорганизмов, смягчает химические изменения и продлевает срок годности продукта на 7 дней.

В 2010 г. L. Frangos с группой ученых оценивали влияние соли и эфирного масла орегано на свежее филе радужной форели в вакуумной упаковке при температуре 4 °С. Добавление соли продлевало срок годности продукта до 9 дней, в то время как комбинированное применение соли с эфирным маслом орегано в вакуумной упаковке значительно увеличивало срок годности филе – на 11–12 дней.

В 2010 г. С. Mohan с коллегами провели эксперимент по влиянию сниженного уровня кислорода (0,01 % O₂) с добавлением ацетата натрия на микробиологическую чистоту стейка скумбрии при охлажденном хранении (1–2 °С). Стейк скумбрии в условиях сниженного O₂ сохранял свой срок годности до 20 дней, а в условиях сниженного O₂ с добавлением ацетата натрия – до 25 дней, контрольные образцы оставались приемлемыми к потреблению только 12 дней.

В 2010 г. В. Угрозов, И. Громов предложили добавлять пищевую добавку «Варэкс-7» в воду, из которой изготавливался лед, что обеспечивало микробиологическую безопасность продукта в течение 33 суток в чешуйчатом и 45 суток в гелеобразном льду.

В 2010 г. В. Souza с группой ученых провели исследование по влиянию хитозанового покрытия на продление срока годности филе лосося. Для анализа срока годности филе покрывали хитозаном и хранили при температуре 0 °С в течение 18 дней. С точки зрения микробного роста, медленное развитие общего количества аэробных микроорганизмов на обработанных поверхностях доказывало, что хитозан увеличивает срок годности филе лосося на 3 дня.

В 2010 г. Sureerat Phuvasate, Yi-Cheng Su провели исследование, в котором использовали электролизированную окисленную воду и лед для подавления гистаминпродуцирующих бактерий на разделочной поверхности из нержавеющей стали, являющейся элементом рыбоперерабатывающего конвейера, и на поверхности свежей рыбы. При погружении разделочной поверхно-

сти в электролизированную окислительную воду на 5 мин титр бактерий на поверхности падал $>5,4 \log\text{KOE}/\text{см}^2$, а бактерии *E. cloacae*, *K. pneumoniae* и *P. hauseri* на поверхности рыбы не выживали. А при погружении на 24 ч *E. aerogenes* и *M. morgani* снижались на 2,4 и 3,5 $\log\text{KOE}/\text{см}^2$ соответственно.

N. Pyrgotou, I. Atrea оценивали эффективность использования эфирного масла орегано на свежесоленном филе радужной форели, упакованном в модифицированной газовой среде и хранившемся в течение 21 дня при температуре 4 °С. Использование эфирного масла орегано увеличивало срок хранения филе свежей форели на 7–8 дней.

В 2011 г. Д. А. Ефименкова, В. Г. Урбан провели исследования по продлению сроков хранения охлажденной форели. В опыте они использовали добавку «Флавит пищевой» в смеси с аскорбиновой кислотой. В результате при хранении форели во льду с добавлением Флавита и аскорбиновой кислоты рыба сохраняла свою свежесть до 11 сут.

Yongling Song с соавт. в 2011 г. провели эксперимент, где использовали альгинат кальция, содержащий витамин С, для сохранения и продления срока годности охлажденной рыбы при температуре 4 ± 1 °С. Сравнив микробиологические, химические и органолептические показатели, был сделан вывод об улучшении качества обработанной рыбы в сравнении с контролем.

Nuray Erkan с соавт. в 2011 г. провели исследование, в котором изучали влияние тимьянового и лаврового эфирных масел на сохранение качества рыбы во время хранения на льду. По результатам сравнения органолептических, химических, физических, физико-химических и микробиологических показателей можно сказать, что срок годности обработанных образцов увеличивался на 3–4 дня по сравнению с необработанными образцами.

В 2011 г. Т. Ф. Киселева и др. предложили способ охлаждения рыбы с нанесением снегообразного диоксида углерода на поверхность рыбы. Снегообразный CO_2 подавался во внутреннюю полость рыбы. Далее рыба помещалась в герметичную упаковку, позволяющую сохранять внутри углекислотную среду в те-

чение всего срока хранения рыбы. В результате рыба сохраняла привлекательный внешний вид и хорошие физико-химические и микробиологические показатели в течение 10 суток.

В 2012 г. Y. Xu с коллегами провели исследование влияния специфических антител яичного желтка (IgY) на качество и срок годности охлажденной рыбы. Во время хранения охлажденного филе при температуре 4 ± 1 °C рост микроорганизмов на обработанной рыбе существенно замедлялся в сравнении с контрольными образцами. Срок годности опытных образцов приблизительно продлевался с 9 до 12–15 дней.

В 2012 г. Р. В. Артемов предложил охлаждать рыбу в льдо-водо-солевой (ЛВС) системе с использованием ультразвукового генератора. Проведенные исследования функционально-технологических и микробиологических показателей охлажденной рыбы выявили, что охлаждение рыбы в ЛВС с УЗ - обработкой позволило увеличить срок годности охлажденной рыбы до 25 сут с сохранением качественных характеристик при следующих параметрах УЗ воздействия: интенсивность – 2 Вт/см²; время воздействия – 30 мин; расстояние от излучателя УЗ-генератора до поверхности образца рыбы – 10 мм.

В 2012 г. М. Tsiligianni с коллегами провели исследование, в котором оценивали эффективность хитозана в сочетании с вакуумной упаковкой на срок годности стейков свежей рыбы. Результаты данного исследования показывают, что стейки, обработанные хитозаном, в вакуумной упаковке сохранялись до 17 дней.

В 2012 г. Т. Li с соавт. показали эффект применения полифенолового чая и экстракта розмарина в сочетании с хитозаном на сохранение исходного качества рыбы при хранении в холодильнике (4 ± 1 °C). Результаты показали, что обработанные образцы сохранялись в пригодном к употреблению состоянии до 8–10 дней.

В 2013 г. Т. Li с коллегами провели работу по исследованию влияния экстракта виноградных косточек (GS) и чайных полифенолов (TP), как природных консервантов, в сочетании с хитоза-

ном (Ch) на качество рыбного филе при холодильном хранении. Два разных образца (Ch+GS и Ch+TP) и контроль хранили при температуре 4 ± 1 °C в течение 20 дней. Результаты показали, что образцы, обработанные консервантами, лучше сохраняют качество и могут храниться дольше на 6–8 дней по сравнению с контрольной группой.

В 2014 г. А. Bensid с группой ученых провели исследование, в котором оценивали эффективность льда, содержащего экстракт тимьяна, орегано и гвоздики, на качество и срок годности охлажденных анчоусов. Согласно органолептическому анализу, анчоусы сохранялись до 12 дней во льду с экстрактами, в то время как в обычном льду они хранятся 9 дней. Применение такого льда приводило к значительному снижению аэробных мезофильных и психрофильных бактерий на поверхности и в мышцах анчоусов, по сравнению с контрольными образцами.

В 2015 г. М. Jasour с коллегами объединили хитозановое покрытие с лактопероксидазной системой для консервации рыбы. На основании антимикробной активности лактопероксидазной системы в данном исследовании оценивали влияние лактопероксидазы с раствором хитозана на качество и срок годности радужной форели при хранении в холодильнике при температуре 4 ± 1 °C в течение 16 дней. Результаты показали, что в консервированных образцах значительно снижались уровни *Shewanella putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, психрофильных и мезофильных бактерий, по сравнению с контрольными образцами и обработанными только хитозаном. Законсервированные образцы сохраняли свои органолептические свойства на 4 дня дольше, до 16-го дня по сравнению с контрольными образцами.

Один из широко применяемых на сегодняшний день в пищевой промышленности консервантов — низин является единственным бактериоцином, одобренным FDA (США) и ВОЗ для использования в качестве пищевого биоконсерванта для различных видов продуктов более чем в 50 странах мира. Низин – натуральный консервант для многих пищевых продуктов. Данный бактериоцин продуцируется грамположительными молочнокис-

лыми бактериями *Lactococcus lactis*. Он способен даже в достаточно низких концентрациях подавлять рост *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *C. botulinum* и ряда других грамположительных патогенных бактерий, вызывающих порчу пищевых продуктов. Кроме того, низин термически стабилен, нетоксичен и может применяться самостоятельно или в комбинации с другими консервантами или с физическими методами обработки.

В 2008 г. Tsironi с соавт. исследовали влияние низина на качество и срок годности охлажденной рыбы, осмотически обработанной и хранившейся в газовой модифицированной среде (50 % CO₂–50 % воздух) при разных температурных значениях. Оценку качества проводили по микробиологическим и органолептическим показателям, уровням летучих оснований, триметиламина, продуктов окисления липидов (TBARS – тиобарбитурореактивные вещества). Образцы охлажденной рыбы, обработанные низином и хранившиеся в модифицированной газовой среде, сохраняли исходное качество лучше с точки зрения микробиологических, химических и органолептических показателей. Значительно, до 48 дней при температуре 0 °С, продлевался и срок годности обработанных образцов в сравнении с контрольными, хранившимися не более 10 дней.

В 2009 г. M. Asghari с коллегами исследовали влияние низина Z (0,02 %) и ацетата натрия (2 г/100 мл) на параметры качества свежей рыбы, хранившейся в вакуумной упаковке при температуре 4 °С в течение 9 дней. Оценивали микробиологические и химические показатели, значение pH, общий белок и влажность. Результаты микробиологических исследований показали значительное снижение психрофильных, молочнокислых и общего числа бактерий в образцах, обработанных низином в сочетании с ацетатом натрия. По данным химических и микробиологических показателей совместное применение ацетата натрия с низином Z увеличивало срок годности охлажденной рыбы, хранящейся в вакуумной упаковке при 4 °С до 5 дней.

Tsironi с соавт. в 2010 г. упаковывали осмотически обработанную охлажденную рыбу в газовую модифицированную сре-

ду с добавлением низина в качестве антимикробного агента. Опытные образцы при последующем хранении в холодильнике дольше сохраняли исходное качество с точки зрения микробиологической чистоты, биохимических и органолептических показателей.

Оптимизм по поводу широкого применения низина в пищевой отрасли в последнее время сменился на скептическое отношение к этому бактериоцину из-за растущего числа публикаций, описывающих появление резистентных штаммов пищевых патогенов.

Перечисленные физические, химические и биологические методы консервации охлажденной рыбы имеют общие недостатки, часто маскируемые разработчиками. Это, в первую очередь, изменение органолептических свойств, возникающее в процессе хранения продуктов под воздействием применяемых консервирующих процедур, зачастую искусственное продление сроков годности продуктов питания сопровождается снижением исходной экологической чистоты и пищевой ценности продуктов. Серьезной проблемой последнего десятилетия является все возрастающая частота появления и накопления в пище антибиотикорезистентных штаммов условно-патогенных бактерий, эволюционное формирование которых происходит под воздействием бактерицидных соединений химического происхождения, применяемых в сельском хозяйстве и пищевой отрасли. Подпороговые концентрации антибиотиков, присутствующие в пище, влияют и на микрофлору человека, формируя микроорганизмы с множественной лекарственной устойчивостью, резистентные к стандартным терапевтическим воздействиям. В этой связи особую актуальность приобретают инновационные способы деконтаминации продуктов питания, описанные ниже.

Инновационные способы деконтаминации продуктов питания

Бактериофаговый биопроцессинг – это применение бактериофагов для деконтаминации овощей, фруктов, мяса, рыбы и т.д. в процессе их заводской переработки перед упаковкой готовой

к употреблению продукции. За рубежом для деконтаминации пищевых продуктов используют фагосодержащие пищевые добавки, которые с успехом применяются для биоконтроля микробиологического роста, т.е. сохранения исходной микробиологической чистоты продуктов питания.

Рост числа спорадических случаев и вспышек инфекций, передаваемых пищевым путем, в начале 2000-х гг., в частности листериоза, стал серьезным вызовом для системы здравоохранения США и ряда стран Западной Европы, потребовавшим, наряду со все возрастающей борьбой за экологическую чистоту продуктов питания, создания новых способов борьбы с возможной контаминацией готовых к употреблению пищевых полуфабрикатов (Ready-to-eat-(RTE)-product). Так, в 2009 г. Susanne Guenther с соавт. провели эксперимент по оценке возможности использования двух бактериофагов, A511 и P100, для элиминации *L. monocytogenes* в RTE-продуктах, в которых данный возбудитель встречается достаточно часто. Пищевые образцы были искусственно контаминированы бактериями в титре 1×10^3 КОЕ/г, бактериофаги в титрах 3×10^6 БОЕ/г и 3×10^8 БОЕ/г наносили на продукты спустя 1–2 ч, чтобы дать бактериям адаптироваться, после чего закладывали образцы на хранение при 6 °С в течение 6 дней. Результаты исследования показали, что в жидких продуктах, таких как шоколадное молоко и сырный рассол, благодаря беспрепятственному перемещению фаговых частиц полная эрадикация бактерий происходила достаточно быстро. В то время как на твердых пищевых продуктах фаги также снижали уровень бактериальной обсемененности, но не более чем на 5 логарифмических единиц относительно контрольных образцов. По мнению исследователей, применение бактериофагов для деконтаминации RTE-продуктов в высоких концентрациях (3×10^8 БОЕ/г) оказывается более эффективным, чем в низких дозах (3×10^6 БОЕ/г).

Наряду с *L. monocytogenes*, в США и странах Западной Европы в этот период возросло число случаев Food-borne infections, вызванных *E. coli* O157:H7. В качестве иллюстрации возможного

применения бактериофагов в борьбе с этим пищевым патогеном в 2009 г. Sharma Manan с соавт. провели исследование, в котором оценили эффективность воздействия коктейля из трех бактериофагов (ЕСР-100), активных в отношении *E. coli* O157:H7, на контаминированные этим патогеном свежесрезанные листья капусты и куски дыни. Листья капусты инфицировали *E. coli* O157:H7 в титре 3,76 lg (КОЕ/см²), и после подсушивания опытные образцы аэрозольно обрабатывали коктейлем бактериофагов ЕСР-100 в титре 7,98 lg (БОЕ/см²), а контрольные – фосфатносолевым буферным раствором. После деконтаминации листья хранили в течение 2 дней при температуре 4 °С. Нарезанные кусочки дыни контаминировали *E. coli* O157:H7 в титре 4,55 lg (КОЕ/мл), затем контрольные образцы обрабатывали таким же буферным раствором, а опытные – коктейлем фагов ЕСР-100 в титре 6,69 lg (БОЕ/мл). Деконтаминированные кусочки дыни хранили в течение 7 дней при температурах 4 и 20 °С. На 0, 2, 5 и 7-й день образцы дыни гомогенизировали для определения в них уровня *E. coli* O157:H7. Количество кишечной палочки на листьях салата, обработанных бактериофагом на 0, 1 и 2-й день, составляло 0,72, <0,22 и 0,58 lg (КОЕ/см²), что было существенно ниже, чем на контрольных образцах, обработанных буферным раствором: 2,64, 1,79 и 2,22 lg (КОЕ/см²) соответственно. Количество кишечной палочки в обработанных коктейлем фагов образцах нарезанной дыни, хранившихся при температуре 4 °С, на 2, 5 и 7-й день составляло 0,77, 1,28 и 0,96 lg (КОЕ/мл), что было значительно ниже, чем в контроле: 3,34, 3,23 и 4,09 lg (КОЕ/мл) соответственно. При температуре 20 °С существенных различий в обработанных и контрольных образцах не наблюдалось. В заключение авторы особо подчеркнули следующее биологическое свойство фагового коктейля: он более выраженно элиминировал кишечную палочку в продукте при холодильном хранении, чем при температуре 20 °С.

Soni в публикациях 2009 и 2010 гг. показал антилистериозную активность технологического вспомогательного средства Listex на основе бактериофага P100, эффективно лизирующего

L. monocytogenes на поверхности охлажденного филе лосося. В своих работах он продемонстрировал возможности фаг-опосредованной контаминации в зависимости от времени контакта бактериофага с продуктом при различных температурах хранения охлажденного филе лосося. Образцы филе искусственно контаминировали смесью, содержащей два серотипа бактериальных клеток *L. monocytogenes*, с общим титром 4,3 lg (КОЕ/г). Затем на поверхность филе наносили бактериофаг Р100 в титре 2×10^7 БОЕ/мл. Уровень листериозной нагрузки снижался на 1,4–2,0 lg (КОЕ/г) при температуре хранения филе 4 °С, на 1,7–2,1 lg (КОЕ/г) при 10 °С и 1,6–2,3 lg (КОЕ/г) при комнатной температуре (22 °С). 30-минутная обработка бактериофагом контаминированного филе снижала листериозную нагрузку более чем на 1 lg (КОЕ/г), в то время как 15-минутная деконтаминация уменьшала количество листерий на поверхности филе менее чем на 1 lg (КОЕ/г). Более высокие концентрации бактериофага 10^8 БОЕ/г снижали уровень листериозной нагрузки с 2, 3 и 4,5 до 1,8, 2,5 и 3,5 lg (КОЕ/г) при температуре хранения образцов 4, 10 и 22 °С соответственно. При обработке бактериофагом в течение 10 дней при температуре 4 °С бактериофаг Р100 элиминировал листерии на поверхности образцов до уровня 0,3 lg (КОЕ/г), в то время как их количество на необработанных фагом экземплярах достигало 2,6 lg (КОЕ/г). Титр бактериофага на поверхности филе оставался стабильным в течение 10 дней хранения образцов, лишь незначительно снижаясь на 0,6 lg (БОЕ/г) от исходного количества фаговых частиц, нанесенных на образцы 8 lg (БОЕ/г). Проведенные эксперименты показывали высокий листерицидный эффект бактериофага Р100 на поверхности рыбного филе.

В 2011 г. Susanne Guenthera и Martin J. Loessner предложили использовать бактериофаги для обработки мягких сортов сыра как наиболее эффективный способ борьбы с пищевыми патогенами, не изменяющий исходные пищевые свойства продукта. В своем исследовании они применяли листериозный бактериофаг А511, обладающий широким спектром литической активно-

сти, для эрадикации *L. monocytogenes* в процессе производства двух типов мягких сыров: камамбер и лимбургер. Первоначально поверхности образцов сыра до созревания искусственно контаминировали *L. monocytogenes*, штаммами Scott A (серовар 4b) и CNL 103/2005 (серовар 1/2a) в титре от 10^1 до 10^3 КОЕ/см². Однократная обработка сыра камамбер фагом A511 в титре 3×10^8 БОЕ/см² снижала исходный уровень жизнеспособных клеток штамма Scott A (10^3 КОЕ/см²) на конец срока его созревания (21-й день эксперимента) на 2,5 логарифмических порядка. Уровень листерий в конце созревания обработанного фагом лимбургера (22-й день эксперимента) при такой же исходной контаминации упал на 3 порядка. При более низкой первоначальной контаминации листериями (10^1 – 10^2 КОЕ/см²) количество жизнеспособных бактериальных клеток в конце созревания сыра было ниже уровня детекции, что более чем на 6 порядков отличалось от микробиологической загрязненности контрольных образцов.

В 2012 г. Carter C. D. с группой ученых оценивали эффективность коктейля на основе бактериофагов EcoShield™, активного в отношении *E. coli* O157:H7, при обработке говядины. Большинство продуктов, которые подвергаются высокому риску контаминации *E. coli* O157:H7, как правило, транспортируются и хранятся в охлажденном или замороженном состоянии, в таких условиях кишечная палочка, как правило, практически не размножается. Учитывая этот факт, в процессе эксперимента искусственно контаминированные бифштексы, деконтаминированные EcoShield™, и контрольные образцы, обработанные PBS буфером, хранили в течение суток при температуре 4 °С. Количество жизнеспособных клеток кишечной палочки определяли на 0, 1, 5 и 7-е сутки. Применение коктейля бактериофагов приводило к значительному снижению концентрации клеток *E. coli* O157:H7 (на 94–8 %) на обработанном фагом бифштексе в сравнении с контрольными образцами.

В 2012 г. Susanne Guenther с группой ученых провели опыт по биоконтролю за *Salmonella typhimurium* с помощью вирулентного фага FO1-E2 на продуктах, готовых к употреблению (RTE).

Образцы искусственно контаминировали сальмонеллой в титре 1×10^3 КОЕ, затем наносили бактериофаг в титре 3×10^8 БОЕ/г и инкубировали 6 дней, при температуре 8 и 15 °С. При температуре хранения 8 °С жизнеспособные клетки не обнаруживались после нанесения бактериофага, что свидетельствовало о снижении уровня контаминации сальмонеллой более чем на 3 порядка. При температуре хранения 15 °С уровень *S. typhimurium* снизился на 5 логарифмических единиц на поверхности мяса индейки и молочном шоколаде, а также снизился на 3 порядка на хот-догах и морепродуктах.

В 2013 г. D. Spricigo с соавт. провели эксперимент, в котором оценивали эффективность коктейля бактериофагов (UAB_Phi20, UAB_Phi78 и UAB_Phi87), активных в отношении сальмонелл, на четырех различных продуктах питания (свиная кожа, куриная грудка, свежие яйца и запакованные листья салата). Образцы экспериментально заражали *Salmonella enterica*, серовар *Enteritidis*, и *S. enterica*, серовар *Typhimurium*. Образцы свиной кожи опрыскивали фаговым коктейлем, а затем инкубировали при 33 °С в течение 6 часов, что приводило к значительному снижению бактериальных клеток, более чем на 4 и 2 $\log/\text{см}^2$ для *S. typhimurium* и *S. enteritidis*, соответственно. Значительное снижение наблюдалось и на поверхности куриных грудок (значение *S. typhimurium* и *S. enteritidis* снижалось на 2,2 и 0,9 $\log_{10}$ КОЕ/г соответственно), которые погружали на 5 мин в коктейль бактериофагов, а затем закладывали на 7 дней в холодильник при температуре 4 °С. Значительное снижение бактериальной контаминации также можно было наблюдать у упакованного длиннолистого салата, обработанного аналогичным образом и хранившимся в течение 60 мин при комнатной температуре и перемешивании при 100 об/мин. Уровни *S. typhimurium* и *S. enteritidis* на листьях салата снижались на 3,9 и 2,2 $\log_{10}$ КОЕ/г, соответственно. Также снижение бактериальной нагрузки 0,9 $\log_{10}$ КОЕ/ см^2 наблюдалось на свежих яйцах, опрысканных коктейлем бактериофагов, затем инкубированных при температуре 25 °С в течение 2 ч.

В 2013 г. М. Oliveira с группой ученых исследовали эффективность бактериофага ListexP100 на ломтиках дыни и соках дыни, груш и яблок. Применение бактериофагов оказалось более эффективным на поверхности дыни и груши, но на поверхности яблок никаких изменений не произошло. Уровень листерий снижался на 1,50 и 1,00 logKOE на ломтиках дыни и груши, соответственно. В соках снижение листерий было явно выражено, так, количество бактериальных клеток в дынном соке сократилось на 8 logKOE/мл, а в грушевом соке – на 2,10 logKOE/мл после 8 дней хранения. В яблочном соке количество листерий не снижалось под действием бактериофага, а само количество бактериофагов снизилось до неопределяемого уровня, что было связано с высоким уровнем pH в яблочном соке [142].

В 2013 г. О. Voyacioglu с соавт. оценивали эффективность коктейля бактериофагов *EcoShield*TM против налидиксово-устойчивой энтерогеморрагической кишечной палочки O157:H7 RM4407 (EHEC), на листьях зелени, хранившихся в окружающей среде и в модифицированной газообразной оболочке (5 % O₂; 35 % CO₂; 60 % N₂). Образцы (~2×2 см²) зелени (листья салата и шпинат) инокулировали 4,5 logKOE/см² EHEC, после чего обрабатывали коктейлем *EcoShield*TM (6,5 logBOE/см²) и закладывали на хранение при 4 и 10 °C в течение 15 сут. Через 30 мин после нанесения коктейля бактериофагов на листья шпината уровень EHEC снижался на 2,38 и 2,49 logKOE/см² при температуре 4 и 10 °C, соответственно. На поверхности листьев салата уровень EHEC снижался на 2,49 и 3,28 логарифмических единиц через 30 мин и 2 ч при температуре хранения 4 °C. Коктейль бактериофагов значительно уменьшал EHEC за один день на 1,19, 3,21 и 3,25 logKOE/см² на листьях шпината, зеленых листьях и листьях салата ромэн по сравнению с контрольными образцами, при температуре хранения 4 °C. Во время хранения в модифицированной упаковке фаги уменьшали популяцию EHEC на 2,18, 3,50 и 3,13 logKOE/см² на листьях шпината, зеленых листьях и листьях ромэн при 4 °C. При хранении образцов в окружающей среде при температуре 10 °C EHEC снижалась на 1,99, 3,90 и 3,99 logKOE/см², в то время как в газовой модифици-

рованной упаковке количество бактерий сократилось на 3,08, 3,89 и 4,34 log КОЕ/см² на шпинате, зеленых листьях и листьях ромэн, соответственно, по сравнению с контрольной группой.

В 2014 г. Galarce с коллегами провели исследование, в котором оценивали эффективность коктейля бактериофагов для подавления роста *S. enteritidis* на поверхности сырого и копченого лосося. По 25 образцов в каждой группе были инокулированы *S. enteritidis*, после чего были обработаны коктейлем бактериофагов, а затем инкубированы в течение 10 дней при температуре 4 и 18 °С. Значительное снижение количества бактериальных клеток наблюдалось на 3, 6 и 10-й день в образцах сырого лосося, инкубированных при 18 °С от 0,75 до 3,19 log КОЕ/г, а при температуре 4 °С – от 2.82 до 3.12 log КОЕ/г. В образцах копченого лосося наблюдалось более низкое снижение бактериальных клеток от 1,02 до 1,96 log КОЕ/г при 18 °С, от 0,50 до 1,16 log КОЕ/г при 4 °С хранения.

В 2014 г. Zinno P. провели исследование, в котором оценивали эффективность бактериофага, активного в отношении *Salmonella enterica* серовар *Typhimurium*, на различных продуктах питания: жидкие яйца, энергетические напитки, цельное и обезжиренное молоко, яблочный сок, куриная грудка и фарш. Образцы были экспериментально контаминированы *S. typhimurium* в титре 10⁴ КОЕ/г, после чего оставляли их на 1 ч при температуре 4 °С для адаптации бактерий на поверхности. После этого образцы обрабатывали бактериофагом P22 и оставляли при 4 °С, эффективность деконтаминации смотрели через 0, 24 и 48 ч. Заметное снижение бактериальных клеток на 2 логарифмические единицы достигалось в опытных образцах с твердой поверхностью в сравнении с контрольными образцами, а в цельном и обезжиренном молоке через 48 ч роста сальмонелл не наблюдалось.

В 2014 г. E. N. Silva с соавт. провели исследование, в котором оценивали эффективность бактериофага P100 на *L. monocytogenes* в искусственно контаминированных сырах до созревания. Образцы инокулировали смесью штаммов *L. monocytogenes* 1/2a и Scott A в титре 10⁵ КОЕ/г, после добавляли бактериофаг в ти-

тре $8,3 \times 10^7$ БОЕ/г и оставляли при температуре 10 °С в течение 7 дней. В нулевой момент времени, через 30 минут после инфицирования, бактериофаг P100 снижал уровень *L. monocytogenes* в среднем на 2,3 log в сыре Minas Frescal и на 2,1 log в сыре Coalho, в отличие от контрольных образцов, не обработанных бактериофагом. Однако после 7 дней хранения в холодильнике бактериофаг P100 показал слабую антилистерийную активность: на 1,0 (MinasFrescal) и 0,8 (Coalho) log, по сравнению с контрольными образцами. Данное исследование показало, что эффективность фаговой обработки зависит от изначального уровня контаминации и требуется более высокий титр фаговых частиц на обрабатываемой пищевой поверхности для лучшего эффекта.

В 2014 г. М. Li наблюдал предотвращение порчи морской рыбы путем снижения *S. putrefaciens* на образцах рыбы после воздействия специфического бактериофага Spr001, активного против данного возбудителя порчи продукции. Охлажденное филе, инокулированное *S. putrefaciens*, обрабатывали различными концентрациями бактериофага от 10^4 до 10^8 БОЕ/мл. Количество бактериальных клеток значительно снижалось на обработанных бактериофагом образцах, в отличие от контрольной группы. Органолептические и биохимические параметры показывали, что обработка бактериофагом может продлить срок годности охлажденного филе на 4–14 дней. Кроме того, концентрации бактериофага 10^6 и 10^8 БОЕ/мл были более эффективны, чем химический консервант сорбат калия 5 г/л.

В 2015 г. Н. Liu с соавт. оценивали эффективность четырех бактериофагов индивидуально и коктейлем из них для снижения роста *E. coli* O157 на поверхности говядины, при температуре хранения 4, 22 и 37 °С. Образцы 3×3×1 см искусственно контаминировали *E. coli* O157 в титре 10^4 КОЕ/см², давали бактериям адаптироваться на поверхности в течение 10 минут и обрабатывали фагами, индивидуально и коктейлем, с множественностью инфицирования (MOI) = 1000 и MOI = 10. Полученные данные свидетельствовали о том, что бактериофаги более эффективно подавляли рост *E. coli* при 37 °С и более высокой MOI.

В 2015 г. Augustine J. с соавт. оценивали два специфических бактериофага, ΦSP-1 и ΦSP-3, активных в отношении сальмонелл, в готовом к употреблению (RTE) курином мясе при различных температурах хранения – 4 °С, комнатной температуре $28 \pm 0,5$ °С, 37 °С и с различной множественностью инфицирования (MOI). При температуре 4 °С индивидуальное применение бактериофагов ΦSP-1 и ΦSP-3 снизило уровень сальмонелл на 2,46 и 2,1 log КОЕ/мл при высоких значениях MOI и 0,98 и 0,52 log КОЕ/мл при низких значениях MOI, по сравнению с контрольными образцами на 3-й день эксперимента. При комнатной температуре снижение бактериальных клеток составляло 3,99 и 3,46 log КОЕ/мл при высоком MOI и 2,51 и 2,3 log КОЕ/мл при низком MOI. При 37 °С снижение сальмонелл составило 1,98 и 2,38 log КОЕ/мл при высокой MOI и 1,52 и 1,98 КОЕ/мл при низкой MOI. Лучший эффект был получен, когда бактериофаги использовали коктейлем и с высоким уровнем MOI. Так, на 3-й день эксперимента в обработанных коктейлем бактериофагов образцах бактериальная нагрузка снижалась на 3,53 log КОЕ/мл при 37 °С и за пределами уровня обнаружения при 4 °С и комнатной температуре. Таким образом, представленный обзор научной литературы подтверждает необходимость разработки новых методов деконтаминации и продления сроков годности пищевых полуфабрикатов, в частности охлажденной рыбы, сохраняющих исходное качество и экологическую чистоту продуктов питания, при этом щадящие процедуры переработки полуфабрикатов и все большее распространение в мировой торговой сети готовых к употреблению продуктов, не требующих длительной термической обработки, увеличивают риск возникновения спорадических случаев и вспышек инфекций, передаваемых пищевым путем. Создание нового для Российской Федерации класса технологических вспомогательных средств на основе бактериофагов позволит в перспективе, на наш взгляд, решить обе эти проблемы, что подтверждается рядом предварительных исследований, проведенных западными коллегами.

Таблица 18. Определение специфичности жидкой среды накопления A.SI.1-УГСХА и дифференциально-диагностической среды A.SI.2-УГСХА.

№ п/п	Вид бактерий	Рост на жидкой среде накопления A.SI.1-УГСХА	Контроль на МПБ	Рост на дифференциально-диагностической среде A.SI.2-УГСХА	Контроль роста на чашках Петри с МПА
1.	<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 33658	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый	Наличие роста, помутнение бульона.	мелкие, округлые, черного цвета, размером 0,2-0,5 мм, с гладкой поверхностью. Цвет среды рядом с колониями изменяется на черный.	+
1.	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 49140	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, диаметром до 1 мм, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
2.	<i>Aeromonas sobria</i> ATCC 9071	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый	Наличие роста, помутнение бульона	мелкие, округлые, черного цвета, размером 0,5-0,7 мм, с гладкой поверхностью. Цвет среды рядом с колониями изменяется на черный.	+
3.	<i>Aeromonas caviae</i> ATCC 15468	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии мелкие, диаметром до 0,7 мм, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
4.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> №128	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
5.	<i>Pseudomonas putida</i> №12633	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
6.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> №13525	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
7.	<i>Proteus mirabilis</i> №523	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
8.	<i>Bordetella bronchiseptica</i> №22067	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
9.	<i>Yersinia ruckeri</i> №6	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
10.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
11.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> №4463	Отсутствие роста, цвет среды не изменился.	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные, с гладкой поверхностью светлые, цвет среды красный.	+
12.	<i>Escherichia coli</i> №4	Рост бактерий, помутнение бульона, изменение цвета среды с зеленого на желтый	Наличие роста, помутнение бульона	Колонии крупные до 2 мм в диаметре, округлые, имеют серый цвет.	+

ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1. МЕТОДОЛОГИЯ НИР

Методология НИР была спланирована в соответствии со структурой и задачами исследования. Предметом исследования стала разработка рецептуры, технологии получения, процедур оценки безопасности и эффективности продуктов на основе бактериофагов. Объектами исследования выступали штаммы патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также бактериофаги изолированные нами из объектов окружающей среды (рисунок 27).

Отсутствие в Российской Федерации прецедента по конструированию, регистрации и применению новых категорий фагосодержащих средств - вспомогательного технологического средства (биопрепарата на основе бактериофагов) поставило перед нами задачу по созданию собственного алгоритма разработки таких продуктов – от идентификации бактерий-мишеней и выделения вирулентных штаммов бактериофагов, специфически лизирующих эти патогенные микроорганизмы, отработки технологии получения высокоактивных стерильных фаголизатов и проверки их безопасности на молекулярно-генетическом уровне до создания готовой формы фагового коктейля через подтверждение его безвредности и эффективности в опытах на животных.

Согласно разработанного алгоритма, на первом этапе наших исследований были выделены и идентифицированы штаммы бактерий-мишеней при разработке средства деконтаминации пищевого сырья и продукта питания. В соответствии с поставленной задачей был использован комплекс инновационных лабораторных методов исследования, включающий классические микробиологические методы с посевом патологического материала на несколько видов питательных сред и использованием отечественных и импортных коммерческих биохимических

тест-систем. Видовую идентификацию труднокультивируемых микроорганизмов проводили масс-спектрометрическим методом с использованием времяпролетного масс-спектрометра MALDI-TOF MS.

Чувствительность микроорганизмов к антибиотикам исходно определяли диско-диффузным методом. Микроорганизмы с МЛУ тестировали иммуноферментным методом для идентификации фактора обеспечивающего резистентность. Известные локусы антибиотикорезистентности регистрировали с помощью амплификации со специфическими праймерами в ПЦР-реакции. Далее проводили выделение из объектов окружающей среды и селекцию вирулентных штаммов бактериофагов по спектру их специфической, литической активности против идентифицированных бактерий-мишеней. Выделение бактериофагов и изучение их биологических свойств проводили методами, предложенными М. Адамсом и Д. М. Гольдфарбом (описание в ранее опубликованных работах). Для определения титра фаговых частиц и морфологии негативных колоний использовали метод Грация (описание по разным источникам публикации). Обязательным этапом при выборе индикаторной бактериальной культуры на которой в дальнейшем будет культивироваться бактериофаг являлась ее проверка на лизогенность в тесте по индукции профага в клетке с помощью митомицина С или УФО. Уникальность и вирулентную природу бактериофагов подтверждали в процессе биоинформационного анализа, представляющего из себя следующую процедуру: на основе данных высокопроизводительного секвенирования второго поколения Ion Torrent Sequencing проводилась сборка генома бактериофага в режиме de-novo с использованием пакета программного обеспечения NEWBLER. Собранный геном имел точность прочтения каждого нуклеотида не ниже 99,9 %. Далее проводился поиск открытых рамок считывания с целью аннотирования генома – определения возможных генов. Потенциальные продукты этих генов анализировались при помощи программного обеспечения PHACTS. Данное программное обеспечение позволяло предсказать тип

жизненного цикла бактериофага (умеренный или вирулентный). Подтверждение вирулентности бактериофага проводилось также в ходе выявления генов, кодирующих известные интегразы, репрессоры транскрипции или их гомологи. Такой поиск проводился с использованием собранной нами из различных открытых ресурсов базы данных аминокислотных последовательностей умеренных бактериофагов и алгоритма blastp. Высокоактивные стерильные фаголизаты получали согласно собственного метода (Патент RU № 2525141 «Способ получения бактериофага»). Оценки безопасности производственно-перспективных штаммов фагов, включающие микробиологические, биохимические и молекулярно-генетические тесты, а также испытания на лабораторных животных также проводили в соответствии с собственными разработанными процедурами.

Материалы и методы исследования

Научная литература, посвященная исследованиям бактериофагов, была проанализирована формально-логическими методами. В работе использованы микробиологические, иммунохимические, молекулярно-генетические, масспектрометрические, электронно-микроскопические и статистические методы исследования [10-19, 22, 23, 25-27, 34-37, 42-46, 50-53, 55-59, 61-64, 66-83].

Объекты исследования

Потенциальные штаммы бактерий-мишеней

В работе были использованы культуры бактерий, выделенные с поверхности пищевых продуктов, приобретенных в торговых сетях гг. Ульяновска, Москвы (таблица 19).

В работе было использовано 58 штаммов бактерий рода *Proteus* и 18 штаммов *Enterobacter ssp* из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ и выделенных авторами самостоятельно из проб мясного и рыбного сырья и готовых продуктов. Использовали также 69 штаммов бактерий гетерологичных родов и семейств: *Escherichia spp.*, *Citrobacter spp.*, *Morganella spp.*, *Klebsiella spp.*,

Salmonella spp., *Yersinia spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Providencia spp.*, полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Все культуры обладали типовыми свойствами и хранились при температуре 2-4 °С в столбике 0,7 % мясо-пептонного агара. В исследованиях использовали 20±2 часовые культуры микроорганизмов (температура культивирования 36±1 °С).

Один референс-штамм *A. salmonicida* ATCC 33658, а также 23 «полевых» штамма, выделенных из водных объектов г. Ульяновска и Ульяновской области. Для определения специфичности сконструированных нами сред, а также для изучения специфичности бактериофагов нами были использованы следующие референс-штаммы бактерий – *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *Aeromonas sobria* ATCC 9071, *Aeromonas caviae* ATCC 12633, *Pseudomonas putida* № 12633, *Pseudomonas aeruginosa* № 128, *Pseudomonas fluorescens* № 13525, *Yersinia ruckeri* № 6, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis* № 523, *Klebsiella pneumonia*

Таблица 19. Культуры бактерий, использованные в НИР.

Название культуры (вид)	Количество штаммов	Объект выделения
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39	музей кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ и выделены самостоятельно из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов
<i>Yersinia enterocolitica</i>	34	выделены в ходе проекта авторами самостоятельно из объектов внешней среды и пищевых продуктов животного происхождения
<i>Aeromonas salmonicida</i>	24	музей кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ и выделены самостоятельно из проб Охлажденной рыбы и водоёмов Ульяновской обл.
<i>Aeromonas hydrophila</i>	15	музей кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ и выделены самостоятельно с поверхности тушек рыбы
<i>Proteus ssp</i>	58	музей кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ и выделены самостоятельно из проб мясного и рыбного сырья и готовых продуктов
<i>Enterobacter ssp</i>	18	музей кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ и выделены самостоятельно из проб мясного и рыбного сырья и готовых продуктов
<i>Listeria spp.</i>	23	музей кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

№ 4463, *Escherichia coli* № 4, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Все штаммы обладали типичными биологическими свойствами.

Один референс-штамм бактерии *Aeromonas hydrophila*; 14 штаммов бактерии *Aeromonas hydrophila*, выделенных нами из объектов внешней среды. Для изучения специфичности бактериофагов нами были использованы следующие референс-штаммы бактерий: 5 штаммов бактерии *Aeromonas sobria*, 5 штаммов *Aeromonas salmonicida* и 12 штаммов бактерий других родов: *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumonia*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Providencia rettgeri*, *L. monocytogenes* № 766, *L. monocytogenes* № 634, *L. monocytogenes* № 10522, *L. monocytogenes* № 11944, *L. monocytogenes* № 139, *L. monocytogenes* № 1197, *L. monocytogenes* № 1213, *L. monocytogenes* № 9-72, *L. monocytogenes* № 9-127, *L. monocytogenes* № 9-130, *L. monocytogenes* № 129, *L. monocytogenes* № 17/57, *L. monocytogenes* № K-1, *L. monocytogenes* № 56, *L. monocytogenes* № 1221, *L. monocytogenes* № 4в, *L. innocua* – 3 ум., *L. ivanovii* – 2 ум., *L. grayi* – 1 ум., *L. murrayi* – 1 ум., *Erysipelothrix insidiosa* – 1 ум., *Jonesia dentrificans* – 2 ум, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ при ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ; *Y. enterocolitica* - 34 штамма (выделены в ходе проекта авторами самостоятельно из объектов внешней среды и пищевых продуктов животного происхождения). Все штаммы бактерий обладают типичными биологическими свойствами.

В работе было использовано 4 референс-штамма бактерий *P. aeruginosa* 128, 1677, 381, 453, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ при ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, а также 35 штаммов, выделенных из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов.

Производственно-перспективные штаммы бактериофагов

Всего в ходе работы из объектов окружающей среды было выделено 36 штаммов бактериофагов. Методами селекции и

отбора по биологическим свойствам использовано из 36 вирулентных бактериофагов-кандидатов, 7 были отобраны как производственно-перспективные.

Бактериофаги, специфичные к культурам рода *Proteus*, 6 изолятов: FPr-10 УГСХА, FPr-11 УГСХА, FPr-12 УГСХА, FPr-13 УГСХА, FPr-14 УГСХА, FPr-15 УГСХА.

Штаммы бактериофагов *Aeromonas hydrophila*: 5 штаммов.

3 штамма фагов *Aeromonas salmonicida* - Ars10/2-УГСХА, Ars25- УГСХА, Ars11-УГСХА.

Выделено три листериозных бактериофага – L.m 1, L.m 2, L.m 12.

5 бактериофагов бактерий вида *Y. enterocolitica*.

Питательные среды

Мясопептонный агар (МПА) (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), мясопептонный бульон (МПА) (НПО «Питательные среды», г. Махачкала), мясопептонный агар (Nutrient Agar, TM Media, Rajasthan, India) 0,7 %-ный, 2%-ный; мясопептонный бульон (Nutrient Broth, TM Media, Rajasthan, India); 2% мясо-пептонный агар (МПА), 2% мясо-пептонный агар с глюкозой, хромогенный агар уриселект 4 (Bio-Rad, США). Мясопептонный бульон (МПБ) и МПА готовились в лабораторных условиях. Специальные питательные среды представлены в соответствующих разделах отчёта. Среда Эндо (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболенск), среда Симмонса (ГНЦ прикладной микробиологии, г. Оболенск), агар бактериологический, пептон сухой ферментативный, экстракт дрожжевой, хлорид бария, хлорид натрия, сульфат магния, гидрофосфат калия двузамещенный, глюкоза, бромтимоловый синий, желатин, перекись водорода, N-N-диметил-пара-фенилен-диамид, диски с антибиотиками, набор окраски по Граму, вазелиновое масло; агар - агар (Agar Agar, TM Media, Rajasthan, India); Палкам агар (*Listeria identification Agar base (PALCAM)* TM Media, Rajasthan, India); Оксфорд агар (*Listeria Oxford Medium Base*, India); Оксфордский агар с селективной добавкой (Oxsoid, Англия); полужидкий агар (*Listeria Motility Medium*, India); хромогенный агар

(Chromogenic Listeria Agar Base TM Media, Rajasthan, India); натрий хлорид, слабощелочной фосфатный буфер (pH-7,6).

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам Э. Каттера, С. Н. Золотухина [34-36]. Литическую активность определяли по методам Грация и Аппельману. Реакцию нарастания титра фага для индикации бактерий в объектах внешней среды проводили по методам В. Д. Тимакова и Д. М. Гольдфарба. Конструирование биопрепарата проводили по методу С. Н. Золотухина.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. (for Windows; «Stat Soft Ins.», США), Microsoft Exsel 2010.

Лабораторные животные

В экспериментах *in vivo* в качестве модельных животных использовали белых аутбредных (беспородных) мышей (самцы/самки, 18–21 г). Все закупленные животные прошли карантин в виварии в соответствии с СП № 2.2.1. 3218-14 [64].

Пищевая продукция

Образцы охлажденной рыбы были приобретены в торговых сетях городов Ульяновск и Москва. Мясное сырьё (полуфабрикаты купат) приобретено в магазинах городов Ульяновска и Москвы. Для эксперимента подготавливали куски массой от 1 г до 10 г путем разрезания с помощью стерильного ножа на стерильной разделочной доске в лабораторных условиях. Образцы предварительно подвергали деконтаминации в 70 % спирте, а затем отмывали от последнего 0,9% раствором хлорида натрия. Контаминировали. Для оценки эффективности литического действия бактериофагов на поверхности охлажденной продукции в лабораторных условиях использовались кусочки (мышечные волокна) 5×5 см.

Методы бактериологического исследования

Родовую и видовую идентификацию микроорганизмов устанавливали на основе морфологических и культурально-биохимических свойств, проводили ферментативным и масспек-

трометрическим методом с использованием времяпролетного масспектрометра MALDI-TOF MS.

Для выделения и идентификации бактерий с пищевых продуктов и пищевого сырья использовали бактериологический метод. Куски с пищевых продуктов и пищевого сырья массой 10 г гомогенизировали, делали разведение 1:10, затем наносили 0,1 мл исследуемой пробы на чашку Петри, тщательно растирали шпателем по поверхности, инкубировали 18 ч при температуре 28-37°C, с последующим выделением чистой культуры и изучением свойств этих микроорганизмов. Для изучения ферментативных свойств использовали сложные многокомпонентные питательные среды. Для определения сахаролитических ферментов использовали среды с рамнозой. Видовую идентификацию труднокультивируемых микроорганизмов проводили с использованием времяпролетного масс-спектрометра VITEK MS («bioMérieux», Франция) согласно инструкции производителя. Предварительно проводили пробоподготовку: суточную бактериальную культуру суспендировали в эппендорфе в 300 мкл дистиллированной деминерализованной воды (ddH₂O), далее помещали в термостат на 30 мин при температуре 95 °C, охлаждали и добавляли 900 мкл этилового спирта; пробы встряхивали на вортексе 10 с и центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 2 мин; полностью удаляли супернатант и подсушивали; для улучшения качества спектра добавляли 25 мкл 70 % муравьиной кислоты и перемешивали пипетированием, далее инкубировали при комнатной температуре в течение 3 мин, затем добавляли аналогичное количество 50 % N-ацетонитрила, перемешивали пипетированием и центрифугировали в течение 2 мин при 13000 об/мин. Подготовленные образцы наносили на слайды. Для каждого вида микроорганизмов был сформирован характерный набор белков (биомаркеров), полученный на основе анализа не менее 50 масс-спектров этого вида, а каждый образец тщательно идентифицирован с помощью сиквенса 16S рРНК. Структурированная таким образом база данных позволяла быстро и точно идентифицировать микробиологические штаммы. Полученные

масс-спектр рибосомальные белки, являющиеся высококонсервативными и видоспецифичными, исследуемого микроорганизма сравнивались со спектрами из базы данных, и на основании сведений о массах характеристических белков происходила идентификация микроорганизмов.

Приготовление и стерилизация питательных сред, а также окраска мазков проводили согласно ГОСТ Р 51446-99 [164]. Приготовление разведений и суспензий – ГОСТ Р 51426-99 [163]. Посев на питательные среды согласно ГОСТ Р 26670-91 [152]. Отбор и подготовку лабораторных проб проводили по ГОСТ Р 26668-85 [162], ГОСТ 26669-85 [151], ГОСТ Р 51419-99 [161]. Контроль разработанных питательных сред проводили согласно МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» [160].

Метод индукции профага в клетке с помощью митомицина С и УФО

Одним из важнейших условий отбора бактериального штамма-хозяина для последующего культивирования производственно-перспективных бактериофагов было подтверждение отсутствия профагов, интегрированных в геном бактериальной клетки. Определить наличие профага в бактериальной культуре можно путем воздействия на клетку химическими или физическими факторами, индуцирующими механизм репликации фаговой ДНК и последующий лизис бактериальной клетки с выходом нового поколения вирусных частиц. В качестве химического фактора воздействия мы использовали митомицин С в дозе 0,5 мкг/мл. Исследуемые штаммы засевали в пробирки с питательным бульоном, содержащим 0,5 мкг/мл митомицина С. После инкубации пробирок в течение 4–6 ч при 28 °С содержимое пробирок очищали от остатков бактериальных клеток путем центрифугирования (5000 об./мин) и последующего фильтрования через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Суспензии индикаторных бактериальных штаммов наносили в объеме 0,1–0,2 мл на поверхность питательного агара в чашках Петри и втирали досуха шпателем. Чашки делили на 3 сектора,

на которые наносили по 100 мкл содержимого пробирок, физраствор с 0,5 мкг/мл митомицина С (отрицательный контроль) и фаголизаты бактериофагов (положительный контроль). После инкубации в течение 10–18 ч при 28 °С чашки исследовали на наличие зон лизиса бактериального газона. В месте внесения физраствора с 0,5 мкг/мл митомицина С зоны лизиса быть не должно. В месте нанесения фаголизата бактериофага она должна быть обязательно. Наличие зоны лизиса газона на секторе с нанесенным содержимым тестируемой пробирки указывает на лизогенное состояние штамма.

В качестве физического фактора воздействия использовали ультрафиолетовое облучение (УФО) с длиной волны 250 нм. Исследование проводили по следующей схеме: 0,1–0,2 мл суточной бактериальной культуры наносили сплошным газonom на чашку Петри с МПА и оставляли подсохнуть при комнатной температуре 30 мин. Затем воздействовали на чашку УФО с расстояния 1,0 м в течение 5 мин. После облучения ставили чашку в термостат на 24 ч при температуре 28 °С для *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* и при 37 °С для *Proteus ssp.*, *Enterobacter ssp.* Через сутки инкубации на поверхности чашек наблюдали рост отдельных колоний, с помощью шпателя Дригальского растирали по поверхности агара отдельные колонии до получения однородного слоя. Затем повторно воздействовали УФО с расстояния 1,0 м в течение 10 мин и последующим инкубированием в термостате при аналогичных условиях. Через сутки снова повторяли данные мероприятия, но уже воздействие УФО производили в течение 15 мин, при аналогичных условиях. Затем производили смыв с поверхности чашки 0,9 % раствором натрия хлорида в количестве 5,0 мл, полученную суспензию фильтровали через мембранный фильтр («Millipore», 0,22 мкм). После этого полученную взвесь проверяли на наличие фаговых частиц по методу Грациа. Наличие на чашке зон лизиса указывало на то, что бактериальная культура несет в себе профаг и

не может использоваться в качестве штамма-хозяина. В случае отсутствия фага газон на чашке однородный.

Методы выделения бактериофагов из окружающей среды

Выделение бактериофагов и изучение их биологических свойств проводили методами, предложенными М. Адамсом и Д. М. Гольдфарбом, отработанными и модифицированными сотрудниками ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ [7,11,12,15,42,71].

Прямой метод выделения бактериофага из исследуемого материала

Исследуемую жидкость фильтровали через бактериальный фильтр (0,22 мкм, «Millipore»), освобождая от микробов. Твердый исследуемый материал (образцы почвы, пищевые продукты, оформленные испражнения) предварительно измельчали, эмульгировали, фильтровали вначале через бумажный, а затем через бактериальный фильтр. Наличие фага в полученном фильтрате определяли на плотных питательных средах по методу Отто или Грациа [7,70,72,73,78,79].

Прямой способ выделения бактериофага является наиболее простым и доступным, однако по чувствительности он уступает нижеприведенным методам выделения бактериофага с предварительным обогащением исследуемого материала.

Выделение бактериофага методом обогащения «без подсева»

Исследуемый материал засевали в жидкую питательную среду, являющуюся наиболее полноценной для развития тех микроорганизмов, против которых ищут бактериофаг. Посевы ставили в термостат и инкубировали при оптимальной температуре роста микроорганизмов 18–20 ч. По истечении указанного срока сосуды с посевами вынимали из термостата, центрифугировали и фильтровали через бактериальный фильтр (0,22 мкм). Полученные фильтраты испытывали на присутствие в них бактериофага на плотных и жидких питательных средах. Данный метод основывается на создании наиболее благоприятных условий для размножения бактерий и соответствующего им бактериофага, который предполагается выделить.

Выделение бактериофага методом обогащения с «подсевом»

Жидкие и твердые образцы засеивали в мясо-пептонный бульон (МПБ).

Одновременно с исследуемым материалом в питательную среду вносили 0,2–0,5 мл суточной бульонной культуры бактерий, гомологичных выделяемому фагу. Для контроля культуру бактерий, применяемую для обогащения, засеивали в стерильную питательную среду. Емкости с посевами ставили в термостат при температуре, оптимальной для роста культуры, на 18–24 ч. После инкубации из опытной и контрольной пробирок брали по несколько миллилитров жидкости и фильтровали через бактериальные фильтры. Полученный фильтрат исследовали на присутствие бактериофага, гомологичного бактериям, примененным для обогащения.

Сущность данного метода заключается в предварительном обогащении исследуемого материала клетками того микроорганизма, к которому ищем бактериофаг. Бактерии, внесенные в исследуемый материал, начинают размножаться, и вместе с ними увеличивается количество фага.

Обнаружение бактериофага на плотных питательных средах по методу Отто

1,5 % мясопептонный агар разливали в чашки Петри. После застывания питательную среду засеивали 16–18-часовой бульонной культурой бактерий, гомологичных искомому фагу. Для получения сплошного роста 2–3 капли культуры наносили на чашку и растирали шпателем равномерно по всей ее поверхности. Спустя 5–10 мин после посева на подсушенную поверхность питательной среды наносили каплями исследуемый фильтрат. После того как жидкость впиталась в среду, чашки переворачивали вверх дном и ставили в термостат при оптимальной температуре роста микроорганизмов на 18–24 ч. Учет результатов: доказательством наличия бактериофага служит полное отсутствие роста культуры в месте попадания капли фильтрата (активный бактериофаг) или появление в этом участке мелких стерильных пятен – колоний бактериофага.

Обнаружение бактериофага на плотных питательных средах двуслойным методом Грация

1,5 % МПА разливали в чашки Петри в количестве 25–30 мл (первый слой). После застывания среды чашки ставили в термостат на 1½–2 ч для подсыхания. В пробирку с 2,5 мл 0,7 % расплавленного и остуженного до 45 °С агара вносили 1 мл исследуемого фильтрата и 0,2 мл суточной культуры, соответствующей искомому фагу. Содержимое пробирок быстро перемешивали, чтобы не произошло затвердевания агара, и выливали на чашку вторым слоем. После того, как агар застывал, посев ставили в термостат при оптимальной температуре роста микроорганизмов. Результат учитывали через 16–18 ч инкубации в термостате. Присутствие бактериофага определяли по наличию прозрачных пятен, хорошо видимых на матовом фоне роста бактерий.

Подтверждение отсутствия умеренных бактериофагов в потенциальных бактериях-хозяевах

Отобранные как индикаторные, бактерии предварительно, до выделения к ним бактериофагов из объектов окружающей среды, были проверены в тесте по индукции профага с помощью митомицина С и УФО. В результате проведенных исследований отобранные штаммы бактерий были закреплены в качестве клеток-хозяев и использовались в дальнейшем для выделения бактериофагов и получения фаголизатов с высоким титром фаговых частиц.

Изолирование бактериофагов, активных в отношении определенного спектра бактерий-мишеней

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам, предложенным М. Адамсом и Д. М. Гольдфарбом [7,26], определение титра фаговых частиц и морфологии негативных колоний - по методу Грация, с учетом температурных режимов оптимальных для культивирования отобранных бактерий-хозяев.

Для выделения бактериофагов из сточных вод исследуемые образцы объемом 15 мл засеивали в колбу с МПБ в объеме 50 мл, внося при этом по 0,2 мл (полная петля) суточной бактери-

альной культуры. После инкубирования из колбы брали 10 мл жидкости и помещали в стерильную пробирку. Затем, с целью освобождения от посторонней микрофлоры, материал центрифугировали в течение 30 мин при 5000 об/мин, надосадочную жидкость отбирали и фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Присутствие бактериофага определяли по наличию прозрачных пятен (бляшек, негативных колоний), хорошо видимых на матовом фоне роста бактерий.

В случае положительного результата негативные колонии или участок лизиса пересевали с помощью бактериологической петли в МПБ с соответствующей индикаторной культурой. Для этого в две пробирки с 4,5 мл МПБ добавляли стерильной пипеткой по 0,2 мл суточной бульонной индикаторной культуры, в одну из которых пересевали негативную колонию соответствующего бактериофага, вторая пробирка служила контролем. Определяющим моментом являлось просветление бульона в опытной пробирке и выраженное помутнение среды в контроле. После чего содержимое опытной пробирки с целью освобождения от бактериального дебриса центрифугировали в течение 30 мин при 5000 об/мин, надосадочную жидкость отбирали и фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Определение титра литической активности бактериофагов

После выделения бактериофага необходимо определить его количественное соотношение, или титр фага. Для титрования бактериофага предложены различные методы, однако наибольшее распространение из них получили способ титрования фага в жидкой питательной среде, предложенный Аппельманом, и метод агаровых слоев, разработанный Грациа.

Титрование бактериофага в жидкой питательной среде по методу Аппельмана

Метод основан на внесении различных количеств титруемого бактериофага в питательный бульон, засеянный одной и той же дозой бактериальной культуры, чувствительной к данному фагу. Для этого брали 10 пробирок с 4,5 мл МПБ в каждой. В первую пробирку вносили 0,5 мл исследуемого фага, содержимое про-

бирки тщательно перемешивали. Из первой пробирки 0,5 мл переносили во вторую и т.д. до получения ряда последовательных 10-кратных разведений фага (10^{-1} - 10^{-10}). В каждую пробирку приготовленного ряда вносили по 0,03 мл взвеси суточной агаровой культуры бактерий, содержащей 10^9 микробных клеток в 1 мл по стандарту мутности (10 МЕ), чувствительной к данному фагу. Для контроля брали 2 пробирки с МПБ, в одну из которых вносят 0,5 мл исследуемого фага (контроль на стерильность фильтрата фаголизата), в другую пробирку 0,03 мл микробной культуры (контроль культуры). Все пробирки помещали в термостат при оптимальной температуре роста микроорганизмов на 18 ч. Результат определяли по отсутствию видимого роста бактерий в присутствии бактериофага. Активность (силу литической активности или специфическую активность, но не титр) бактериофага обозначают отрицательной степенью десяти, где степень указывает последнее разведение бактериофага, в котором рост индикаторной культуры визуально не наблюдался.

Титрование бактериофага методом агаровых слоев (метод Грация)

Этот метод основан на внесении различных разведений титруемого бактериофага в соответствующую культуру бактерий и посева на плотную питательную среду с целью получения негативных колоний бактериофага. Накануне опыта готовили питательные среды. В чашки Петри разливали 1,5 % МПА по 25 мл среды. Среду в чашках подсушивали в термостате до полного удаления конденсата. Агар должен быть абсолютно сухим, так как даже незначительное увлажнение может изменить количественные показатели содержания частиц фага в исследуемой жидкости. Брали 0,7% МПА в пробирках по 2,5 мл в каждой, расплавляли его на водяной бане и охлаждали до 48–50 °С. Из жидкости, содержащей титруемый бактериофаг, готовили в пробирках ряд последовательных разведений (как в методе Аппельмана). Затем в пробирку с 0,7 % МПА вносили 1 мл соответствующего разведения исследуемого бактериофага, слегка перемешивали, добавляли 0,1–0,2 мл 10^9 культуры, чувстви-

ной к бактериофагу, опять слегка перемешивали и содержимое пробирки выливали в чашку с МПА (вторым слоем). Смесь равномерно распределяли по поверхности агара и оставляли чашку в горизонтальном положении на 40–50 мин, то есть до полного охлаждения агара. Затем чашки слегка подсушивали и инкубировали в термостате при оптимальной температуре роста микроорганизмов в течение 18–20 ч. На фоне равномерного роста микробов отмечались пятна, где рост отсутствовал (полный лизис). При большом количестве бактериофага наступал лизис микроорганизмов на всей поверхности агара. Когда количество фаговых частиц невелико, то участков лизиса мало, и можно рассчитать количество бляшкообразующих единиц (БОЕ) фага в 1 мл препарата, допуская, что каждый участок лизиса образовывался в результате действия одной частицы фага. Допустим, что на агаре в чашке имелось 30 пятен лизиса (колоний фага) при исследовании фильтрата в разведении 10^{-7} . Следовательно, титр фага будет равен 3×10^{-8} , т.е. в 1 мл фага содержится 3×10^8 БОЕ.

Определение спектра литической активности бактериофагов

Спектр литической активности бактериофагов оценивали методом нанесения фага (spot-тест) на газон бактериальной культуры. В чашки Петри разливали 1,5 % МПА. После застывания и подсушивания агара на чашки Петри наносили по 0,1 мл 16–18-часовой бульонной культуры микроорганизмов, растирали шпателем по всей поверхности чашки, чтобы получить равномерный сплошной рост культуры. После того, как культура впиталась и чашки подсохли, на них каплями (spot-тест) наносили бактериофаги. После того, как жидкость впиталась в среду, чашки переворачивали вверх дном и ставили в термостат при оптимальной температуре роста культуры на 18–24 ч. На следующие сутки производили учет результатов – наличие или отсутствие «пятна лизиса».

Получение фаговой биомассы с высоким титром фаговых частиц

Фаговую биомассу с высокой литической активностью получали методом выращивания на плотных питательных средах

(Патент РФ №2525141 «Способ получения бактериофага»). Он включает следующие этапы.

1-й этап – это получение ночной (18-часовой) культуры штамма-хозяина. Бактериальную культуру, выросшую на плотной питательной среде, микробиологической петлей засевают в МПБ, разлитый по 4,5 мл из расчета одна пробирка на одну матрасную колбу. Посеянные таким образом индикаторные штаммы культивируют в термостате 18 ч.

2-й этап – нанесение штамма-хозяина на поверхность плотной питательной среды.

В матрасные колбы с плотным питательным агаром вносят 18-часовую культуру штамма-хозяина. Распределяют культуру по всей поверхности питательной среды, создавая монослой. Стерильной микробиологической пипеткой удаляют лишнюю жидкость. Культивируют в течение 3,5 ч при оптимальной температуре для роста культуры штамма-хозяина.

3-й этап – нанесение маточного штамма бактериофага.

В образовавшийся таким образом газон культуры вносят шприцем или стерильной микробиологической пипеткой 2 мл одноименного (маточного) бактериофага в титре 10^6 – 10^7 БОЕ/мл. Соотношение посевной культуры и бактериофага составляет 100 к 1, т.е. на 100 бактериальных клеток – 1 частица бактериофага. Покачивающим движением распределяют бактериофаг так, чтобы он тонким слоем покрыл всю поверхность газона бактериальной культуры. И опять отбирают стерильной пипеткой лишнюю жидкость. Инкубируют в термостате 13–15 ч при оптимальной температуре для роста культуры штамма-хозяина и одноименного бактериофага.

4-й этап – сбор бактериофага.

В матрас в асептических условиях вносят физиологический раствор с рН 7,0–7,2 в количестве 0,04–0,045 мл на 1 см² (9 мл на один матрас). Плавным покачивающим движением производят смыв фага с поверхности питательного агара. Стерильной микробиологической пипеткой собирают жидкую фракцию и переносят в стерильные центрифужные пробирки. Эта фракция со-

стоит из бактериофага, обломков бактериальных клеток, живых нелизированных клеток штамма-хозяина. Для освобождения фаголизата от нелизированных бактерий в пробирки добавляют хлороформ из расчета 1/10. Экспонируют полученную суспензию 30 мин при непрерывном шуттелировании, центрифугируют 30 мин при 5000–6000 об/мин. Собирают полученный супернатант в стерильную емкость.

5-й этап – очистка и контроль фаголизата.

Полученный таким образом фаголизат стерилизуют фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм и затем очищают от эндотоксинов на хроматографической колонке типа EndoTrapBlue или EndoTrapHD (HyglosGmbH, Германия) согласно инструкции производителя с использованием буфера, разработанного этой фирмой.

Методы оценки стабильности бактериофагов к воздействию агрессивных факторов

Устойчивость бактериофагов-кандидатов к повышенным и пониженным температурам.

Степень устойчивости бактериофагов к воздействию высокой и низкой температуры проводили следующим способом: исследуемые бактериофаги разводили 1:10 в МПБ (рН 7,2–7,4) для того, чтобы получить бактериофаг определенной концентрации. Затем пробирки с фагами прогревали на водяной бане и термостате «Гном» в диапазоне измеряемой температуры 40–80 °С с интервалом 5 °С в течение 45 мин, и под воздействием низких температур в диапазоне от +5 до -10 °С с интервалом в 5 °С в течение 45 мин. Параллельно титровали контроль – фаголизат без прогрева и охлаждения. Количество негативных колоний определяли методом агаровых слоев по Грациа.

Устойчивость бактериофагов к воздействию хлороформа. Хлороформ является недорогим и доступным средством, не всегда убивающим бактериофаговые частицы, которое используется для освобождения фаголизата от жизнеспособных микроорганизмов. Определение чувствительности бактериофагов к данному химическому веществу проводили методом обработки

фаговой суспензии хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном перемешивании. Для этого брали по 3 пробирки с 4,5 мл МПБ, в каждую вносили по 0,2 мл испытываемого бактериофага и 0,2 мл бактериальной культуры, чувствительной к данному фагу (индикаторная культура). Пробирки культивировали при 37 °С 18–20 ч. Затем в каждую пробирку добавляли по 0,5 мл хлороформа. Время экспозиции с хлороформом при непрерывном встряхивании соответственно: 1-я пробирка – 15 мин; 2-я пробирка – 30 мин; 3-я пробирка – 45 мин. Полученную смесь откручивали на центрифуге 30 мин при 5000 об/мин. Собирали супернатант. Активность бактериофага определяли по методу Грациа. Контролем служил стерильный фильтрат фаголизата, полученный с использованием бактериальных фильтров.

Определение параметров инфекционного процесса в системе фаг - клетка для бактериофагов, входящих в состав технологического вспомогательного средства.

Адсорбция

Экспоненциально растущие бактериальные клетки смешивали с бактериофагом (множественность инфицирования (МОІ) = 0,001) и инкубировали при комнатной температуре. Образцы (100 мкл) отбирали через 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30 мин, смешивали с 850 мкл SM-буфера и 50 мкл хлороформа. После центрифугирования надосадочную жидкость титровали для определения неадсорбированных или обратимо адсорбированных фагов через разные временные интервалы. Количественно адсорбцию выражали константой скорости адсорбции (k), измеряемой в мл/мин [34]:

$$K = 2,3/(B \times t) \times \log(P_0/P) \quad (1)$$

где P_0 – титр фага, определенный при времени 0;

P – титр фага, неадсорбированного на поверхности бактериальной клетки за время t ;

B – титр бактерий в начальный момент в 1 мл, t – время в минутах.

Латентный период и выход фаговых частиц определяли следующим образом. 50 мл бактериальных клеток инкубировали

до экспоненциальной стадии роста ($OD_{600} = 0,3$), далее 20 мл полученной жидкой бактериальной культуры центрифугировали при 4 °C, 5 мин, 7000 g. Осадок ресуспендировали в 0,5 мл свежего Luria-Bertani (LB) бульона и смешивали с бактериофагом таким образом, что $MOI = 0,01$. Смесь бактериофага и бактериальных клеток инкубировали 5 мин при температуре 37 °C. Неадсорбированные фаги удаляли путем центрифугирования в течение 2 мин при 13000 g. Осадок ресуспендировали в 10 мл предварительно подогретого LB. Образцы отбирали через 5–10-минутные интервалы в течение 2 ч и немедленно титровали. Выход бактериофага определяли как отношение максимального количества высвободившихся фаговых частиц в конце размножения к количеству фаговых частиц во время латентного периода.

Определение частоты возникновения фагорезистентных бактериальных мутантов

На поверхность 1,5 % питательной среды в чашке Петри наносили 0,1 мл бактериофага с титром не менее 10^9 БОЕ/мл и равномерно распределяли шпателем до полного впитывания фага. Затем на поверхность агара с фагом наносили 0,1 мл бактериальной культуры, подращенной до 10^8 КОЕ/мл, и растирали по поверхности чашки шпателем. Чашки инкубировали при оптимальной температуре роста бактерий в течение 24 ч. В результате заражения чувствительных клеток бактерий фагом происходит лизис клеток, а на поверхности агаризованной среды образуются колонии только тех клеток бактерий, которые являются фагорезистентными мутантами.

Частоту возникновения фагорезистентных мутантов определяли как отношение количества фагорезистентных клонов к количеству жизнеспособных клеток бактерий в 1 мл среды.

Электронная микроскопия бактериофагов

Электронная микроскопия сделана на микроскопе JEM-100CX (JEOL, Япония) $\times 80000$, медные сетки покрыты пленкой коллодия, произведено напыление углеродом, окраску производили 2 % ацетатом уранила.

Полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов

Секвенирование ДНК бактериофагов

Для получения полногеномных нуклеотидных последовательностей выделенных бактериофагов и подтверждения отсутствия лизогении штаммахозяина использовали метод метагеномного секвенирования вирусов.

Использованный метод включал в себя следующие этапы:

1. очистка фаголизата от бактериальной ДНК;
2. выделение ДНК бактериофага;
3. создание библиотек случайных фрагментов (фрагментация ДНК, выбор фракции фрагментов необходимой длины и лигирование адаптерных последовательностей);
4. клональная амплификация библиотек;
5. непосредственно секвенирование;
6. анализ данных методами биоинформатики. Получение препаратов ДНК бактериофагов.

Фаголизаты, содержащие исследуемые бактериофаги в титре не ниже 10^9 БОЕ/мл, пропускали через стерильную фильтрующую шприцевую насадку Millex-GP с диаметром пор 0,22 мкм (Merck Millipore, США), после чего обрабатывали ферментом DNase I (NEB, США). Выделение ДНК бактериофагов проводили при помощи набора K-Corb (ООО «НПФ Синтол», Россия) согласно протоколу производителя.

Подготовка к секвенированию и непосредственно секвенирование.

Нуклеотидные последовательности исследуемых бактериофагов проводили при помощи одного из методов секвенирования второго поколения, а именно полупроводникового секвенирования на платформе Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, США). Метод полупроводникового секвенирования основан на связи химической и цифровой информации (pN секвенирование). Процесс основан на детекции протонов, которые получаются при синтезе цепи ДНК как побочный продукт. Как следствие, pH раствора меняется, что можно детектировать и таким образом различать нуклеотиды.

Как и другие методы высокопроизводительного секвенирования (highthroughput sequencing; в англоязычной литературе чаще употребляется термин «next generation sequencing», сокращенно NGS), данный метод позволяет секвенировать несколько образцов ДНК одновременно. Поэтому для секвенирования ДНК, выделенной из каждого фаголизата, готовили баркодированные библиотеки случайных фрагментов. Выделенную ДНК предварительно фрагментировали ультразвуком при помощи прибора Bioruptor UCD-200 (Diagenode, Бельгия). Библиотеки случайных фрагментов для последующего секвенирования готовили при помощи набора реагентов NEBNext (NEB, США) согласно протоколу производителя с использованием стандартных баркодов Ion Xpress™ Barcode Adaptors Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Все работы по получению ДНК бактериофагов и приготовлению баркодированных библиотек случайных фрагментов проводили с использованием методических подходов, исключающих перекрестную контаминацию образцов. Оценку распределения длин фрагментов библиотек и их концентрацию проводили с использованием прибора Bioanalyzer 2100 и набора реагентов Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent Technologies, США) согласно протоколу производителя.

Клональную амплификацию библиотек, которые были предварительно эквимольно пулированы, проводили с использованием набора Ion PI Template OT2 200 Kit v3 (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя.

Непосредственно секвенирование проводили при помощи набора реагентов Ion PI Sequencing 200 Kit v3 на чипе Ion PI Chip Kit v2 секвенатора Ion Proton (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя.

Биоинформатический анализ нуклеотидных последовательностей бактериофагов

В ходе биоинформатического анализа проводили фильтрацию качества прочтений. Для сборки фаговых геномов de novo использовали риды с качеством прочтения нуклеотидов не ниже

Q20 и длиной не менее 50 оснований. Сборку геномов осуществляли с использованием программного обеспечения Newbler (Roche/454 GS-FLX). Сравнение собранных геномов бактериофагов с геномами известных аннотированных бактериофагов проводили при помощи алгоритма blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) и баз данных нуклеотидных последовательностей NCBI (Национальный центр биотехнологической информации, США). Визуализацию выравнивания собранных нами геномов с известными проводили с использованием программного обеспечения BLAST Ring Image Generator (BRIG).

Поиск открытых рамок считывания проводили при помощи программного обеспечения UGENE (Унипро, Россия). Прогноз типа жизненного цикла бактериофага (умеренный или вирулентный) проводили при помощи программы PHACTS (San Diego State University, США). Подтверждение вирулентности или определение потенциально умеренного бактериофага проводили в ходе определения соответственно отсутствия или наличия генов, кодирующих известные интегразы, репрессоры транскрипции или их гомологи при помощи алгоритма blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Визуализацию аннотированного генома проводили с использованием программного обеспечения SnapGene Viewer (GSL Biotech).

Оценка параметров микробиологической безопасности пищевого сырья и продуктов питания (количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМА-ФАнМ) и *L. monocytogenes*).

КМАФАнМ определяли согласно ГОСТ 10444. 15-94 [150]. Из навески продукта подготовили исходное и ряд десятикратных разведений согласно ГОСТ 26669-85 [151]. Из каждого разведения вносили по 1 мл в 2 параллельные чашки Петри. Затем посеы заливали МПА, ожидали, когда чашечки подсохнут, и помещали в термостат при температуре 30 °С на 72 ч. После инкубирования подсчитывали количество колоний на чашках Петри. Результаты подсчета количества колоний пересчитывали на 1 г продукта по ГОСТ 26670-91 [152]. Согласно микро-

биологическим нормативам безопасности пищевой продукции ТР ТС 021/2011 [155], пороговое значение КМАФАнМ для охлажденной рыбы не должно превышать 1×10^5 КОЕ/г. Бактерии *Listeria monocytogenes* выявляли по ГОСТ 32031-2012 [153] с использованием: Мясопептонный агар (Nutrient Agar, ТМ Media, Rajasthan, India) 0,7 %-ный, 2 %-ный; мясопептонный бульон (Nutrient Broth, ТМ Media, Rajasthan, India); агар - агар (Agar Agar, ТМ Media, Rajasthan, India); Палкам агар (*Listeria* identification Agar base (PALCAM) ТМ Media, Rajasthan, India); Оксфорд агар (*Listeria* Oxford Medium Base, India); Оксфордский агар с селективной добавкой (Oxoid, Англия); полужидкий агар (*Listeria* Motility Medium, India); хромогенный агар (Chromogenic *Listeria* Agar Base ТМ Media, Rajasthan, India); натрий хлорид, слабощелочной фосфатный буфер (pH-7,6), бульона Фразера (Himedia, India) с последующим пересевом на Chromocult *Listeria* Selective Agar Base ас. OTTAVIANI and AGOSTI (Merck KGaA, Germany) из серийных разведений образца (1:10).

Статистические методы обработки данных

Статистическую обработку результатов (вычисление средних арифметических значений и стандартного отклонения) проводили с использованием статистических ресурсов программы Microsoft Excel 2016.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1.1. ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА (БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА) ИЗОЛИРОВАННЫХ ШТАММОВ-КАНДИДАТОВ БАКТЕРИОФАГОВ, ЛИЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИИ ВЫЗЫВАЮЩИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ ПОРЧУ ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

5.1.1 БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ РОДА *PROTEUS*

(Материал подготовлен по результатам исследовательской работы Н. А. Феоктистовой, С. Н. Золотухина)

Бактерии рода *Proteus* - это кишечные грамотрицательные палочки, которые часто показывают плеоморфизм, отсюда и соответствующее название рода [7]. Все – подвижные, на влажной агаровой среде в большинстве случаев наблюдается роящийся рост. Могут выделяться из разных мясных и овощных продуктов, особенно тех, которые подвергаются порче при температуре диапазона мезофилов [70-73]. Бактерии рода *Proteus* регистрируются в шести экологических источниках происхождения организмов, обнаруживаемых в пищевых продуктах – почве и воде, растительных продуктах, пищевом инвентаре, желудочно-кишечном тракте, при транспортировке/хранении продуктов, шкурах животных. Выше названные бактерии относятся к наиболее часто выделяемым из мяса и птицы. В процессе порчи креветок и моллюсков при температуре 16,7 °С и 22,2 °С доминировали бактерии рода *Proteus* [74-78].

В настоящее время выделение и идентификация бактерий рода *Proteus* регламентируется межгосударственными стан-

дартами. Методы выявления основаны на посеве исходного разведения анализируемой пробы продукта или другого эквивалентного разведения в питательные среды, культивировании посевов при $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ в течение 24-48 ч, выделении типичных и (или) предполагаемых колоний, подтверждении их принадлежности по культуральным, морфологическим признакам и биохимическим свойствам к бактериям рода *Proteus* [79].

По литературным данным в настоящее время повышается значимость бактериофагов как высоко специфического метода индикации и идентификации [2-4]. Поэтому, исследовательская работа в области поиска эффективных методов выделения и идентификации бактериальных агентов, контаминирующих пищевые продукты и вызывающих тем самым их порчу, направлена на конструирование специфических фаговых биопрепаратов [3].

Применение бактериофагов как универсального механизма, способного элиминировать (разрушать) специфичные бактерии позволяет использовать этот биологический феномен в качестве безопасного средства деконтаминации пищевого сырья. Конструирование биопрепаратов на основе бактериофагов требует изучения их основных биологических свойств с целью получения высокоэффективного средства с широким спектром действия.

Литическая активность протейных бактериофагов определялась нами методом титрования на жидкой среде (метод Аппельмана) и диффузии верхнем слое мягкого агара (метод агаровых слоев). Посев последовательных разведений фагового препарата с целью повышения точности эксперимента проводили трижды. Проведенные исследования по определению литической активности - титра бактериофагов рода *Proteus* позволяют нам утверждать, что они имеют различный титр в диапазоне от 10^{-6} до 10^{-8} по Аппельману и от $2,4 \pm 0,1 \times 10^7$ до $5,7 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ (бляшкообразующих единиц)/мл по Грациа.

При визуальном осмотре результатов посева чашечным методом по методике А. Gratia, изучалась морфология негативных колоний протейных фагов. Этот показатель является основным биологическим признаком клонов бактериофагов, позволяю-

щим проводить скрининговые (отборочные) дифференциальные тесты бактериальных патогенов на газоне индикаторной культуры. Установлено, что при высеве на МПА образуются негативные колонии с четким краем и прозрачным центром различного диаметра в диапазоне от $0,5 \pm 0,1$ до $0,9 \pm 0,1$ мм (таблица 19, рисунок 28).

Для определения специфичности изучаемых протейных бактериофагов были проведены эксперименты на культурах *Providencia spp.*, *Morganella spp.*, *Escherichia spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*

Экспериментально было установлено отсутствие зон лизиса на газоне вышеназванных культур, что свидетельствует о строгой специфичности изучаемых фагов. Полученные данные по изучению спектра специфичного литического действия свидетельствуют о том, что выделенные и селекционированные в 2017 году бактериофаги рода *Proteus* активно работают в широком диапазоне изучаемых культур. Совокупный процент лизиса у 6 бактериофагов составляет 100 % (таблица 20). Выявлены два бактериофага FPr - 11 УГСХА и FPr - 13 УГСХА, совокупный лизис которых также составляет 100 %. Они также характеризуются высокими титрами и, поэтому, будут использованы в дальнейшем для конструирования экспериментального биопрепарата. Исследования протейных бактериофагов, закрытых в стерильные флаконы без добавления консерванта, которые хранились в условиях бытового холодильника ($2-4^{\circ}\text{C}$) проводили методом диффузии в «мягкий» методом агаровых слоев по А. Gratia. Результаты исследований представлены в таблице 21.

Опытным путем нами установлено, что в течение 1-3 месяцев показатели литической активности исследуемых бактериофагов осталась без изменений. Последующие исследования свидетельствуют об относительно невысокой скорости снижения показателя литической активности в пределах 6 месяцев, когда велся мониторинг данного показателя.

Таблица 19. Показатели некоторых биологических свойств изучаемых протейных бактериофагов.

№	Название бактериофага и индикаторной культуры, на которой он селекционируется	Результат изучения характерных биологических свойств бактериофагов рода <i>Proteus</i> на индикаторной бактериальной культуре			
		Литическая активность, БОЕ /мл (по методу агаровых слоев по Грациа)	Литическая активность (по методу Аппельмана)	Спектр литического действия на культуре (по Отто)	Морфология негативных колоний, мм
1	FPr - 10 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 41	2,4±0,1x10 ⁸	10 ⁻⁷	++	0,5±0,1
2	FPr - 11 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 42	3,1±0,1x10 ⁹	10 ⁻⁸	+++	0,6±0,1
3	FPr - 12 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 43	1,4±0,3x10 ⁸	10 ⁻⁷	+	0,9±0,1
4	FPr - 13 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 53	5,7±0,1x10 ⁹	10 ⁻⁸	+++	0,5±0,1
5	FPr - 14 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 54	2,4±0,1x10 ⁷	10 ⁻⁶	+	0,7±0,1
6	FPr - 15 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 56	2,6±0,1x10 ⁸	10 ⁻⁷	++	0,8±0,1

Таблица 20. Изучение спектра литического действия бактериофагов рода *Proteus*.

№	Название культуры	Наличие лизиса на газоне культуры при нанесении фага					
		Pr – 10 УГСХА	Pr – 11 УГСХА	Pr – 12 УГСХА	Pr – 13 УГСХА	Pr – 14 УГСХА	Pr – 15 УГСХА
1.	<i>Proteus mirabilis</i> Тр. 1 Культ.	+	+	-	++	+	+
2.	<i>Proteus mirabilis</i> 95/98	-	+	++	+	-	-
3.	<i>Proteus mirabilis</i> 31/82	-	++	+	-	++	++
4.	<i>Proteus mirabilis</i> 14 3"П"	+	+	-	++	+	-
5.	<i>Proteus mirabilis</i> 4/2 3"П"	+	-	+	+	-	-
6.	<i>Proteus mirabilis</i> 31/32	+	+	-	+	++	+
7.	<i>Proteus mirabilis</i> 523	-	+++	-	-	-	-
8.	<i>Proteus mirabilis</i> 491	+	+	-	++	+	+
9.	<i>Proteus vulgaris</i> Кыз.с/х Тр. 1 цел.	-	-	++	+	-	-
10.	<i>Proteus vulgaris</i> Кыз. с/х фекал	-	-	-	+	+	-
11.	<i>Proteus vulgaris</i> 82/98	-	++	++	-	-	-
12.	<i>Proteus vulgaris</i> 3"П" №3	-	+++	-	-	-	++
13.	<i>Proteus vulgaris</i> 85/98	-	+	-	++	+	-
14.	<i>Proteus vulgaris</i> 55А	++	+	++	-	-	+
15.	<i>Proteus vulgaris</i> 261	-	+	-	+	-	-
16.	<i>Proteus vulgaris</i> 1	-	-	-	+	+	-
17.	<i>Proteus vulgaris</i> 2	-	++	+	-	-	-
18.	<i>Proteus vulgaris</i> 3	+	-	-	+	++	++
19.	<i>Proteus vulgaris</i> 4	-	+	++	-	-	-
20.	<i>Proteus vulgaris</i> 5	+	+	-	-	+	+
21.	<i>Proteus vulgaris</i> 6	-	-	-	++	-	-
22.	<i>Proteus vulgaris</i> 7	-	+	-	-	+	-
23.	<i>Proteus vulgaris</i> 8	-	-	++	-	-	+
24.	<i>Proteus vulgaris</i> 9	-	++	-	+	++	-
25.	<i>Proteus vulgaris</i> 10	++	-	-	+	-	+
26.	<i>Proteus mirabilis</i> 1	-	++	+	+	-	-
27.	<i>Proteus vulgaris</i> 1 УГСХА	+	+	-	+	-	-
28.	<i>Proteus vulgaris</i> 3 УГСХА	-	+	++	-	-	-

29.	<i>Proteus mirabilis</i> 12 УГСХА	-	-	-	+	++	+
30.	<i>Proteus vulgaris</i> 13 УГСХА	+++	+	+	-	-	-
31.	<i>Proteus vulgaris</i> 16 УГСХА	-	++	+	++	-	++
32.	<i>Proteus mirabilis</i> 18 УГСХА	-	-	-	++	++	-
33.	<i>Proteus vulgaris</i> 21 УГСХА	-	+++	+	-	-	+
34.	<i>Proteus mirabilis</i> 24 УГСХА	+	+	++	-	-	-
35.	<i>Proteus mirabilis</i> 25 УГСХА	+	+	+	-	+	-
36.	<i>Proteus vulgaris</i> 28 УГСХА	-	++	+	-	-	++
37.	<i>Proteus vulgaris</i> 32 УГСХА	+	+	-	+	-	-
38.	<i>Proteus vulgaris</i> 33 УГСХА	+	+	-	++	+	-
39.	<i>Proteus mirabilis</i> 36 УГСХА	-	+	-	+	+	++
40.	<i>Proteus mirabilis</i> 37 УГСХА	-	+	++	+	++	-
41.	<i>Proteus vulgaris</i> 38 УГСХА	+	++	+	-	-	++
42.	<i>Proteus mirabilis</i> 40 УГСХА	+	-	+	++	+	+
43.	<i>Proteus vulgaris</i> 41 УГСХА	+	++	-	-	+	+
44.	<i>Proteus vulgaris</i> 42 УГСХА	-	+	-	+	-	-
45.	<i>Proteus vulgaris</i> 43 УГСХА	-	+	+	-	++	-
46.	<i>Proteus vulgaris</i> 44 УГСХА	+++	-	-	++	+	-
47.	<i>Proteus vulgaris</i> 45 УГСХА	+	+	++	-	-	-
48.	<i>Proteus vulgaris</i> 46 УГСХА	-	+	-	-	+	++
49.	<i>Proteus vulgaris</i> 47 УГСХА	-	+++	-	-	-	-
50.	<i>Proteus vulgaris</i> 48 УГСХА	++	-	-	++	++	+
51.	<i>Proteus vulgaris</i> 49 УГСХА	-	+	++	+	-	-
52.	<i>Proteus mirabilis</i> 50 УГСХА	++	-	-	+	-	+
53.	<i>Proteus mirabilis</i> 51 УГСХА	-	+	+	+	-	-
54.	<i>Proteus mirabilis</i> 52 УГСХА	-	+	++	-	++	-
55.	<i>Proteus vulgaris</i> 53 УГСХА	+	-	-	++	-	-
56.	<i>Proteus vulgaris</i> 54 УГСХА	+	+	+	-	++	-
57.	<i>Proteus vulgaris</i> 55 УГСХА	-	+	-	-	+	-
58.	<i>Proteus vulgaris</i> 56 УГСХА	+	+++	-	+	-	++
Количество лизируемых культур		25	43	26	33	27	22
Процент лизиса		43,1	74,1	44,8	56,9	46,5	37,9

Примечание: «+» - отмечена зона лизиса по ходу стекания капли бактериофага на газоне культуры;
«++» - отмечена зона лизиса по ходу стекания капли бактериофага с проявлением стерильных пятен на газоне культуры.

Таблица 21. Изменение литической активности протейных бактериофагов при хранении.

	Название бактериофага и индикаторной культуры, на которой он селекционируется	Литическая активность, БОЕ /мл (по методу агаровых слоев по Грация)			
		перед закупориванием	через 1 месяц	через 3 месяца	через 6 месяцев
1	FPr - 10 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 41	2,4±0,1х10 ⁸	2,3±0,1х10 ⁸	2,1±0,1х10 ⁸	1,6±0,1х10 ⁷
2	FPr - 11 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 42	3,1±0,1х10 ⁹	3,0±0,1х10 ⁹	2,9±0,1х10 ⁹	2,0±0,1х10 ⁸
3	FPr - 12 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 43	1,4±0,3х10 ⁸	1,3±0,1х10 ⁸	1,2±0,3х10 ⁸	0,9±0,1х10 ⁷
4	FPr - 13 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 53	5,7±0,1х10 ⁹	5,6±0,1х10 ⁹	5,3±0,1х10 ⁹	4,9±0,1х10 ⁸
5	FPr - 14 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 54	2,4±0,1х10 ⁷	2,3±0,1х10 ⁷	2,1±0,1х10 ⁷	1,8±0,1х10 ⁶
6	FPr - 15 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 56	2,6±0,1х10 ⁸	2,4±0,1х10 ⁸	2,2±0,1х10 ⁸	1,9±0,1х10 ⁷

Последующее 5-6 кратное пассивирование бактериофагов на индикаторных культурах позволило восстановить исходный титр фага, который был установлен при укупоривании в стерильные флаконы.

Изучение показателей урожайности выделенных бактериофагов

Изучение интенсивности адсорбции фагов на клетках хозяев

Адсорбцию выделенных и селекционированных бактериофагов изучали при взаимодействии их с культурами клеток-хозяев общепринятым методом по М. Адамсу, который основан на исследовании количества корпускул неадсорбированного фага в смеси бактерия-фаг. В качестве бактериальных клеток-хозяев использовали индикаторные культуры бактерий *Proteus*. Адсорбцию фага FPr - 11 УГСХА изучали на клетках *Proteus vulgaris* 42; FPr - 13 УГСХА - *Proteus vulgaris* 53.

Время адсорбции для каждого фага устанавливали индивидуально в зависимости от процента максимальной адсорбции для конкретной смеси (фаг+клетка хозяина).

В результате проведенных исследований было установлено, что изучаемые бактериофаги имели разные показатели скорости адсорбции (таблица 22): фаг FPr - 11 УГСХА за 6 минут адсорбировался на клетках *Proteus vulgaris* 42 в количестве 68,8 %, константа скорости адсорбции $K = 3,8 \text{ см}^3/\text{мин}^{-1}$; фаг FPr - 13 УГСХА при контакте с клетками *Proteus vulgaris* 53 в течение 7 минут адсорбировался на них 87,2 %, константа скорости адсорбции составила $K = 5,8 \text{ см}^3/\text{мин}^{-1}$.

Таблица 22. Результаты опыта по изучению скорости адсорбции селекционированных бактериофагов на клетках индикаторных культур.

Название фага и микроорганизма	Время адсорбции максимального количества фага (мин)	Количество фага до адсорбции (по показателю негативных колоний) $M \pm m$	Количество неадсорбированного фага (по показателю бляшкообразующие единиц) $M \pm m$	Процент адсорбции (%)
FPr - 11 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 42	5	109,0±8,6	61,6±5,8	56,7
	6		34,0±2,5	68,8
	Константа скорости адсорбции K= 3,8 см ³ /мин ⁻¹			
FPr - 13 УГСХА / <i>Proteus vulgaris</i> 53	5	180,0±15,2	81,1±1,0	55
	6		42,7±2,5	76,3
	7		23,0±4,3	87,2
	Константа скорости адсорбции K= 5,8 см ³ /мин ⁻¹			

Установлено, что наиболее выраженные показатели скорости адсорбции на клетках-хозяев были у бактериофага FPr - 11 УГСХА.

Для определения длительности латентного периода и урожайности фага использовали способ изучения одиночного цикла размножения фага без применения антифаговой сыворотки. В основу метода положено свойство эмбихина избирательно инактивировать различные фаги без повреждения бактерий [26]. В предварительном опыте параллельного титрования эмбихина на исследуемых фагах FPr - 11 УГСХА и FPr - 13 УГСХА и соответствующем бактериальном хозяине *Proteus vulgaris* 53 и *Proteus vulgaris* 42 устанавливается рабочая доза препарата, т.е. то его количество, которое в 0,9 мл физиологического раствора способно за 5 минут при 37 °С инактивировать 90-95 % фага при исходной его концентрации $3-5 \times 10^7$ частиц в 1 мл. Опытным путем установлено, что препарат в рабочей дозе в аналогичных условиях не должен оказывать антибактериального действия при контакте с $4,4 \times 10^8$ бактерий (таблица 23). В экспериментах определено, что рабочая доза эмбихина была равна 7 γ, т.е. среднему из двух последних эффективных доз.

После определения рабочей дозы проводили основной опыт. Бактериальные культуры, выращенные в мясо-пептонном бульоне и находящиеся в логарифмической фазе роста, разводили мясо-петонным бульоном до концентрации бактерий $4,4 \times 10^8$ в 1 мл. К 0,9 мл такой культуры, предварительно адаптированной к 36 ± 1 °С, добавляли соответствующего бактериофага 0,1 мл, содержащего $4,4 \times 10^8$ БОЕ/мл, смесь инкубировали в термостате в течение 5 минут, а затем 0,1 мл переносили в 0,9 мл физиологического раствора с рабочей дозой эмбихина, предварительно прогретого в водяной бане при 36 ± 1 °С.

Таблица 23. Определение рабочей дозы эмбихина FPr - 11 УГСХА и *Proteus vulgaris* 42.

	Доза эмбихина в 0,9 мл физиологического раствора				
	50 γ	25 γ	10 γ	5 γ	контроль
Количество бактерий при высеве 0,1 мл из соответствующего разведения	340	304	408	484	441
Количество негативных колоний фага при высеве 0,1 мл из соответствующего разведения	0	0	4	167	1884

После 5-минутной инкубации смеси при 36 ± 1 °C опыт продолжали по методу Эллиса и Дельбрюка.

Затем из этой пробирки брали 0.1 см^3 жидкости, которую вносили к $9,9 \text{ см}^3$ бульона. Из четвертой пробирки брали $0,1 \text{ см}^3$ жидкости и вносили в $9,9 \text{ см}^3$ бульона (пятая пробирка). Получая указанные разведения, мы стремились создать постоянную и наименьшую концентрацию частиц фага в четвертой пробирке и свести ее на нет в пятой с целью возможности подсчета колоний фага по окончании латентного периода.

Результаты исследований отражены в таблицах 24-25.

Из 4 и 5 пробирок приготовленными разведениями через каждые 1-2 минуты брали по $0,1 \text{ см}^3$ жидкости и засевали в две бактериологические чашки по методу агаровых слоев. Подсчет

Таблица 24. Изучение латентного периода и урожайности бактериофага FPr - 11 УГСХА.

Время начала опыта	Число негативных колоний фага при высеве из 4-ой пробирки, $M \pm m$	Число негативных колоний фага при высеве из 5-ой пробирки, $M \pm m$
15	$136,3 \pm 6,0$	
17	$125,0 \pm 5,6$	
20	$138,3 \pm 3,8$	
25	$177,0 \pm 7,5$	
27	$648,0 \pm 62,6$	$17,3 \pm 3,4$
29	Стерильное пятно	$16,3 \pm 3,8$
30	Сливной рост негативных колоний	$21,0 \pm 5,5$
35	Лизис	$56,3 \pm 4,5$
40		$65,0 \pm 4,8$
45		$61,7 \pm 2,6$
50		$69,7 \pm 8,3$
55		$72,3 \pm 4,9$
60		$74,0 \pm 8,1$

Таблица 25. Изучение латентного периода и урожайности бактериофага FPr - 13 УГСХА.

Время начала опыта	Число негативных колоний фага при высеве из 4-ой пробирки, $M \pm m$	Число негативных колоний фага при высеве из 5-ой пробирки, $M \pm m$
15	$15,0 \pm 2,0$	
17	$16,0 \pm 2,0$	
19	$12,0 \pm 6,2$	
20	$13,3 \pm 7,5$	
21	$41,7 \pm 3,1$	$5,7 \pm 1,55$
23	$72,0 \pm 6,0$	$15,3 \pm 2,5$
25	$356,0 \pm 13,1$	$20,0 \pm 4,0$
30	Лизис	$12,0 \pm 1,0$
35		$27,3 \pm 7,6$
40		$28,7 \pm 3,1$
45		$20,7 \pm 10,8$
60		$15,0 \pm 2,6$

негативных колоний проводили после 16-18 часового инкубирования чашки при 36 ± 1 °С.

Латентный период внутриклеточного развития фага FPr - 11 УГСХА на клетках *Proteus vulgaris* 42 равен 25-26 минут (таблица 24). Среднее количество негативных колоний на чашках при высеве из 4-ой пробирки с 15 по 20 минуту опыта равно 131,1, а при высеве с 40 по 60 минуту из пятой пробирки – 64,45. Ср. урожайность бактериофага FPr - 11 УГСХА равна $6445:133=49,66$ вирусных частиц на одну микробную клетку *Proteus vulgaris* 42.

Латентный период внутриклеточного развития фага FPr - 13 УГСХА на клетках *Proteus vulgaris* 53 равен 21-22 минуты (таблица 25). Среднее количество негативных колоний на чашках при высеве из 4-ой пробирки с 15 по 20 минуту опыта равно 14, а при высеве с 23 по 60 минуту из пятой пробирки – 19,86. Ср. урожайность бактериофага FPr - 13 УГСХА равна $1986:14=141,9$ вирусных частиц на одну микробную клетку *Proteus vulgaris* 53.

Для изучения морфологии бляшкообразующих единиц проводили электронно-микроскопические исследования лизатов бульонных культур: *Proteus vulgaris* 42 и *Proteus vulgaris* 53 с бактериофагами FPr-11 УГСХА и FPr-13 УГСХА в титре от $3,1 \pm 0,1 \times 10^9$ до $5,7 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл в 1 мл (по Грациа). В результате проведенных исследований было установлено, что вирионы фага FPr-11 УГСХА имеют структуры, состоящие из головки гексагональной формы размером 25 нм (± 4) и аналога отростка длиной 1,2 нм ($\pm 0,2$). Вирионы бактериофага П-261 УГСХА имеют сходные с фагом и FPr-13 УГСХА структуры: головку гексагональной формы размером 22,5 нм ($\pm 0,2$) и аналог отростка длиной 0,6 нм ($\pm 0,1$) (рисунок 29). В соответствии с Международной номенклатурой вирусов по морфологическим параметрам оба фага, П-16 УГСХА и П-261 УГСХА, были отнесены к семейству Podoviridae (Murphy, 1995), по классификации А. С. Тихоненко (1968) - ко II морфологической группе: «Фаги с аналогами отростка» [7,77-78].

Результаты определения оптимальных температурных показателей культивирования свидетельствуют о том, что оптимальной является температура культивирования специфических бактериофагов - 37 °С. Установлено оптимальное соотношение специфического бактериофага и индикаторной культуры 1:1, т.е. 0,2 мл фага FPr - 13 УГСХА (FPr - 11 УГСХА) х 0,2 мл индикаторной культуры *Proteus vulgaris* 53 (*Proteus vulgaris* 42), оптимальное время пассажа составляет 3,5 часа. За это время происходил лизис индикаторной культуры (просветление среды по сравнению с контролем), литическая активность специфических бактериофагов FPr - 11 УГСХА и FPr - 13 УГСХА составляла $3,1 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл по Грациа и 10^{-8} по Аппельмкнуну соответственно ($5,7 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл; 10^{-8}).

При проведении исследований были изучены некоторые биологические свойства протейных бактериофагов FPr-10 УГСХА, FPr-11 УГСХА, FPr-12 УГСХА, FPr-13 УГСХА, FPr-14 УГСХА, FPr-15 УГСХА, выделенных и селекционированных авторами самостоятельно в 2015-2016 гг.

Исследования по определению литической активности бактериофагов рода *Proteus* выявили следующее: титр литической активности колеблется в диапазоне от 10^{-6} до 10^{-8} по Аппельману и от $2,4 \pm 0,1 \times 10^7$ до $5,7 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ (бляшкообразующих единиц)/мл по Грациа. Наиболее высокие титры имели фаги FPr - 11 УГСХА ($3,1 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл; 10^{-8}) и FPr - 13 УГСХА ($5,7 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл; 10^{-8}).

Морфология негативных колоний изучаемых фагов представлена бляшкообразующими единицами с четким краем и прозрачным центром различного диаметра в диапазоне от $0,5 \pm 0,1$ до $0,9 \pm 0,1$ мм.

Определено, что изучаемые бактериофаги *Proteus* специфичны в пределах рода, обладают перекрестным лизисом в пределах видов *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis*. Совокупный процент лизиса шести бактериофагов на 58 культурах составил 100 %.

Протейные фаги являются строго специфичными в пределах рода и не лизируют культуры: *Providencia spp.*, *Morganella spp.*,

Escherichia spp., *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersinia spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Pseudomonas spp.*

Установлено, что в течение 1-3 месяцев показатели литической активности исследуемых бактериофагов оставалась без изменений. Через 6 месяцев наблюдений он снизился на 1 порядок, но был восстановлен 5-6 кратным пассированием на индикаторных культурах.

Установлено, что средняя урожайность бактериофага FPr - 13 УГСХА равна $1986:14=141,9$ вирусных частиц на одну микробную клетку *Proteus vulgaris* 53 и средняя урожайность бактериофага FPr - 11 УГСХА равна $6445:133=49,66$ вирусных частиц на одну микробную клетку *Proteus vulgaris* 42.

Изученные свойства протейных фагов позволяют систематизировать биологические особенности каждого из выделенных клонов вирулентных бактериофагов и произвести отбор двух фагов - FPr - 11 УГСХА и FPr - 13 УГСХА для конструирования в перспективе биопрепарата для обработки бактериофагами пищевого сырья и готовой продукции. Результаты экспериментов доказывают, что применение бактериофагов способствует увеличению сроков хранения пищевого сырья и продовольственных товаров, так как эффективно элиминируют микроорганизмы с поверхности продукции.

5.1.2 БАКТЕРИОФАГИ *AEROMONAS SALMONICIDA*

(Материал подготовлен по результатам исследовательской работы Н. Г. Куклиной, Д. А. Васильева)

Бактерии *Aeromonas salmonicida* являются возбудителями фурункулеза (аэромоноза) лососевых. Данное заболевание впервые было описано Эммерихом и Вайбелем еще в 1894 году в Германии. В России впервые бактерии этого вида изолировали в 1989 г. от кеты из Берингова моря.

Долгое время считалось, что *A. salmonicida* поражает рыб только семейства Лососевые, но современные исследования показывают увеличение частоты инфицированности рыб, не относящихся к данному семейству.

Кроме того, существуют исследования, указывающие на выделение *A. salmonicida* из крови человека, что косвенно указывает на опасность для здоровья человека. Развитие новых представлений в конце XX начале XXI века, как о молекулярной биологии, так и об экологических взаимоотношениях бактериофагов и их хозяев, а также все более широкое распространение в биосфере антибиотикорезистентных микроорганизмов, актуализировали своего рода второе рождение вирусов бактерий (бактериофагов). Существенно возросшее количество персистирующих антибиотикорезистентных патогенных и условно-патогенных микробов, утяжеляющих клиническое течение патологических состояний и ухудшающих показатели инфекционной заболеваемости во многих странах мира, связано, как с бесконтрольным и некорректным применением антибиотиков в лечении ряда заболеваний и профилактики нозокомиальных инфекций, так и с массовым применением консервантов и бактерицидных препаратов в пищевой промышленности, а также сельском хозяйстве.

Переход на потребление экологически чистых не обработанных антибактериальными средствами продуктов питания, а также использования в повседневной гигиенической практике

натуральных природных компонентов из растительного и биологического сырья подразумевает поиск новых и возрождение известных ранее форм и методов деконтаминации пищевого сырья и готовой продукции. Многочисленные исследования, проведенные отечественными и зарубежными учеными, подтверждают возможность использования бактериофагов в качестве природных антимикробных агентов для борьбы с бактериальными инфекциями пищевого сырья и готовой продукции, в том числе вызванных антибиотикорезистентными штаммами.

В результате проведенных исследований в отношении бактерии *A. salmonicida* выделено 3 штамма бактериофагов. Бактериофаги *A. salmonicida* были выделены из водных источников Ульяновской области (таблица 26).

Морфология негативных колоний выделенных бактериофагов бактерий *Aeromonas salmonicida*.

Морфологию негативных колоний бактериофагов изучали при помощи метода агаровых слоев. В пробирку с 2,5 мл 0,7% МПА, расплавленного и остуженного до 45 °С вносили 1 мл фага в разведении 10^{-7} (для получения изолированных негативных колоний) и 0,2 мл суточной бульонной культуры референс-штамма *A. salmonicida* АТСС 33658. Содержимое пробирок тщательно перемещивали вращением между ладонями и выливали на поверхность 1,5 % МПА. После застывания агара чашки помещали в термостат на 18-24 ч при температуре 28 °С.

Негативные колонии бактериофагов Ars11-УГСХА имеют диаметр 0,5 – 1 мм, полностью прозрачные, без зоны вторичного лизиса. Негативные колонии бактериофагов Ars 25-УГСХА – имеют диаметр 1-2 мм, полупрозрачные, без зоны вторичного лизиса. Негативные колонии бактериофагов Ars10/2–УГСХА имеют диаметр 1 – 1,5 мм, прозрачные, без зоны вторичного лизиса (рисунок 30).

Таблица 26. Объекты выделения бактериофагов *A. salmonicida*.

№ п/п	Название фага	Источник выделения
1.	Ars11-УГСХА	р. Волга, Железнодорожный район г. Ульяновска
2.	Ars25- УГСХА	р. Волга, пос. Сланцевый рудник Ульяновская область
3.	Ars10/2-УГСХА	Ульяновская область Сенгилеевский район с. Тушна

Литическая активность фага оценивается по его способности лизировать бактериальную культуру на жидких или плотных средах и выражается максимальным разведением, в котором испытуемый бактериофаг проявляет свое литическое действие. Для определения литической активности бактериофагов, выращивали суточную бульонную культуру *A.salmonicida* ATCC 33658. Литическая активность выделенных нами бактериофагов была определена нами по методу Аппельмана и Грациа и представлена в таблице 27.

Спектр литической активности исследуемых бактериофагов. Для определения спектра литической активности использовали метод нанесения фага на газон бактериальной культуры.

Для изучения спектра литической активности выбранного бактериофага (Ars25-УГСХА) нами было использовано 1 референс (*A.salmonicida* ATCC 33658) и 23 полевых штамма *A. salmonicida*.

На чашки Петри с МПА при помощи пастеровской петли было нанесено 3-4 капли 24-х часовой бульонной культуры исследуемых микроорганизмов и равномерно распределено по поверхности среды стерильным шпателем. Затем чашки были поставлены в термостат на 20-30 минут для подсушивания.

На поверхность засеянной среды по секторам пастеровской пипеткой легким прикосновением капли был нанесен бактериофаг, затем посеы инкубировались в течение 18-24 ч при температуре 28°C.

Результаты исследования представлены в таблице 28.

Таблица 27. Литическая активность фага *A.salmonicida* по Аппельману и по Грациа.

№ п/п	Название фага	Литическая активность по Грациа	Литическая активность по Аппельману
1.	Ars25- УГСХА	$0,3 \times 10^{10} \pm 0,1 \times 10^{10}$	10^{-9}
2.	Ars10/2-УГСХА	$0,4 \times 10^{10} \pm 0,9 \times 10^{10}$	10^{-9}
3.	Ars11-УГСХА	$0,2 \times 10^{10} \pm 0,1 \times 10^{10}$	10^{-9}

Таблица 28. Спектр литической активности фагов по отношению к штаммам *A. salmonicida*.

№ п/п	Название фага	Количество испытанных штаммов <i>A.salmonicida</i>	Количество лизируемых штаммов <i>A.salmonicida</i>	Процент лизируемых штаммов <i>A.salmonicida</i> , %
1.	Ars10/2-УГСХА	24	19	79,2
2.	Ars25- УГСХА	24	21	87,5
3.	Ars11-УГСХА	24	17	70,8

Специфичность действия исследуемого бактериофага *A.salmonicida* В практике для дифференциации бактерий используется видовая специфичность фагов. Для определения видовой специфичности отобранного бактериофага, нами были использованы следующие штаммы бактерий: *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *Aeromonas sobria* ATCC 9071, *Aeromonas caviae* ATCC 12633, *Pseudomonas putida* № 12633, *Pseudomonas aeruginosa* № 128, *Pseudomonas fluorescens* № 13525, *Yersinia ruckeri* № 6, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus mirabilis* № 523, *Klebsiella pneumonia* № 4463, *Escherihia coli* № 4.

Определение видовой специфичности исследуемых фагов проводили следующим образом: в чашках Петри по поверхности с МПА равномерно распределяли 18-часовые бульонные культуры исследуемых бактерий, подсушивали в термостате 20-30 минут. Затем на поверхность засеянной среды пастеровской пипеткой наносили бактериофаг Ars25- УГСХА и инкубировали при температуре 37 °С, посевы *Pseudomonas fluorescens* № 13525 при 28 °С в течение 18-24 часов.

Результаты исследования показали, что бактериофаг строго специфичен по отношению к *A.salmonicida* и не лизируют бактерии других видов и родов (таблица 29). По результатам определения спектра литической активности и изучения специфич-

Таблица 29. Специфичность выделенных бактериофагов *A. salmonicida*.

№ п/п	Вид бактерий	Ars10/2-УГСХА	Ars25- УГСХА	Ars11-УГСХА
1.	<i>Aeromonas salmonicida</i> ATCC 33658	+	+	+
2.	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 49140	-	-	-
3.	<i>Aeromonas sobria</i> ATCC 9071	-	-	-
4.	<i>Aeromonas caviae</i> ATCC 15468	-	-	-
5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> №128	-	-	-
6.	<i>Pseudomonas putida</i> №12633	-	-	-
7.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 13525	-	-	-
8.	<i>Proteus mirabilis</i> 523	-	-	-
9.	<i>Yersinia ruckeri</i> 6	-	-	-
10.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-	-
11.	<i>Klebsiella pneumonia</i> 4463	-	-	-

Примечание: «-» - отсутствие лизиса,
«+» - наличие лизиса.

ности выделенных бактериофагов было решено использовать в дальнейших исследованиях бактериофаг Ars25- УГСХА.

Оптимальное соотношение между временем пассажа и активностью фага

В пробирку с 4,5 мл МПБ было добавлено 0,2 мл суточной культуры штамма *A.salmonicida* ATCC 33658 и 0,2 мл фага Ars25- УГСХА. Параллельно был поставлен контроль: МПБ, засеянный суточной культурой без фага. Посевы были культивированы при температуре 28 °С в течение 4, 6, 8, 10, 12, 14 часов. После культивирования пробирки с фагом были обработаны при помощи стерильных мембранных фильтров. Литическую активность полученных фаголизатов исследовали методом по Грациа (таблица 30).

Изучение длительности латентного периода и урожайности бактериофагов

Определение времени латентного периода развития фагов проводили по методу Эллиса и Дельбрюка на индикаторных культурах, выращенных в питательном бульоне в течение 18-20 часов. Для этого готовили систему вирус-клетка. К 0,9 см³ бульонной культуры, содержащей 5×10^7 микробных клеток, добавляли 0,1 см³ бактериофага в концентрации 5×10^6 корпускул в 1 см³, чтобы множественность инфекции составляла 0,1. Приготовленную смесь помещали в водяную баню при 28 °С. По истечении времени адсорбции фага на бактериях брали 0,1 см³ смеси и добавляли ее к приготовленной нами 0,9 см³ антифаговой сыворотки в разведении 1:100. Через 5 мин для прекращения нейтрализации фага 0,1 см³ смеси разводили в 0,9 см³ питательного бульона. Затем из этой пробирки брали 0,1 см³ жидкости, кото-

Таблица 30. Зависимость титра фага от времени пассажа Ars25 - УГСХА.

Название фага	Вариант эксперимента с фагом	Время пассажа, часы	Литическая активность по методу Грациа, БОЕ/мл
Ars 25-УГСХА	1	4	$0,7 \times 10^6 \pm 0,6 \times 10^6$
	2	6	$0,9 \times 10^7 \pm 0,9 \times 10^7$
	3	8	$0,4 \times 10^8 \pm 0,2 \times 10^8$
	4	10	$0,3 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$
	5	12	$0,3 \times 10^{10} \pm 0,3 \times 10^{10}$
	6	14	$0,2 \times 10^{10} \pm 0,2 \times 10^{10}$

рую вносили к 9,9 см³ бульона. Из четвертой пробирки брали 0,1 см³ жидкости и вносили в 9,9 см³ бульона (пятая пробирка).

Из 4 и 5 пробирок приготовленными разведениями через каждые 1-2 минуты брали по 0,1 см³ жидкости и засеивали в две бактериологические чашки по методу агаровых слоев. Подсчет негативных колоний проводили после 16-18 часового инкубирования чашки при 37 °С. Латентный период фага Ars25- УГСХА на клетках *A. salmonicida* ATCC 33658 равен 20 минутам. Среднее количество негативных колоний фага на чашках при посеве из 4-й пробирки за период с 15 по 19 минуту опыта было равно 70,6 (таблица 31). Среднее количество негативных колоний, образовавшихся при высеве из 5-пробирки с 32 по 60 минуту, равнялось 169,87. Следовательно, урожайность бактериофага Ars25- УГСХА равна $16987:70,6=240,61$ фаговых корпускул на одну микробную клетку.

Температурная устойчивость бактериофага *Ars25- УГСХА*. Для определения температурной устойчивости фага пробирки в разведении 1:10 в МПБ прогревали в ультратермостате в течение 30 минут при температуре от 45 °С и выше с шагом в 2 °С.

Таблица 31. Изучение латентного периода и урожайности бактериофага Ars25- УГСХА.

Время начала опыта	Число негативных колоний фага при высеве из 4-ой пробирки M±m	Число негативных колоний фага при высеве из 5-ой пробирки M±m
15	68,3±3,2	
17	67,9±6,4	
18	70,8±4,2	
19	75,4±3,8	
20	172,5±4,6	14,8±0,7
21	Полосы лизиса	87,4±7,1
22	Лизис	94,7±5,8
24		75,3±5,8
25		84,0±2,5
26		92,1±3,3
28		85,2±10,7
30		158,9±8,1
32		165,4±10,2
36		170,1±20,6
39		174,3±15,9
41		169,0±6,4
50		175,7±10,3
60		164,7±5,9

Одновременно с этим ставили контроль. После воздействия температуры активность фагов определяли по методу Грация.

Результаты показали, что прогревание бактериофага *Ars25-УГСХА* при температуре 45-47 °С не оказывает влияния на содержание активных корпускул фага в 1 мл. Дальнейшее повышение температуры приводит к снижению активности фага. При нагревании фага до температуры 55 °С и выше – бактериофаг погибает (таблица 32).

Устойчивость бактериофага *Ars25-УГСХА* к воздействию хлороформа. Определение чувствительности бактериофага и бактерий было проведено путем обработки фаговой суспензии хлороформом 1:10 при постоянном встряхивании. Контролем служит пробирка с бактериофагом, необработанным хлороформом. После воздействия хлороформа активность бактериофаги определяли по методу Грация.

Бактериофаг *Ars25-УГСХА* проявил выраженную неустойчивость к воздействию хлороформа (таблица 33).

Последующие эксперименты были направлены на изучение изменения литической активности укупоренного во флакон бактериофага *Ars25-УГСХА*, хранящийся в условиях холодильника в течение 12 месяцев. Показатель литической активности фага при хранении определяется по классической методике определения активности методом агаровых слоев по Грация.

Опытным путем установлено, что в течение 3-х месяцев показатель литической активности исследуемого бактериофага *Ars25-УГСХА* оставался практически без изменений $0,2 \times 10^{10} \pm 0,1 \times 10^{10}$ БОЕ/мл. Через 6 месяца литическая активность снижалась и составила у бактериофага *Ars25-УГСХА* $2,1 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$ БОЕ/мл, через 9 месяцев литическая активность снизилось до значения $1,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$ БОЕ/мл и через 12 месяцев показатель составил $0,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$ БОЕ/мл. Результаты исследований представлены в таблице 34.

Экспериментально установлено, что пассирование бактериофагов на исходном штамме бактерий *A. salmonicida* ATCC 33658

в течение 6 пассажей методом агаровых слоев восстанавливает литическую активность бактериофагов на 1 порядок.

Изучены основные биологические свойства фага Ars25- УГС-ХА (литическая активность – $0,3 \times 10^{10} \pm 0,1 \times 10^{10}$ БОЕ/мл (по Грациа) и 10^{-9} – по Аппельману, спектр литического действия составляет 87,5 %. Является строго специфичным по отношению к *Aeromonas salmonicida*. Бактериофаг Ars25- УГСХА сохраняет литическую активность при воздействии температуры в диапазоне 45-53 °С, не выдерживает воздействия хлороформа в соотношении 1:10 во временном интервале 10-40 минут. Установлено, что оптимальное время пассажа при температуре 28 °С для фага Ars 25-УГСХА составляет 12 часов, после 14 часов не происходит заметного изменения литической активности фага. Определено, что в течение 3 месяцев показатели литической активности исследуемого бактериофага остались практически без изменений, при хранении в условиях 2-4 °С. Нужно отметить, что бактериофаг Ars25- УГСХА при хранении в условиях 2-4 °С в течение 12 месяцев также не значительно снижал литическую активность.

Таблица 32. Изменение титра бактериофага Ars25- УГСХА при увеличении температуры культивирования.

Температура, °С	Титр бактериофага Ars25- УГСХА
45	$0,3 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$
47	$0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$
49	$0,4 \times 10^6 \pm 0,2 \times 10^6$
51	$0,7 \times 10^5 \pm 0,7 \times 10^5$
53	$0,5 \times 10^3 \pm 0,4 \times 10^3$
55	-
57	-
59	-
61	-
Контроль фага	$0,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$

Таблица 33. Устойчивость фага Ars25- УГСХА к воздействию хлороформа

№	Фаг	Количество активных корпускул фага в 1 мл				
		Обработка 10 мин.	Обработка 20 мин.	Обработка 30 мин.	Обработка 40 мин.	Контроль
1	Ars25- УГСХА	-	-	-	-	$3,0 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$

Таблица 34. Показатель литической активности бактериофага Ars25- УГСХА при хранении.

Показатель	в течение 3 месяцев	в течение 6 месяцев	в течение 9 месяцев	в течение 12 месяцев
Литическая активность при хранении в условиях бытового холодильника 2-4 °С, БОЕ/мл	$0,2 \times 10^{10} \pm 0,1 \times 10^{10}$	$2,1 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9 \pm 0,2 \times 10^9$	$0,2 \times 10^9 \pm 0,1 \times 10^9$

Резюмируя вышеизложенное, рекомендовано для изготовления биопрепарата использовать бактериофаг Ars25- УГСХА и культуру *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658.

5.1.3 БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ *AEROMONAS HYDROPHILA*

(Материал подготовлен по результатам исследовательской работы И. Р. Насибуллина, Д. А. Васильева)

Насчитывающая более 100 лет история изучения бактерий рода *Aeromonas* активно продолжается и в наши дни. За последние 30 – 40 лет данный род пополнился новыми видами и благодаря молекулярно-генетическим исследованиям был выделен в отдельное семейство [7, 55]. Бактерии рода *Aeromonas* широко распространены в биосфере. Их активно выделяют из речной и морской воды, сточных вод, рыб, гидробионтов, продуктов питания, домашних животных, птиц, почвы, беспозвоночных, насекомых, растений, систем водоочистки и водоснабжения. Данный микроорганизм обладает широким набором факторов агрессии и инвазии, обеспечивающих ее патогенность и способен вызывать довольно опасные заболевания, как у человека, так и животных. В связи с возможностью передачи инфекций через воду и продукты, данный микроорганизм представляет серьезную угрозу для здоровья людей и является общепризнанным возбудителем кишечных инфекций, которые составляют от 1 до 10% ОКИ у взрослых и до 50% у детей. Активно размножаясь при низких температурах и вызывая порчу продуктов, бактерии *Aeromonas* являются возбудителями пищевой инфекции [96, 142].

Ключевым этапом нашей исследовательской работы стало выделение бактериофагов активных в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila* из объектов окружающей среды. Выделение бактериофагов проводили методом агаровых слоев по Грациа, на наличие бактериофага гомологичного бактерии

Aeromonas hydrophila. Нами было исследовано более 130 проб. Для выделения бактериофагов использовали сточные воды, воду открытых водоемов Ульяновской области. Было выделено 5 изолятов бактериофагов, активных в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila*.

Дальнейшим этапом наших исследований было изучение основных биологических свойств выделенных бактериофагов *Aeromonas hydrophila*.

Литическая активность бактериофага – это свойство фага вызывать лизис бактериальной культуры на плотной или жидкой питательной среде, выражается максимальным разведением фага, проявляющего литическое действие. Для определения литической активности выделенных и селекционированных бактериофагов бактерий *Aeromonas hydrophila* использовали методы Аппельмана и Грация [37].

Литическая активность изучаемых бактериофагов составила:

- по Аппельману от 10^{-5} до 10^{-8} ;
- по Грация от $5,0 \pm 0,1 \times 10^5$ до $2,0 \pm 0,1 \times 10^8$ (таблица 35).

Спектр литической активности бактериофагов, т.е. диапазон лизиса гомологичных к фагу бактерий является характерной чертой бактериофагов и его применяют для их идентификации [68]. Для определения диапазона литической активности фагов мы использовали метод нанесения фага на газон роста индикаторных культур [35]. В своих исследованиях мы использовали 1 референс-штамм и 14 полевых штаммов бактерий *Aeromonas hydrophila*. Положительный результат – появление прозрачной зоны лизиса на газоне тотального роста культуры (рисунок 29). Все изучаемые фаги показали различные спектры литиче-

Таблица 35. Литическая активность бактериофагов бактерий *Aeromonas hydrophila*.

Фаги	Литическая активность	
	по Аппельману (степень разведения)	по Грация (БОЕ/мл)
A.h. 43 - УГСХА	10^{-8}	$2,0 \pm 0,1 \times 10^8$
A.h. 51 - УГСХА	10^{-5}	$4,0 \pm 0,1 \times 10^6$
A.h. 54 - УГСХА	10^{-7}	$3,0 \pm 0,1 \times 10^7$
A.h. 60 - УГСХА	10^{-5}	$5,0 \pm 0,1 \times 10^5$
A.h. 72 - УГСХА	10^{-7}	$1,0 \pm 0,1 \times 10^8$

ской активности. Минимальный процент лизируемых культур *Aeromonas hydrophila* составил 13,3 %, максимальный – 86,6 % (таблица 36).

В нашем исследовании для изучения специфичности бактериофагов бактерий *Aeromonas hydrophila* мы использовали следующие гетерологичные и гомологичные культуры: *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Yersinia eutrocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Providencia rettgeri*.

В ходе исследования установили, что исследуемые фаги не лизировали представителей других видов и родов бактерий, и являются строго специфичными по отношению к бактериям *Aeromonas hydrophila* (рисунок 31).

Морфологию негативных колоний мы изучали на плотных питательных средах для дифференциации их на умеренные и вирулентные, согласно классификации И. П. Ревенко [62]. Для проведения исследования мы высевали бактериофаги методом агаровых слоев по Грациа.

Экспериментальным путем было установлено, что выделенные бактериофаги формировали схожие негативные колонии округлой формы с прозрачными центрами, без вторичного роста и зонами неполного лизиса, диаметром от 0,1 до 2 мм (таблица 37, рисунок 32). Использование высокой температуры для инактивации фаголизатов от бактерий имеет практическое и теоретическое значение и является важным технологическим

Таблица 36. Спектр литической активности бактериофагов бактерий *Aeromonas hydrophila*.

Бактериофаги	Количество испытанных штаммов <i>Aeromonas hydrophila</i>	Количество лизированных штаммов <i>Aeromonas hydrophila</i>	Процент лизированных штаммов <i>Aeromonas hydrophila</i> , %
A.h. 43 - УГСХА	15	13	86,6
A.h. 51 - УГСХА	15	4	26,6
A.h. 54 - УГСХА	15	8	53,3
A.h. 60 - УГСХА	15	5	33,3
A.h. 72 - УГСХА	15	2	13,3

параметром для отбора бактериофагов для индикации и идентификации бактерий.

В ходе исследований установили, что при температуре 60-62 °С фаголизаты значительно снизили свою активность. Повышение температуры выше 62 °С приводило к полной инаktivации фагов (таблица 38).

Хлороформ – как химический агент используется для инаktivации фаголизатов от бактерий, ввиду того, что бактериофаги более устойчивы к его воздействию, чем бактерии [55].

В результате опытов было установлено, что активность исследуемых фагов после воздействия хлороформа значительно снижалась (таблица 39). Эксперименты показали, что после проведения нескольких пассажей активность восстанавливалась до исходных параметров.

Таблица 37. Морфология негативных колоний фагов бактерий *Aeromonas hydrophila*.

Фаги	Морфология негативных колоний фагов
A.h. 43 - УГСХА	прозрачные, округлые, диаметр 1 - 2 мм
A.h. 51 - УГСХА	прозрачные, округлые, диаметр 0,5 - 1 мм
A.h. 54 - УГСХА	прозрачные, округлые, диаметр 0,2 - 0,5 мм
A.h. 60 - УГСХА	полупрозрачные, округлые, диаметр 0,1 - 0,3 мм
A.h. 72 - УГСХА	прозрачные, округлые, диаметр 0,5 - 0,7 мм

Таблица 38. Устойчивость к воздействию температуры фагов бактерий *Aeromonas hydrophila*.

Температурный режим	Активность штаммов изучаемых бактериофагов (БОЕ/мл)				
	A.h. 43 - УГСХА	A.h. 51 - УГСХА	A.h. 54 - УГСХА	A.h. 60 - УГСХА	A.h. 72 - УГСХА
Контроль	$2,0 \pm 0,1 \times 10^8$	$4,0 \pm 0,1 \times 10^6$	$3,0 \pm 0,1 \times 10^7$	$5,0 \pm 0,1 \times 10^5$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^8$
58-60	$2,0 \pm 0,1 \times 10^5$	$3,0 \pm 0,1 \times 10^3$	$2,0 \pm 0,1 \times 10^3$	$4,0 \pm 0,1 \times 10^2$	$3,0 \pm 0,1 \times 10^4$
60-62	$1,0 \pm 0,1 \times 10^2$	-	$1,0 \pm 0,1 \times 10^1$	-	$1,0 \pm 0,1 \times 10^2$
62-64	-	-	-	-	-
64-66	-	-	-	-	-

Таблица 39. Устойчивость к воздействию хлороформа бактериофагов бактерий *Aeromonas hydrophila*.

Время воздействия хлороформа, мин	Активность штаммов бактериофагов, обработанных хлороформом (БОЕ/мл)				
	A.h. 43 - УГСХА	A.h. 51 - УГСХА	A.h. 54 - УГСХА	A.h. 60 - УГСХА	A.h. 72 - УГСХА
15	$4,0 \pm 0,1 \times 10^5$	$5,0 \pm 0,1 \times 10^2$	$5,0 \pm 0,1 \times 10^3$	$7,0 \pm 0,1 \times 10^2$	$3,0 \pm 0,1 \times 10^4$
30	-	-	$1,0 \pm 0,1 \times 10^2$	-	$1,0 \pm 0,1 \times 10^2$
45	-	-	-	-	-
Контроль	$2,0 \pm 0,1 \times 10^8$	$4,0 \pm 0,1 \times 10^6$	$3,0 \pm 0,1 \times 10^7$	$5,0 \pm 0,1 \times 10^5$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^8$

Результаты исследований продемонстрировали, что хлороформ невозможно использовать в качестве химического фактора для инактивации фаголизатов бактерий *Aeromonas hydrophila*.

Для конструирования биопрепарата нами был отобран один фаг А.н. 43 – УГСХА, который характеризовался высоким титром литической активности.

Последующие эксперименты были направлены на изучение изменения литической активности укупоренного во флакон бактериофага А.н. 43 – УГСХА, хранящийся в условиях холодильника в течение 6 месяцев. Показатель литической активности фага при хранении определяется по классической методике определения активности методом агаровых слоев по Грациа. Опытным путем установлено, что в течение месяца показатель литической активности исследуемого бактериофага А.н. 43 – УГСХА оставался без изменений $2,0 \pm 0,1 \times 10^8$ корпускул в 1 мл фаголизата, соответственно. Через 3 месяца литическая активность снижалась и составила у фага А.н. 43 – УГСХА $4,0 \pm 0,1 \times 10^7$ корпускул в 1 мл фаголизата, через 6 месяцев - $2,0 \pm 0,1 \times 10^6$ корпускул в 1 мл фаголизата. Результаты исследований представлены в таблице 40.

Экспериментально установлено, что пассирование бактериофагов на исходном штамме бактерий *Aeromonas hydrophila* в течение 7 пассажей методом агаровых слоев восстанавливает литическую активность бактериофагов на 1 порядок.

Изменение литической активности фага А.н. 43 – УГСХА в диапазоне 10^6 - 10^8 не является критическим при конструировании биопрепарата и не отразится на его способности лизировать культуру *Aeromonas hydrophila* в пищевом сырье и продуктах питания при проведении исследований по их индикации и идентификации.

Изучение интенсивности адсорбции выделенных и селекционированных бактериофагов изучали при взаимодействии их с культурами клеток-хозяев общепринятым методом по Гольдфарбу (1961), который основан на исследовании количества корпускул неадсорбированного фага в смеси бактерия-фаг [26].

В качестве бактериальных клеток-хозяев использовали индикаторную культуру бактерий *Aeromonas hydrophila*. Адсорбцию фага А.н. 43 – УГСХА изучали на клетках *Aeromonas hydrophila* № 43. Время адсорбции для фага устанавливали в зависимости от процента максимальной адсорбции для конкретной смеси (фаг+клетка хозяина).

В результате проведенных исследований было установлено, что изучаемый бактериофаг имел показатель скорости адсорбции (таблица 41): фаг А.н. 43 – УГСХА при контакте с клетками *Aeromonas hydrophila* № 43 в течение 7 минут адсорбировался на них 87,2 %, константа скорости адсорбции составила $K = 5,8 \text{ см}^3/\text{мин}^{-1}$.

Для определения длительности латентного периода и урожайности фага использовали способ изучения одиночного цикла размножения фага без применения антифаговой сыворотки. В основу метода положено свойство эмбихина избирательно инактивировать различные фаги без повреждения бактерий [26]. В предварительном опыте параллельного титрования эмбихина на исследуемом фаге А.н. 43 – УГСХА и соответствующем бактериальном хозяине *Aeromonas hydrophila* № 43 устанавливается рабочая доза препарата, т.е. то его количество, которое

Таблица 40. Изменение литической активности фага А.н. 43 – УГСХА при хранении.

Бактериальная культура <i>Aeromonas hydrophila</i> / название фага	Временной интервал	Литическая активность (БОЕ/мл)
<i>Aeromonas hydrophila</i> №43/ А.н. 43 – УГСХА	момент укуповивания	$2,0 \pm 0,1 \times 10^8$
	месяц	$2,0 \pm 0,1 \times 10^8$
	3 месяца	$4,0 \pm 0,1 \times 10^7$
	6 месяцев	$2,0 \pm 0,1 \times 10^6$

Таблица 41. Результаты опыта по изучению скорости адсорбции селекционированных бактериофагов на клетках индикаторных культур.

Название фага и индикаторной культуры	Время адсорбции максимального количества фага (мин)	Количество фага до адсорбции (по показателю нега- тивных колоний) $M \pm m$	Количество неадсорбированного фага (по показателю бляшкообразующие единиц) $M \pm m$	Процент адсорбции (%)
A.h. 43 – УГСХА / <i>Aeromonas hydrophila</i> №43	5	180,0±15,2	81,1±1,0	55
	6		42,7±2,5	76,3
	7		23,0±4,3	87,2
	Константа скорости адсорбции К = 5,8 см ³ /мин ⁻¹			

Таблица 42. Определение рабочей дозы эмбихина на фаге A.h. 43 – УГСХА и индикаторной культуре *Aeromonas hydrophila* № 43.

Изучаемый показатель	Доза эмбихина в 0,9 мл физиологического раствора				
	50 у	25 у	10 у	5 у	контроль
Количество бактерий при высеве 0,1 мл из соответствующего разведения	340	304	408	484	441
Количество негативных колоний фага при высеве 0,1 мл из соответствующего разведения	0	0	4	167	1884

в 0,9 мл физиологического раствора способно за 5 минут при 37 °С инактивировать 90-95 % фага при исходной его концентрации $3\text{-}5 \times 10^7$ частиц в 1 мл. Опытным путем установлено, что препарат в рабочей дозе в аналогичных условиях не должен оказывать антибактериального действия при контакте с $4,4 \times 10^8$ бактерий (таблица 42). В экспериментах определено, что рабочая доза эмбихина была равна 5 γ, т.е. среднему из двух последних эффективных доз.

После определения рабочей дозы проводили основной опыт. Бактериальные культуры, выращенные в мясо-пептонном бульоне и находящиеся в логарифмической фазе роста, разводили мясо-петонным бульоном до концентрации бактерий $4,4 \times 10^8$ в 1 мл. К 0,9 мл такой культуры, предварительно адаптированной к 36 ± 1 °С, добавляли соответствующего бактериофага 0,1 мл, содержащего $4,4 \times 10^8$ БОЕ/мл, смесь инкубировали в термостате в течение 5 минут, а затем 0,1 мл переносили в 0,9 мл физиологического раствора с рабочей дозой эмбихина, предварительно прогретого в водяной бане при 36 ± 1 °С. После 5-минутной инкубации смеси при 36 ± 1 °С опыт продолжали по методу Эллиса и Дельбрюка.

Затем из этой пробирки брали 0.1 см³ жидкости, которую вносили к 9,9 см³ бульона. Из четвертой пробирки брали 0,1 см³ жидкости и вносили в 9,9 см³ бульона (пятая пробирка). Получая указанные разведения, мы стремились создать постоянную и наименьшую концентрацию частиц фага в четвертой пробирке и свести ее на нет в пятой с целью возможности подсчета колоний фага по окончании латентного периода. Из 4 и 5 пробирок приготовленными разведениями через каждые 1-2 минуты брали по 0,1 см³ жидкости и засевали в две бактериологические чашки по

Таблица 43. Изучение латентного периода и урожайности бактериофага А.н. 43 – УГСХА.

Время начала опыта	Число негативных колоний фага при высеве из 4-ой пробирки М±m	Число негативных колоний фага при высеве из 5-ой пробирки М±m
15	15,0±2,0	
17	16,0±2,0	
19	12,0±6,2	
20	13,3±7,5	
21	41,7±3,1	5,7±1,55
23	72,0±6,0	15,3±2,5
25	356,0±13,1	20,0±4,0
30	Лизис	12,0±1,0
35		27,3±7,6
40		28,7±3,1
45		20,7±10,8
60		15,0±2,6

методу агаровых слоев. Подсчет негативных колоний проводили после 16-18 часового инкубирования чашки при 36 ± 1 °С. Результаты исследований отражены в таблице 43.

Латентный период внутриклеточного развития фага А.н. 43 – УГСХА на клетках *Aeromonas hydrophila* № 43 равен 21-22 минуты. Среднее количество негативных колоний на чашках при высеве из 4-ой пробирки с 15 по 20 минуту опыта равно 14, а при высеве с 23 по 60 минуту из пятой пробирки – 19,86. Средняя урожайность бактериофага А.н. 43 – УГСХА равна $1986:14=141,9$ вирусных частиц на одну микробную клетку *Aeromonas hydrophila* № 43.

Полученные данные о показателях одиночного цикла развития бактериофага (высокая скорость адсорбции, короткий период внутриклеточного развития и относительно высокая урожайность) позволяют использовать изученный изолят для производства биопрепаратов.

Изучены основные биологические свойства фагов А.н. 43 – УГСХА, А.н. 51 – УГСХА, А.н. 54 – УГСХА, А.н. 60 – УГСХА, А.н. 72 - УГСХА (литическая активность: по Аппельману от 10^{-5} до 10^{-8} , по Грация от $5,0\pm 0,1\times 10^5$ до $2,0\pm 0,1\times 10^8$; спектр литической активности составляет: минимальный процент лизируемых культур *Aeromonas hydrophila* – 13,3 %, максималь-

ный – 86,6 %; специфичность действия бактериофагов; морфология корпускул фагов; воздействие температуры в диапазоне 58-66 °С не понижает литическую активность фагов, как и воздействие хлороформа в соотношении 1:10 во временном интервале 15-45 минут; определено, что в течение месяца показатели литической активности исследуемого бактериофага А.н. 43 – УГСХА остались без изменений, при хранении в условиях 2-4 °С в течение 6 месяцев не значительно снижал литическую активность). Латентный период внутриклеточного развития фага А.н. 43 – УГСХА на клетках *Aeromonas hydrophila* № 43 равен 21-22 минуты. Среднее количество негативных колоний на чашках при высеве из 4-ой пробирки с 15 по 20 минуту опыта равно 14, а при высеве с 23 по 60 минуту из пятой пробирки – 19,86. Средняя урожайность бактериофага А.н. 43 – УГСХА равна $1986:14=141,9$ вирусных частиц на одну микробную клетку *Aeromonas hydrophila* № 43.

Изученные свойства данных фагов позволяют систематизировать биологические особенности каждого из выделенных клонов вирулентных бактериофагов и произвести отбор для конструирования в перспективе биопрепарата для обработки бактериофагами пищевого сырья.

5.1.4. БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ РОДА *LISTERIA*

(Материал подготовлен по результатам исследовательской работы Е. В. Сульдина, Д. А. Васильева)

Характеристика фагов бактерий рода *Listeria*.

Морфологию негативных колоний бактериофагов изучали двухслойным методом Грациа (А. Gratia, 1936) с использованием 1,5%-ного агара и мясопептонного бульона с добавлением 1 % глюкозы. Для этого в пробирки, содержащие 2,5 мл расплавленного и остуженного до 45 °С мясопептонного агара добавляли по 1 мл фаголизата и 0,1 мл суточной культуры *L. monocytogenes*,

в концентрации 1×10^9 мк/мл. После тщательного перемешивания содержимое пробирок распределяли равномерным слоем по поверхности подсушенного 1,5 %-ного агара. Учет результатов проводили через 24 часа инкубации при температуре 37 °С. Негативные колонии, образуемые изучаемыми бактериофагами, имели схожую морфологию: колонии округлой формы с ровными краями, в диаметре от 1 до 2 мм, прозрачные, без зоны неполного лизиса (рисунки 32–33).

Литическую активность бактериофагов оценивали по их способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких и на плотных питательных средах и выражали максимальным разведением, в котором испытуемый фаг проявил свое литическое действие. Литическую активность листериозных бактериофагов определяли методами Аппельмана (метод серийных разведений в жидких питательных средах) и Грация (метод агаровых слоев на плотных питательных средах).

Определение литической активности бактериофагов на плотной питательной среде (по Грация) основано на внесении последовательных разведений исследуемого бактериофага в соответствующую культуру бактерий и посеве смеси на плотную питательную среду с целью получения негативных колоний фага. Проведенные исследования показали, что изучаемые бактериофаги обладали литической активностью в диапазоне от 10^{-6} до 10^{-7} , по методу Аппельмана и от $1 \pm 0,1 \times 10^6$ до $2 \pm 0,1 \times 10^7$ фаговых корпускул в 1 мл по методу Грация (таблица 44).

Спектр литической активности является характерной особенностью штаммов фага. Определение проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры.

Таблица 44. Литическая активность листериозных бактериофагов.

Бактериофаги	Литическая активность	
	по методу Аппельмана	по методу Грация
L.m. 1	10^{-7}	$2 \pm 0,1 \times 10^7$
L.m. 2	10^{-6}	$1 \pm 0,1 \times 10^6$
L.m. 12	10^{-6}	$2 \pm 0,1 \times 10^6$

Спектр литической активности находится в пределах от 37,5 % до 62,5 % из числа исследуемых штаммов (таблица 45).

Специфичность – одно из основных свойств бактериофага, определяющее возможность его применения для идентификации культур возбудителя. Специфичность исследуемых фагов изучали методом нанесения фага на газон гетерологичных бактериальных культур.

В результате изучения бактериофагов L.m 1 и L.m 2 по отношению к представителям других родов (*Erysipelothrix*, *Jonesia*, *Staphylococcus*) и видов рода *Listeria* (*L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L.murrayi*, *L.grayi*, *L.ivanovii*) установлено, что данные фаги лизировали только бактерии вида *L.monocytogenes*. Показатели специфичности бактериофагов *Listeria* представлены в таблице 46.

Таблица 45. Спектр литической активности фагов листерий.

№ п/п	№ штамма	Листерийные бактериофаги		
		Lm 1	Lm 2	Lm 12
	<i>L.monocytogenes</i> № 766	–	+	–
	<i>L.monocytogenes</i> № 634	–	–	+
	<i>L.monocytogenes</i> № 10522	+	+	+
	<i>L.monocytogenes</i> № 11944	+	+	–
	<i>L.monocytogenes</i> № 139	+	–	–
	<i>L.monocytogenes</i> № 1197	–	–	+
	<i>L.monocytogenes</i> № 1213	–	–	–
	<i>L.monocytogenes</i> № 9-72	+	–	–
	<i>L.monocytogenes</i> № 9-127	–	+	+
	<i>L.monocytogenes</i> № 9-130	+	–	–
	<i>L.monocytogenes</i> № 129	+	+	–
	<i>L.monocytogenes</i> № 17/57	+	–	+
	<i>L.monocytogenes</i> № K-1	+	–	–
	<i>L.monocytogenes</i> № 56	+	–	+
	<i>L.monocytogenes</i> № 1221	–	+	+
	<i>L.monocytogenes</i> № 4в	+	–	–
Процент лизируемых культур:		62,5	37,5	43,7

Примечание: «+» - лизис,
«–» - отсутствие лизиса.

Таблица 46. Специфичность листериозных бактериофагов.

Род (вид) бактерий	Количество исследуемых штаммов	Бактериофаги		
		L.m 1	L. m 2	L. m 12
		Процент лизируемых культур		
<i>L.monocytogenes</i>	16	37,5	62,5	43,7
<i>L.innocua</i>	3	–	–	–
<i>L.ivanovii</i>	2	–	–	–
<i>L.grayi</i>	1	–	–	–
<i>L.murrayi</i>	1	–	–	–
<i>Erysipelothrix insidiosa</i>	1	–	–	–
<i>Jonesia dentrificans</i>	2	–	–	–
<i>Staphylococcus spp</i>	4	–	–	–

Примечание: «–» - отсутствие лизиса.

Латентный период внутриклеточного развития фага L.m. 1 на клетках *L.monocytogenes* № 139 равен 22-23 минуты. Среднее количество негативных колоний на чашках при высеве из 4-ой пробирки с 15 по 21 минуту опыта равно 15, а при высеве с 24 по 60 минуту из пятой пробирки – 20,16. Средняя урожайность бактериофага L.m. 1 равна $2016:15=134,4$ вирусных частиц на одну микробную клетку *L.monocytogenes* № 139.

Выделенные бактериофаги обладают высокой литической активностью в отношении *L.monocytogenes* в диапазоне от 10^{-6} до 10^{-7} , по методу Аппельмана и от $1\pm 0,1 \times 10^6$ до $2\pm 0,1 \times 10^7$ БОЕ/мл по методу Грациа. Спектр литической активности фагов находится в пределах от 37,5 % до 62,5 % из числа исследуемых штаммов, что свидетельствует о выраженной типоспецифичности выделенных бактериофагов. Диапазон литического действия фагов L.m 1, L.m 2 и L.m 12 представлен в таблице 29. С помощью данного набора бактериофагов мы типировали до 93 % исследуемых культур, что позволяет систематизировать биологические особенности каждого из выделенных клонов вирулентных бактериофагов и произвести отбор для конструирования в перспективе бмопрепарата д обработки бактериофагами пищевого сырья.

5.1.5. БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

(Материал подготовлен по результатам исследовательской работы Б. М. Коритняка, С. Н. Золотухина).

Род *Yersinia* включает обширную группу грамотрицательных факультативно анаэробных микроорганизмов, относящихся к семейству *Enterobacteriaceae*. Среди 16 видов, включенных в род *Yersinia*, только три отнесены к патогенным для человека и животных - возбудитель чумы *Y. pestis*, возбудитель псевдотуберкулеза *Y. pseudotuberculosis* и отдельные представители *Y. enterocolitica*, являющиеся возбудителями кишечного иерсиниоза. Вид *Y. enterocolitica* широко распространен в природе. Представители вида присутствуют в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) различных животных, в воде, почве, а также могут контаминировать сырые овощи, молоко и другие продукты, хранящиеся в условиях холодильника [30,40-42].

Изучение бактериофагов *Y. enterocolitica* и селекция клонов

Первым этапом при работе с культурами является проверка их на лизогенность, поэтому все штаммы, используемые нами как индикаторные, исследовались на возможность выделения бактериофагов из культур в присутствии индуцирующего агента и без него.

В первой серии опытов использовали методику, предложенную С. Лурия, Д. Дарнеллом (1970), для выделения бактериофагов из бактерий вида *Y. enterocolitica* без воздействия на них индуцирующего фактора. В процессе работы свободного фага из культур бактерий вида *Y. enterocolitica* выявлено не было.

Во второй серии опытов на исследуемые культуры, воздействовали индуцирующим фактором. В качестве индуцирующего агента использовали ультрафиолетовые лучи, источником которых служила ртутно-кварцевая лампа, дающая не менее 90 % излучаемой энергии в виде УФ-лучей с длиной волны 254 нм. Облученные взвеси культур смешивали с культурами, культиви-

ровали в течение суток, после чего фильтровали через бактериальные фильтры. Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *Y. enterocolitica* методом агаровых слоев предложенного А. Грация (Гольдфарб, 1961). В наших опытах установлено, что воздействию индуцирующего фактора на бактерии вида *Y. enterocolitica* не приводили к появлению зон лизиса.

Анализируя полученные данные, можно утверждать, что мы не обнаружили явления выхода свободного фага и перехода профага в свободный фаг у имеющихся штаммов бактерий по данным схемам.

Дальнейшие исследования были посвящены выделению бактериофагов *Y. enterocolitica* из объектов внешней среды.

Жидкие пробы (бытовые сточные воды, воду открытых водоемов) фильтровали через бумажный фильтр для освобождения от механических примесей в случае необходимости. В 1,0 литровую колбу, содержащую стерильный, МПБ в количестве 0,5 литра, вносили 50,0 мл фильтрата либо навеску 50,0 г, в случаях исследования фекалий животных и проб почвы с выгульных площадок для животных и по 1,0 мл, индикаторных штаммов бактерий. Колбу инкубировали в термостате в течении 24 часов при 37 °С. После этого содержимое колбы разливали в пробирки, центрифугировали при 3000 об/мин в течении 30 минут, шприцом отбирали надосадочную жидкость и фильтровали с помощью бактериального фильтра в стерильную пробирку. Фильтраты исследовали по методу Отто. Чашки помещали в термостат на 18-20 часов при 37 °С. Наличие негативных колоний или зон лизиса на газоне роста индикаторной культуры свидетельствует о присутствии в исследуемом материале бактериофага (рисунок 33).

Селекция полученных бактериофагов

Селекцию выделенных бактериофагов и повышение их литической активности проводили с помощью пассивирования фага на индикаторной культуре с периодической отливкой типичных негативных колоний по методике, описанной С. Н. Золотухиным [34].

В результате проведенных исследований удалось выделить 5 изолятов бактериофагов, которые отличались между собой по морфологии негативных колоний. Результаты представлены в таблице 47.

После серии пассажей, мы проверили литическую активность выделенных бактериофагов. Результаты представлены в таблице 48.

На основании полученных данных представленных в таблицах 1 и 2, для дальнейших исследований нами был отобран фаг Ye3-f2 с высокой литической активностью и дающий прозрачные негативные колонии без зоны неполного лизиса диаметром 1,0-1,5.

Морфологию негативных колоний фагов изучали, при посевах фагов методом агаровых слоев. В пробирку с расплавленным 0,7 % МПА вносили 1мл фага в разведении 10^9 и 0,5 мл индикаторной суточной бульонной культуры. Содержимое пробирки тщательно перемешивали и выливали на поверхность 1,5 % МПА. После застывания агара чашки помещали в термостат. Учет производился спустя сутки после инкубации при температуре 37 °С. Негативные колонии, образуемые изучаемым бактериофагом Ye3-f2 прозрачные без зоны неполного лизиса диаметром 1,0-1,5 (рисунок 35–37).

Литическая активность бактериофага оценивается по его способности вызывать лизис бактериальной культуры в жидких или на плотных питательных средах, и выражает это тем максимальным разведением, в котором испытуемый бактериофаг проявил своё литическое действие.

Культуры бактерий вида *Y. enterocolitica* для определения литической активности бактериофагов, выращивали на стандартном мясопептонном бульоне в течение 18-20 часов. Литическую активность селекционированных бактериофагов определяли по методу Аппельмана и Грация. Титр фага Ye3-f2 по методу Аппельмана и литическая активность на плотной питательной среде по Грация представлены в таблице 49.

Спектр литической активности является характерной особенностью штаммов фага, и его используют для их идентификации. Определение спектра литической активности проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры.

Для изучения спектра литической активности селекционированного фага мы использовали 34 референс и полевых штаммов иерсиний. На поверхность МПА в чашках Петри пипеткой наносили 1 мл бульонной культуры исследуемых микроорганизмов. Затем равномерно распределяли по поверхности среды. Чашки ставили в термостат для подсушивания на 15-20 минут. На поверхность засеянной среды пипеткой наносили 1 каплю фага и наклоняли, чтобы капли стекли, а затем инкубировали при температуре 37 °С, оценку результатов проводили через 18-20 часов.

Бактериофаг Ye3-f2, обладает широким спектром действия из 34 имеющихся у нас штаммов лизировал 29 (85 %). Результаты представлены в таблице 50.

Таблица 47. Описание морфологии негативных колоний фагов *Y. enterocolitica*.

№ фага	Колонии фага	Индикаторная культура
F1	Колонии диаметром 0,7-0,8, с прозрачным центром и с широкой зоной неполного лизиса	Ye-2
F2	Колонии диаметром 1,0-1,5, прозрачные, без зоны неполного лизиса	Ye-3
F3	Колонии диаметром 0,5-0,7, прозрачные, с узкой зоной неполного лизиса	Ye-2
F4	Колонии диаметром 0,2-0,3, прозрачные, без зоны неполного лизиса	Ye-1
F5	Колонии диаметром 0,9-1,0 с прозрачным центром диаметром и узкой зоной неполного лизиса	Ye-2

Таблица 48. Литическая активность выделенных бактериофагов. *Y. enterocolitica*.

№п/п	Фаги	По Грациа	По Апельману
	Ye2-f1	$2,1 \times 10^3$	10^{-3}
	Ye3-f2	$2,4 \times 10^6$	10^{-5}
	Ye2-f3	$1,7 \times 10^4$	10^{-4}
	Ye1-f4	$2,8 \times 10^3$	10^{-3}
	Ye2-f5	$1,9 \times 10^5$	10^{-5}

Таблица 49. Литическая активность фага Ye3-f2.

Фаг	Литическая активность по методу Грациа	Литическая активность по методу Аппельмана
Ye3-f2	$1,5 \times 10^{10}$	10^{-9}

Специфичность действия

Видовая специфичность фагов используется в практике для дифференциации бактерий. Эта способность фагов определяется, прежде всего, сродством их к рецепторам лизируемых бактерий.

Определение видовой специфичности изучаемого бактериофага проводили на агаровых средах путём нанесения фага на газон гетерологичных культур. На поверхность МПА в чашках Петри пипеткой наносили 1 мл бульонной культуры исследуемых микроорганизмов. Затем равномерно распределяли по поверхности среды. Чашки ставили в термостат для подсушивания на 15-20 минут. На поверхность засеянной среды пипеткой наносили каплю фага и наклоняли, чтобы капля стекла, а затем инкубировали при температуре 37 °С, оценку результатов проводили через 18-20 часов.

В результате изучения специфичности бактериофага бактерий *Y. enterocolitica* Ye3-f2 по отношению к представителям других семейств, родов и видов использовали: *Proteus vulgaris* 6 штаммов, *Klebsiella oxytoca* 2 штамма, *Staphylococcus aureus* 4 штамма, *Pseudomonas aureginosa* 4 штамма, *Y. pseudotuberculosis* 4 штамма, *Escherichia coli* 12 штаммов, *Enterobacter cloacae* 3 штамма, *Rhodococcus equi* 1 штамма, *Listeria monocytogenes* 20 штаммов.

Таблица 50. Спектр литической активности и специфичность бактериофага Ye3-f2.

№	Вид бактерий	Испытанные штаммы	Чувствительные к фагу	% лизируемых штаммов
1	<i>Y. enterocolitica</i>	34	29	85
2	<i>Escherichia coli</i>	12	-	0
3	<i>Proteus vulgaris</i>	6	-	0
4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	-	0
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	4	-	0
6	<i>Pseudomonas aureginosa</i>	4	-	0
7	<i>Enterobacter cloacae</i>	3	-	0
8	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	4	-	0
9	<i>Rhodococcus equi</i>	1	-	0
10	<i>Listeria monocytogenes</i>	20	-	0

Примечание: «+» - лизис бактериальной культуры;
«-» - отсутствие лизиса бактериальной культуры.

Установлено, что бактериофаг Ye3-f2 не лизировал ни одну из испытуемых культур других видов бактерий. На основании полученных результатов можно сделать вывод, о том, что селекционированный фаг является специфичным по отношению к бактериям вида и не активен к представителям других видов бактерий. Результаты представлены в таблице 50.

Поисследовав более 30 проб из объектов окружающей среды, нами было выделено и селекционировано 5 бактериофагов бактерий *Y. enterocolitica*. На основании полученных данных по литической активности и морфологии негативных колоний, мы отобрали бактериофаг Ye3-f2 с высокой начальной литической активностью и дающий прозрачные негативные колонии без зоны неполного лизиса диаметром 1,0-1,5. Проверив биологические свойства фага Ye3-f2 установили, что литическая активность его составляет $1,5 \times 10^{10}$ по Грация и 10^9 по Аппельману, спектр литического действия равен 85% (фаг лизировал 29 из 34 культур) и бактериофаг обладает выраженной видоспецифичностью, что было выявлено нами с помощью 56 штаммов гетерологичных культур.

Латентный период внутриклеточного развития фага Ye3-f2 на клетках *Y. enterocolitica* 8 равен 22-23 минуты. Среднее количество негативных колоний на чашках при высеве из 4-ой пробирки с 15 по 21 минуту опыта равно 16, а при высеве с 24 по 60 минуту из пятой пробирки – 19,98. Средняя урожайность бактериофага *L.m.* $1=1998:16=124,9$ вирусных частиц на одну микробную клетку *Y. enterocolitica* 8.

Таким образом, бактериофаг Ye3-f2 обладает всеми свойствами необходимыми для использования его в составе фагового биопрепарата для обработки бактериофагами пищевого сырья и готовой продукции.

5.1.6 БАКТЕРИОФАГИ БАКТЕРИЙ *ENTEROBACTER*

(Материал подготовлен по результатам исследовательской работы Е. Н. Пожарниковой, Е. В. Сульдиной).

Энтеробактер (*Enterobacter*) - род грамотрицательных палочкообразных перитрихальных спорообразующих бактерий, факультативных анаэробов. Энтеробактеры входят в состав нормальной микрофлоры кишечника человека, а также обитает в кишечнике некоторых видов животных, встречается в почве, воде, пищевых продуктах [30, 59 67].

Род *Enterobacter* входит в семейство энтеробактерии (*Enterobacteriaceae*), порядок энтеробактерии (*Enterobacteriales*), класс гамма-протеобактерии (γ *proteobacteria*), тип протеобактерии (*Proteobacteria*), царство бактерии.

Род энтеробактер включает следующие виды: *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter dissolvens*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii*.

В настоящее время ранее входящий в род энтеробактер вид *Enterobacter agglomerans* переименован в *Pantoea agglomerans* и отнесён к вновь образованному роду *Pantoea*. *Enterobacter aerogenes* перенесён в род *Klebsiella*. *Enterobacter amnigenus* переименован в *Lelliottia amnigena*, *Enterobacter cowanii* – в *Kosakonia cowanii*, *Enterobacter gergoviae* – в *Pluralibacter gergoviae*, *Enterobacter intermedius* – в *Kluyvera intermedia*, *Enterobacter nimipressuralis* – в *Lelliottia nimipressuralis*, *Enterobacter pyrinus* – в *Pluralibacter pyrinus*, *Enterobacter sakazakii* – в *Cronobacter sakazakii* [90].

Первым этапом при работе с индикаторными культурами является проверка их на наличие профага. В связи с этим мы использовали методики для обнаружения выхода свободного фага с и без воздействия индуцирующего фактора. Полученные нами результаты свидетельствуют, что культуры *Enterobacter* в перекрестных опытах по выделению свободного фагов без воздей-

ствия на них индуцирующего фактора не проявили лизогенных свойств. Во второй серии опытов на культуры *Enterobacter* воздействовали индуцирующим фактором (Лурия, Дарнелл, 1970). В качестве индуцирующего агента использовали ультрафиолетовые лучи, источником которых служила ртутно-кварцевая лампа, дающая не менее 90 % излучаемой энергии в виде УФ-лучей с длиной волны 254 нм. Облученные взвеси культур смешивали с индикаторными культурами, выдерживали в термомтате в течение суток при 37 °С, после чего фильтровали через бактериальные фильтры. Полученный фильтрат исследовали на наличие фага на имеющихся культурах *Enterobacter* методом Отто. В наших опытах установлено, что воздействию индуцирующего фактора на бактерии рода *Enterobacter* не приводили к появлению зон лизиса. Анализируя полученные данные, можно утверждать, что мы не обнаружили явления лизогении у исследуемых культур с помощью вышеуказанных методов.

Дальнейшие исследования были направлены на выделение бактериофагов *Enterobacter* из объектов внешней среды. В результате проведенных опытов, нами было выделены и селекционированы 7 штаммов бактериофагов бактерий рода *Enterobacter*.

Для определения морфологии негативных колоний мы высевали фаг в степени 10^{-7} - 10^{-9} по Аппельману на чашки методом агаровых слоев. Для формирования газона на поверхности агара использовали индикаторный штамм *Enterobacter*, на которые фаг был выделен. Посевы культивировали в термостате при температуре 37 °С. Изучение морфологии негативных колоний проводили через 24 часа (рисунок 38-39).

Негативные колонии, образуемые бактериофагами, по наличию зоны неполного лизиса, вторичного роста и величине колоний мы разделили на два типа. К первому относятся негативные колонии округлые, прозрачные без зоны неполного лизиса, диаметром до 1 мм. Негативные колонии первого типа формируют фаги Е 1, Е 3, Е 6. Колонии второго типа круглые прозрачные без зоны неполного лизиса, имеют диаметр до 3-4 мм. Колонии второго типа образуются фагами Е 2, Е 4, Е 5, Е 7.

Литическая активность бактериофага оценивают по его способности вызывать лизис бактериальной культуры и выражают это тем максимальным разведением, в котором испытуемый фаг проявил свое литическое действие. Более точным методом оценки активности бактериофага является определение количества активных корпускул фага в единице объема. Результаты исследования литической активности выделенных фагов представлены в таблице 34. Активность исследуемых бактериофагов варьировала от $1,2 \times 10^7$ до $1,8 \times 10^{10}$ БОЕ/мл.

К основным биологическим свойствам бактериофага, имеющим важное практическое и теоретическое значение, относится диапазон литической активности – это спектр лизиса гомологичных фагу бактерий по серологической группе. Определение спектра литической активности проводили методом нанесения капель бактериофага на газон изучаемой культуры (рисунок 40).

Для этого на поверхность МПА в чашках Петри наносили 0,5 мл 18-20-ти часовой культуры. Бактериальную культуру раскатывали равномерно по поверхности среды для получения газона. Для подсушивания ставили в термостат на 20 минут. На дне чашек карандашом отмечали одинаковые сектора (по 2 сектора на каждой чашке). На поверхность подсушенной среды наносили капли исследуемых бактериофагов и наклоняли чашки, чтобы капли стекли. Каждый сектор используется для одного фага. В качестве контроля наносили каплю стерильного МПБ. Результаты представлены в таблице 51 и на рисунке 38.

Исследования показали, что изучаемые фаги характеризуются различным спектром литической активности. Бактериофаг Е1 и Е3 являются видоспецифичными. Наибольшим диапазоном лизиса изучаемых культур обладают бактериофаги Е4 и Е7, который составляет более 75 %. А суммарный лизис двух этих бактериофагов составляет более 95 % (таблица 52).

По сочетанию показателей проведенных тестов нами для дальнейших исследований отобрано 2 бактериофага Е4 и Е7. В сумме они оказывают литическое действие на более 95 % имеющихся у нас культур и обладают высокой литической активностью.

Необходимым условием для применения фагов в диагностических целях является отсутствие литического действия в отношении гетерологичных бактерий (специфичность). В качестве гетерологичных культур использовали бактерии родов *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Proteus*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Rhodococcus*, *Listeria*.

Определение специфичности исследуемых бактериофагов проводили нанесением капли на газон культуры. Установлено, что данные фаги не вызывали лизис ни одной из испытываемых культур других родов бактерий.

На основании полученных результатов (таблица 53) можно сделать вывод, что фаги E4 и E7 являются специфичными по отношению к бактериям рода *Enterobacter* и не активны к представителям других родов бактерий.

Поисследовав более 50 проб из объектов окружающей среды, нами было выделено и селекционировано 7 бактериофагов бактерий *Enterobacter*. Негативные колонии, образуемые бактериофагами, по наличию зоны неполного лизиса, вторичного роста и

Таблица 51. Литическая активность бактериофагов *Enterobacter*.

№ пп	Фаг	Индикаторная культура	Активность по Аппельману	Активность по Грациа, корпускул в 1 мл
1	E1	<i>E. cloacae</i> 1	10^{-8}	$7,4 \times 10^8$
2	E2	<i>E. dissolvens</i> 3	10^{-6}	$1,2 \times 10^7$
3	E3	<i>E. dissolvens</i> 3	10^{-7}	$1,6 \times 10^8$
4	E4	<i>E. dissolvens</i> 1	10^{-9}	3×10^9
5	E5	<i>E. dissolvens</i> 3	10^{-7}	3×10^8
6	E6	<i>E. dissolvens</i> 3	10^{-9}	$2,8 \times 10^9$
7	E7	<i>E. cloacae</i> 1	10^{-10}	$1,8 \times 10^{10}$

Таблица 52. Результаты исследования спектра литической активности выделенных бактериофагов. *Enterobacter*.

Фаг	Испытанные штаммы <i>Enterobacter</i>	Чувствительные к фагу	% лизируемых штаммов
E1	21	8	38
E2	21	11	52
E3	21	4	19
E4	21	16	76
E5	21	13	62
E6	21	12	57
E7	21	17	81

величине колоний мы разделили на два типа. К первому относятся негативные колонии округлые, прозрачные без зоны неполного лизиса, диаметром до 1 мм. Негативные колонии первого типа формируют фаги Е1, Е3, Е6. Колонии второго типа круглые прозрачные без зоны неполного лизиса, имеют диаметр до 3-4 мм. Колонии второго типа образуются фагами Е2, Е4, Е5, Е7.

На основании полученных данных по литической активности и их спектру действия, мы отобрали бактериофаги Е4 и Е7 с высокой литической активностью равной 10^{-9} по Аппельману и 3×10^9 БОЕ/мл по Грация для Е4 и 10^{-10} по Аппельману и $1,8 \times 10^{10}$ БОЕ/мл по Грация для Е7. Спектр литического действия обоих фагов составляет более 75%, а суммарный лизис культур достигает 95 %. Бактериофаги Е4 и Е7 обладают специфичностью, по отношению к бактериям других родов, что было выявлено нами с помощью 90 штаммов гетерологичных культур.

Вирусные частицы фага Е7 имеют следующий размеры: длина отростка - 115 нм, диаметр головки - 74 нм, высота - 80 нм, отношение высоты головки к ее диаметру равно 1,05. Чехол отростка на всем протяжении имеет изогнутую в виде кольца форму (рисунок 41).

Вирусные частицы фага Е4 имеют следующий рамеры: длина отростка - 126 нм, диаметр головки - 91 нм, отношение высоты головки к ее диаметру равно 1, 15, что говорит о растянуто-

Таблица 53. Специфичность бактериофагов Е4 и Е7.

№ пп	Род	Количество исследуемых штаммов	Фаг Е4	Фаг Е7	Контроль (МПБ)
1	Klebsiella	2	-	-	-
2	Citrobacter	6	-	-	-
3	Escherihia	12	-	-	-
4	Proteus	6	-	-	-
5	Yersinia	34	-	-	-
6	Salmonella	2	-	-	-
7	Listeria	19	-	-	-
8	Pseudomonas	4	-	-	-
9	Rhodococcus	1	-	-	-
10	Staphylococcus	4	-	-	-
11	Enterobacter	21	+	+	-

Примечание: «+» - лизис культуры;

«-» - отсутствие лизиса.

сти многогранника. Чехол отростка на всем протяжении прямой имеет цилиндрическую форму (рисунок 42).

В соответствии с морфологическими параметрами, бактериофаг En7 согласно Международной классификации и номенклатуре вирусов относятся к семейству *Sihpoviridae*, по классификации А. С. Тихоненко (1968) - к IV морфологической группе: «Фаги с длинным несокращающимся отростком», а фаг Е4 к семейству *Myoviridia* и V морфологической группе: «Фаги с отростком сложного строения, чехол которого способен к сокращению» [7].

Латентный период внутриклеточного развития фага Е4 на клетках *E. dissolvens* 1 равен 22-23 минуты. Среднее количество негативных колоний на чашках при высеве из 4-ой пробирки с 15 по 21 минуту опыта равно 14, а при высеве с 24 по 60 минуту из пятой пробирки – 18,78. Средняя урожайность бактериофага L.m. $1=1878:14=134,1$ вирусных частиц на одну микробную клетку *E. dissolvens* 1. Таким образом, бактериофаги Е4 и Е7 обладают всеми свойствами необходимыми для использования их в перспективе в составе биопрепарата для обработки пищевого сырья и готовой продукции.

5.1.7 БАКТЕРИОФАГИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

(Материал подготовлен по результатам исследовательской работы А. Г. Шестакова, Д. А. Васильева).

Ключевым этапом наших исследований стало выделение бактериофагов *P. aeruginosa* из объектов внешней среды (таблица 54). Материалом для выделения являлись сточные воды и реки Ульяновской облсти. Всего исследовано 129 проб.

Морфологию негативных колоний бактериофагов изучали с помощью метода агаровых слоев по Грациа. Бактериофаг УГ-СХА - Р.а. № 1 и бактериофаг УГСХА - Р.а. № 4, имели диа-

метр 3-4 мм с четким прозрачным центром и мутным ореолом по периферии (рисунок 43). Бактериофаги УГСХА - Р.а. № 18, УГСХА - Р.а. № 35, УГСХА - Р.а. № 44 имели диаметр негативных колоний 2 мм и были прозрачны. Бактериофаги УГСХА - Р.а. № 9 и УГСХА- Р.а. № 52 имели диаметр колоний 4 мм и характеризовались наличием прозрачного центра с мутной периферией.

Дальнейшим этапом изучения биологических свойств выделенных бактериофагов было определение их литической активности. Изучили литическую активность 7 выделенных бактериофагов *P. aeruginosa* методами предложенными Аппельманом и Грациа (таблица 55).

Определили количество фаговых корпускул в 1 мл, для каждого выделенного бактериофага. По результатам полученных данных, нами было решено в дальнейших исследованиях использовать наиболее активные бактериофаги УГСХА - Р.а. № 1 и УГСХА - Р.а. № 4, характеризовавшиеся максимальным ко-

Таблица 54. Объекты выделения бактериофагов *P. aeruginosa*.

№ п/п	Название фага	Источник выделения
1	УГСХА- Р.а.№1	Канализация жилого дома в Засвияжском районе города Ульяновска
2	УГСХА- Р.а.№4	Сточные воды стоков канализации в Засвияжском районе города Ульяновска
3	УГСХА- Р.а.№9	Уличные лужи в Чердаклинском районе Ульяновской области
4	УГСХА- Р.а.№18	Стоки свиноводческого подворья села Тагай в Ульяновский области
5	УГСХА- Р.а.№35	Сточные воды стоков канализации в северном районе города Ульяновска
6	УГСХА- Р.а.№44	р. Волга г. Ульяновск
7	УГСХА- Р.а.№52	р. Свияга г. Ульяновск

Таблица 55. Литическая активность фагов *P. aeruginosa* по Аппельману и Грациа.

№ п/п	Название фага	Литическая активность Аппельману	Литическая активность по Грациа
1	УГСХА- Р.а.№1	10^{-8}	2×10^{10}
2	УГСХА- Р.а.№4	10^{-10}	4×10^{10}
3	УГСХА- Р.а.№9	10^{-8}	5×10^9
4	УГСХА- Р.а.№18	10^{-8}	3×10^9
5	УГСХА- Р.а.№35	10^{-7}	2×10^7
6	УГСХА- Р.а.№44	10^{-8}	8×10^8
7	УГСХА- Р.а.№52	10^{-7}	5×10^8

личеством активных корпускул фага в 1мл. Титр селекционированных бактериофагов УГСХА- Р.а. № 1 и урсХА- Р.а. № 4 по Грация: 2×10^{10} , 4×10^{10} соответственно, фаговых корпускул в 1 мл. Титр бактериофагов УГСХА - Р.а. № 1 и УГСХА- Р.а. № 4 по Апельману: 10^{-8} , 10^{-10} соответственно. Определение спектра литической активности проводили методом нанесения фага на газон бактериальных культур (рисунок 44).

Установлено, что наиболее широким спектром литической активности по отношению к исследуемым культурам обладал штамм фага УГСХА- Р.а. № 4, который лизировал 37 из 39 штаммов *P. aeruginosa* (94.8 %). Фаг урсХА - Р.а. № 1 лизировал 30 из имеющихся у нас 39 штаммов *P. aeruginosa* (76.9 %). Поэтому фаг УГСХА-Р.а. № 4 был выбран для конструирования диагностического препарата. Результаты определения специфичности бактериофага УГСХА-Р.а. № 4, показали, что он строго специфичен по отношению к *P. aeruginosa* и не лизировал другие виды и роды бактерий (таблица 56). Определение чувствительности бактериофага УГСХА-Р.а. № 4 проводили путем обработки фа-

Таблица 56. Специфичность, выделенных бактериофагов *P. aeruginosa*

№	Вид бактерий	УГСХА-Р.а.№1	УГСХА- Р.а.№4
1	<i>Escherichia coli</i>	-	-
2	<i>Proteus mirabilis</i>	-	-
3	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-
4	<i>Morganella morganii</i>	-	-
5	<i>Salmonella spp.</i>	-	-
6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-
7	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
8	<i>Pseudomonas putida</i>	-	-
9	<i>Bacillus cereus</i>	-	-
10	<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-
11	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-
12	<i>Streptococcus spp.</i>	-	-
13	<i>Yersinia enterocolitica</i>	-	-
14	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-
15	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-	-
16	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-

Примечание: «-» - отсутствие лизиса.

говой суспензии хлороформом в соотношении 1:10 при постоянном встряхивании. Бактериофаг УГСХА - Р.а. № 4 проявил выраженную устойчивость к воздействию хлороформа в течение 60 минут. В рамках намеченного исследования также изучили устойчивость бактериофага УГСХА - Р.а. № 4 к температуре. Выяснено, что бактериофаг УГСХА - Р.а. № 4 инактивировался при температуре 75 °С в течение 30 минут.

Разработка технологических параметров изготовления и контроля фагового биопрепарата Pseudomonas aeruginosa

Результаты определения оптимальных температурных показателей культивирования свидетельствуют о том, что оптимальной является температура культивирования специфического бактериофага УГСХА-Р.а. № 4 30 °С - 37 °С. Нами решено инкубировать систему специфического бактериофага УГСХА-Р.а. № 4 с клетками *P. aeruginosa* при температуре 37 °С. Установлено оптимальное соотношение специфического бактериофага УГСХА-Р.а. № 4 и культуры 1:5, т.е. 0,2 мл фага х 1 мл индикаторной культуры, оптимальное время пассажа при температуре 37 °С для специфического бактериофага УГСХА-Р.а. № 4 составляет 6 часов. За это время происходил лизис индикаторной культуры (просветление среды по сравнению с контролем), литическая активность специфического бактериофага УГСХА-Р.а. № 4 составляла 10^{10} по Аппельману и 7×10^{10} по Грациа.

Латентный период внутриклеточного развития фага УГСХА-Р.а. № 4 на клетках *P. aeruginosa* 1 равен 21-22 минуты. Среднее количество негативных колоний на чашках при высеве из 4-ой пробирки с 15 по 20 минуту опыта равно 15, а при высеве с 23 по 60 минуту из пятой пробирки – 19,18. Средняя урожайность бактериофага УГСХА-Р.а. № 4 равна $1919:15=127,9$ вирусных частиц на одну микробную клетку *P. aeruginosa* 1.

Таким образом, экспериментально установлено, что бактериофаг УГСХА-Р.а. № 1 обладает всеми свойствами необходимыми для использования его в составе биопрепарата, сконструированного в перспективе для обработки пищевого сырья и готовой продукции.

5.2. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТЫ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ФАГОРЕЗИСТЕНТНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ МУТАНТОВ

Частоту формирования фагореzистентных мутантов определяли для бактериальных штаммов, которые использовали для наработки бактериофагов, входящих в состав технологического вспомогательного средства. Показано, что частота образования бактериальных колоний, образующихся в зоне фаголизиса газонов бактериальных культур, существенно варьирует: от 10^{-4} (для *Proteus*) до 10^{-7} (для *Pseudomonas aeruginosa*) на одну бактериальную клетку. Большинство штаммов, используемых для наработки фагов, входящих в состав ТВС, имеет частоту образования фагоустойчивых мутантов не выше 10^{-5} (таблица 57).

Таблица 57. Частота возникновения фагореzистентных бактериальных мутантов (bacteriophage insensitive mutants – BIMs).

Бактериофаг	Штамм	BIM
Ah 1	<i>Aeromonas hydrophila</i> B-7964	$1,2 \times 10^{-5} \pm 0,2$
УГСХА-Р.а. №4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	$1,2 \times 10^{-7} \pm 0,9$
Ars25- УГСХА	<i>Aeromonas salmonicida</i>	$1,5 \times 10^{-5} \pm 0,2$
FPr - 13 УГСХА	<i>Proteus</i>	$1,8 \times 10^{-4} \pm 0,1$
E4	<i>Enterobacter</i>	$3,8 \times 10^{-6} \pm 0,3$
Lm1	<i>L. monocytogenes</i> B-6643	$4,1 \times 10^{-5} \pm 0,4$
Ye3-f2	<i>Yersinia enterocolitica</i>	$1,6 \times 10^{-4} \pm 0,2$

5.3 МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ПОЛУЧЕНИЯ ФАГОВОЙ БИОМАССЫ С ВЫСОКОЙ ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ И ПРЕДЕЛЬНО НИЗКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ТОКСИНОВ. ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ЗНАЧЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ

Апробация жидких и плотных питательных сред для высокотехнологичного культивирования бактериофагов. Титр фага оценивается по Грациа и выражается количеством бляшкообразующих единиц фага (БОЕ) в 1 мл. Активность фага зависит от различных условий, основными из которых являются биологические особенности системы фаг-клетка, которые, в свою очередь, зависят от физических свойств среды, ее химического состава, окружающей температуры и т.д.

Для определения литической активности бактериофагов культуры бактериальных штаммов выращивали в МПБ в течение 24 ч.

При культивировании на жидких питательных средах титр фагов определяли периодически следующим образом: в пробирку с 4,5 мл МПБ вносили 0,2 мл суточной культуры индикаторного штамма и 0,1 мл соответствующего бактериофага (оптимальное соотношение фага и бактериальной культуры подбиралось эмпирически), тщательно перемешивали и культивировали при оптимальной для бактериального штамма температуре в течение 4 ч. Через каждый час отбирали 0,1 мл для анализа, освобождались

Таблица 58. Титр бактериофагов по Грациа на плотных и жидких питательных средах.

№ п/п	Штамм бактериофага	Максимальный титр фага, БОЕ/мл			
		На жидких средах		На плотных средах	
		Среднее	σ	Среднее	σ
1	Ah 1	$3,0 \times 10^9$	$1,3 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$ *	$1,3 \times 10^9$
2	УГСХА-Р.а. 4	$0,7 \times 10^8$	$0,1 \times 10^8$	$2,8 \times 10^8$ *	$1,9 \times 10^8$
3	Ars25- УГСХА	$3,5 \times 10^7$	$0,7 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$ *	$1,1 \times 10^7$
4	FPr - 13 УГСХА	$4,0 \times 10^9$	$1,2 \times 10^9$	$0,7 \times 10^{10}$ *	$0,1 \times 10^{10}$
5	E4	$2,6 \times 10^9$	$1,9 \times 10^9$	$0,9 \times 10^{10}$ *	$0,2 \times 10^{10}$
6	Lm1	$3,6 \times 10^9$	$3,7 \times 10^9$	$1,2 \times 10^{10}$ *	$0,8 \times 10^{10}$
7	Ye3-f2	$2,4 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$ *	$0,8 \times 10^7$

Примечание: * - $p < 0,05$ при сравнении с культивированием на жидких питательных средах

от бактериальных клеток фильтрованием с помощью бактериальных фильтров (Millipore; 0.22) и определяли титр по методу Грация. Максимальное значение титра фиксировали.

При культивировании на плотных питательных средах титр фагов определяли периодически следующим образом: в пробирку с 4,5 мл МПБ вносили 1 мл суточной культуры индикаторного штамма и 0,5 мл соответствующего бактериофага, тщательно перемешивали, отбирали 0,4 мл и растирали по поверхности МПА на заранее подготовленных чашках Петри по 4 для каждого бактериофага. Излишки жидкости удаляли стерильной пипеткой и давали 30 мин подсохнуть чашкам и адаптироваться бактериальной культуре. Посевы культивировали при оптимальной для бактериального штамма температуре в течение 4 ч. Через каждый час по одной из 4 чашек отбирали и проводили смыв бактериофага с поверхности агара стерильным 0,9% раствором натрия хлорида в количестве 2 мл. Инактивировали бактериальные клетки фильтрованием (методика описана выше) и определяли титр по методу Грация. Титр исследуемых бактериофагов в пересчете на 1 мл суспензии определяли в пяти повторностях в каждый интервал времени по методу Грация. Результаты обрабатывали статистически, рассчитывали средние значения и стандартные отклонения (σ) (таблица 58).

Проведенные сравнительные исследования показали преимущества культивирования бактериофагов на плотной питательной среде, что согласуется с патентом № 2525141.

5.4 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ БАКТЕРИОФАГОВ

Следующим этапом работы с производственно-перспективными штаммами бактериофагов явилась их молекулярно-генетическая характеристика, включающая в себя определение размера фагового генома, процента его идентичности с таксономически наиболее близкими бактериофагами, проверку отсутствия в составе ДНК генов, кодирующих токсины, интегразы, репрессоры транскрипции и других нежелательных локусов. Изучение данных характеристик позволяет подтвердить оригинальность и вирулентную природу отобранных бактериофагов.

Для получения полноразмерных нуклеотидных последовательностей геномов бактериофагов использовали полногеномное секвенирование ДНК бактериофагов второго поколения (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific, США). Каждый штамм бактериофага был секвенирован трижды. Данные каждого раунда секвенирования были проанализированы методами биоинформатики. Фильтрация качества прочтений (ридов) позволила собрать геномы бактериофагов с высокой достоверностью. На рисунках 45-51 собранные геномы сравнивали с известными ДНК бактериофагов, депонированных в GenBank NCBI для определения кодирующих областей геномов.

В результате проведенных исследований были составлены карты линейных ДНК выделенных и селектированных бактериофагов. В соответствии с известными аналогами были определены продукты экспрессии их генов. Качественный состав протеинов бактериофагов соответствует таковому у аннотированных аналогов, имеет четкие гомологии нуклеотидного и аминокислотного наборов. В структуре протеинов наблюдается закономерность, присущая данным вирусным частицам – наличие структурных и неструктурных компонентов. Также выявлены продукты генов, не имеющие четко определенных функциональных характеристик, так называемые гипотетические белки, имеющие аналогии в аннотированных геномах бактериофагов, активных в отноше-

нии изучаемых видов бактерий. В таблицах 59-65 представлен биоинформационный анализ соответствия известных генов с данными сиквенирования каждого изучаемого бактериофага

Одной из задач в рамках данного проекта была разработка систем молекулярно-генетической индикации (с использованием ПЦР) автономных генетических элементов (островков патогенности) в геномах бактериофагов, активных в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus ssp.*, *Enterobacter ssp.* и предполагаемых для применения при деконтаминации рыбного и мясного сырья, а также готовой продукции от микрофлоры, вызывающей их порчу.

1. *Pseudomonas aeruginosa*

На первом этапе в библиотеке баз данных GeneBank (США), EMBL (Европейская молекулярно-биологическая библиотека), DDBJ (Японская база данных нуклеотидных последовательностей) была определена уникальность гена-кандидата *ctx*, кодирующего цитотоксин. Установлено, что данный ген находится в ДНК *Pseudomonas phage phiCTX*.

После анализа в библиотеках баз данных GeneBank (США), EMBL (Европейская молекулярно-биологическая библиотека), DDBJ (Японская база данных нуклеотидных последовательностей) нуклеотидных последовательностей всех вышеуказанных генов, они были просканированы системой Blast базы данных GeneBank (США) на предмет совпадения с последовательностями ДНК известных микроорганизмов. Установлено, что данные генетические последовательности являются уникальными для *Pseudomonas phage phiCTX* и не имеют совпадений с другими видами микроорганизмов.

После выбора специфичного гена-кандидата для молекулярно-генетической идентификации «островка патогенности», носителем которого могут быть бактериофаги, активные в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, были определены наиболее консервативные участки выбранных мишеней, путем их сравнения у различных штаммов *Pseudomonas phage* в базе данных GeneBank.

Sequence: Yersinia.gb (Linear / 39 120 bp)
 Features: 95 visible, 95 total

Feature	Location	Size			Type
✓ source	1 .. 39 120	39 120 bp			source
✓ repeat region	1 .. 235	235 bp			repeat_region
✓ phiYe-F10_00001	993 .. 1358	366 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00001	993 .. 1358	366 bp			gene
✓ phiYe-F10_00002	1358 .. 1507	150 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00002	1358 .. 1507	150 bp			gene
✓ phiYe-F10_00003	1935 .. 2087	153 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00003	1935 .. 2087	153 bp			gene
✓ phiYe-F10_00004	2358 .. 2474	117 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00004	2358 .. 2474	117 bp			gene
✓ phiYe-F10_00005	2471 .. 2668	198 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00005	2471 .. 2668	198 bp			gene
✓ phiYe-F10_00006	2655 .. 2825	171 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00006	2655 .. 2825	171 bp			gene
✓ phiYe-F10_00007	2840 .. 3949	1110 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00007	2840 .. 3949	1110 bp			gene
✓ phiYe-F10_00008	4020 .. 6674	2655 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00008	4020 .. 6674	2655 bp			gene
✓ phiYe-F10_00009	6761 .. 7033	273 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00009	6761 .. 7033	273 bp			gene
✓ phiYe-F10_00010	7126 .. 7266	141 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00010	7126 .. 7266	141 bp			gene
✓ phiYe-F10_00011	7266 .. 7541	276 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00011	7266 .. 7541	276 bp			gene
✓ phiYe-F10_00012	7621 .. 8652	1032 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00012	7621 .. 8652	1032 bp			gene
✓ phiYe-F10_00013	8825 .. 9082	258 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00013	8825 .. 9082	258 bp			gene
✓ phiYe-F10_00014	9082 .. 9654	573 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00014	9082 .. 9654	573 bp			gene
✓ phiYe-F10_00015	9641 .. 9778	138 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00015	9641 .. 9778	138 bp			gene
✓ phiYe-F10_00016	9850 .. 10 011	162 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00016	9850 .. 10 011	162 bp			gene
✓ phiYe-F10_00017	10 064 .. 10 762	699 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00017	10 064 .. 10 762	699 bp			gene
✓ phiYe-F10_00018	10 762 .. 11 223	462 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00018	10 762 .. 11 223	462 bp			gene
✓ phiYe-F10_00019	11 216 .. 11 671	456 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00019	11 216 .. 11 671	456 bp			gene
✓ phiYe-F10_00020	11 852 .. 13 552	1701 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00020	11 852 .. 13 552	1701 bp			gene
✓ phiYe-F10_00021	13 651 .. 13 863	213 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00021	13 651 .. 13 863	213 bp			gene
✓ phiYe-F10_00022	13 876 .. 14 160	285 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00022	13 876 .. 14 160	285 bp			gene
✓ phiYe-F10_00023	14 228 .. 16 342	2115 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00023	14 228 .. 16 342	2115 bp			gene
✓ phiYe-F10_00024	16 359 .. 16 658	300 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00024	16 359 .. 16 658	300 bp			gene
✓ phiYe-F10_00025	16 658 .. 16 867	210 bp			CDS
✓ phiYe-F10_00025	16 658 .. 16 867	210 bp			gene
✓ phiYe-F10_00026	16 864 .. 17 046	183 bp			CDS

Таблица 59. Биоинформационный анализ соответствия известных генов с данными секвенирования бактериофага *Yersinia enterocolitica*.

Sequence: Pseudomonas.gb (Linear / 39 632 bp)
 Features: 117 visible, 117 total

Feature	Location	Size			Type
✓ source	1 .. 39 632	39 632 bp			source
✓ orf1	380 .. 1105	726 bp		←	CDS p01
✓ orf1	380 .. 1105	726 bp		←	gene
✓ orf2	1156 .. 1353	198 bp		←	CDS p02
✓ orf2	1156 .. 1353	198 bp		←	gene
✓ orf3	1378 .. 1677	300 bp		←	CDS p03
✓ orf3	1378 .. 1677	300 bp		←	gene
✓ orf4	1682 .. 1891	210 bp		←	CDS p04
✓ orf4	1682 .. 1891	210 bp		←	gene
✓ orf5	2269 .. 2853	585 bp		→	CDS p05
✓ orf5	2269 .. 2853	585 bp		→	gene
✓ orf6	2837 .. 2983	147 bp		→	CDS p06
✓ orf6	2837 .. 2983	147 bp		→	gene
✓ orf7	2970 .. 4580	1611 bp		→	CDS p07
✓ orf7	2970 .. 4580	1611 bp		→	gene
✓ orf8	4570 .. 6570	2001 bp		→	CDS p08
✓ orf8	4570 .. 6570	2001 bp		→	gene
✓ orf9	6545 .. 7114	570 bp		→	CDS p09
✓ orf9	6545 .. 7114	570 bp		→	gene
✓ orf10	7290 .. 7658	369 bp		→	CDS p10
✓ orf10	7290 .. 7658	369 bp		→	gene
✓ orf11	7664 .. 8410	747 bp		→	CDS p11
✓ orf11	7664 .. 8410	747 bp		→	gene
✓ orf12	8386 .. 9084	699 bp		←	CDS p12
✓ orf12	8386 .. 9084	699 bp		←	gene
✓ orf13	8425 .. 9681	1257 bp		→	CDS p13
✓ orf13	8425 .. 9681	1257 bp		→	gene
✓ orf14	9767 .. 10 183	417 bp		→	CDS p14
✓ orf14	9767 .. 10 183	417 bp		→	gene
✓ orf15	10 186 .. 10 839	654 bp		→	CDS p15
✓ orf15	10 186 .. 10 839	654 bp		→	gene
✓ orf16	10 851 .. 11 198	348 bp		→	CDS p16
✓ orf16	10 851 .. 11 198	348 bp		→	gene
✓ orf17	11 478 .. 11 828	351 bp		→	CDS p17
✓ orf17	11 478 .. 11 828	351 bp		→	gene
✓ orf18	11 929 .. 12 216	288 bp		→	CDS p18
✓ orf18	11 929 .. 12 216	288 bp		→	gene
✓ orf19	12 047 .. 12 343	297 bp		→	CDS p19
✓ orf19	12 047 .. 12 343	297 bp		→	gene
✓ orf20	12 321 .. 12 692	372 bp		→	CDS p20
✓ orf20	12 321 .. 12 692	372 bp		→	gene
✓ orf21	12 703 .. 15 798	3096 bp		→	CDS p21
✓ orf21	12 703 .. 15 798	3096 bp		→	gene
✓ orf22	14 359 .. 15 198	840 bp		←	CDS p22
✓ orf22	14 359 .. 15 198	840 bp		←	gene
✓ orf23	15 809 .. 16 726	918 bp		→	CDS p23
✓ orf23	15 809 .. 16 726	918 bp		→	gene
✓ orf24	16 740 .. 18 473	1734 bp		→	CDS p24
✓ orf24	16 740 .. 18 473	1734 bp		→	gene
✓ orf25	18 491 .. 24 040	5550 bp		→	CDS p25
✓ orf25	18 491 .. 24 040	5550 bp		→	gene
✓ orf26	24 096 .. 24 377	282 bp		←	CDS p26
✓ orf26	24 096 .. 24 377	282 bp		←	gene

Таблица 60. Биоинформационный анализ соответствия известных генов с данными сиквенирования бактериофага *Pseudomonas aeruginosa*.

Sequence: Listeria.gb (Linear / 45 840 bp)
Features: 127 visible, 127 total

Feature	Location	Size			Type
✓ source	1 .. 45 840	45 840 bp		→	source
✓ LP032_016	1 .. 225	225 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ LP032_016	1 .. 225	225 bp		←	gene
✓ LP032_017	286 .. 447	162 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ LP032_017	286 .. 447	162 bp		←	gene
✓ LP032_018	488 .. 721	234 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ LP032_018	488 .. 721	234 bp		←	gene
✓ LP032_019	725 .. 1405	681 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ LP032_019	725 .. 1405	681 bp		←	gene
✓ LP032_020	1398 .. 1664	267 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ LP032_020	1398 .. 1664	267 bp		←	gene
✓ LP032_021	1665 .. 2576	912 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ LP032_021	1665 .. 2576	912 bp		←	gene
✓ LP032_022	2595 .. 3617	1023 bp		←	CDS AAA_5 domain-cont...
✓ LP032_022	2595 .. 3617	1023 bp		←	gene
✓ LP032_023	3639 .. 3917	279 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ LP032_023	3639 .. 3917	279 bp		←	gene
✓ LP032_024	3992 .. 4228	237 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ LP032_024	3992 .. 4228	237 bp		←	gene
✓ LP032_025	4221 .. 4445	225 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ LP032_025	4221 .. 4445	225 bp		←	gene
✓ LP032_026	4461 .. 5147	687 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ LP032_026	4461 .. 5147	687 bp		←	gene
✓ LP032_027	5240 .. 5650	411 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ LP032_027	5240 .. 5650	411 bp		←	gene
✓ LP032_028	5610 .. 5975	366 bp		←	CDS putative sigma factor
✓ LP032_028	5610 .. 5975	366 bp		←	gene
✓ LP032_029	5953 .. 6501	549 bp		←	CDS
✓ LP032_029	5953 .. 6501	549 bp		←	gene
✓ LP032_030	6503 .. 7015	513 bp		←	CDS
✓ LP032_030	6503 .. 7015	513 bp		←	gene
✓ LP032_031	7012 .. 8037	1026 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ LP032_031	7012 .. 8037	1026 bp		←	gene
✓ LP032_032	8038 .. 8649	612 bp		←	CDS
✓ LP032_032	8038 .. 8649	612 bp		←	gene
✓ LP032_033	8705 .. 10 801	2097 bp		←	CDS DNA polymerase I
✓ LP032_033	8705 .. 10 801	2097 bp		←	gene
✓ LP032_034	10 953 .. 11 399	447 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ LP032_034	10 953 .. 11 399	447 bp		←	gene
✓ LP032_035	11 402 .. 12 367	966 bp		←	CDS DNA primase
✓ LP032_035	11 402 .. 12 367	966 bp		←	gene
✓ LP032_036	12 444 .. 13 772	1329 bp		←	CDS
✓ LP032_036	12 444 .. 13 772	1329 bp		←	gene
✓ LP032_037	13 773 .. 14 555	783 bp		←	CDS
✓ LP032_037	13 773 .. 14 555	783 bp		←	gene
✓ LP032_038	14 574 .. 14 957	384 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ LP032_038	14 574 .. 14 957	384 bp		←	gene
✓ LP032_039	15 013 .. 15 516	504 bp		←	CDS HNH homing endonu...
✓ LP032_039	15 013 .. 15 516	504 bp		←	gene
✓ LP032_040	15 822 .. 16 022	201 bp		→	CDS hypothetical protein
✓ LP032_040	15 822 .. 16 022	201 bp		→	gene
✓ LP032_041	16 611 .. 17 264	654 bp		→	CDS
✓ LP032_041	16 611 .. 17 264	654 bp		→	gene

Таблица 61. Биоинформационный анализ соответствия известных генов с данными секвенирования бактериофага *Listeria monocytogenes*.

Sequence: *Aeromonas salmonicida* (Linear / 161 820 bp)
 Features: 237 visible, 238 total

Feature	Location	Size			Type
type: linear	1 .. 161 820	161 820 bp		→	source
✓ baseplate wedge subunit...	1 .. 1440	1440 bp		→	CDS
✓ baseplate wedge subunit	1440 .. 2102	663 bp		→	CDS
✓ short tail fibers protein	2102 .. 3499	1398 bp		→	CDS
✓ whiskers protein	3499 .. 5256	1761 bp		→	CDS whiskers protein
✓ neck protein	5402 .. 6325	924 bp		→	CDS neck protein
✓ neck protein	6329 .. 7090	762 bp		→	CDS neck protein
✓ proximal tail sheath stabil...	7090 .. 7899	810 bp		→	CDS
✓ terminase small subunit	7910 .. 8359	450 bp		→	CDS
✓ terminase large subunit	8356 .. 10 194	1839 bp		→	CDS
✓ tail sheath protein	10 247 .. 12 238	1992 bp		→	CDS tail sheath protein
✓ tail fiber protein	12 289 .. 12 777	489 bp		→	CDS tail fiber protein
✓ head portal vertex protein	12 819 .. 14 369	1551 bp		→	CDS
✓ prohead core-like protein	14 370 .. 14 579	210 bp		→	CDS
✓ prohead core protein	14 580 .. 15 002	423 bp		→	CDS
✓ prohead assembly	15 004 .. 15 636	633 bp		→	CDS prohead assembly
✓ prohead assembly	15 649 .. 16 479	831 bp		→	CDS prohead assembly
✓ major capsid protein	16 499 .. 18 088	1590 bp		→	CDS
✓ hypothetical protein	18 238 .. 18 435	198 bp		→	CDS
✓ precursor of head vertex...	18 545 .. 19 777	1233 bp		→	CDS
✓ hypothetical protein	19 840 .. 20 211	372 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	20 208 .. 20 735	528 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	20 803 .. 21 204	402 bp		←	CDS
✓ guanosine-3',5'-bis	21 197 .. 21 682	486 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	21 682 .. 21 927	246 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	21 932 .. 22 270	339 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	22 330 .. 23 088	759 bp		←	CDS
✓ capsid and scaffold protein	23 218 .. 23 754	537 bp		←	CDS
✓ Inh	23 798 .. 24 499	702 bp		←	CDS Inh
✓ DNA helicase	24 551 .. 26 038	1488 bp		→	CDS DNA helicase
✓ hypothetical protein	26 048 .. 26 281	234 bp		→	CDS
✓ hypothetical protein	26 317 .. 26 481	165 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	26 483 .. 26 956	474 bp		←	CDS
✓ baseplate wedge subunit	27 263 .. 27 646	384 bp		←	CDS
✓ baseplate hub subunit	27 643 .. 28 248	606 bp		←	CDS
✓ baseplate	28 297 .. 29 046	750 bp		→	CDS baseplate
✓ baseplate hub subunit	29 046 .. 30 161	1116 bp		→	CDS
✓ baseplate hub distal subunit	30 158 .. 30 685	528 bp		→	CDS
✓ baseplate hub	30 685 .. 32 382	1698 bp		→	CDS baseplate hub
✓ baseplate tail tube cap	32 379 .. 33 407	1029 bp		→	CDS
✓ baseplate-tail tube initiator	33 410 .. 34 267	858 bp		→	CDS
✓ RNA polymerase ADP-rib...	34 296 .. 36 251	1956 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	36 282 .. 37 187	906 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	37 217 .. 37 483	267 bp		←	CDS
✓ DNA ligase	37 577 .. 39 091	1515 bp		←	CDS DNA ligase
✓ hypothetical protein	39 093 .. 39 794	702 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	39 852 .. 40 043	192 bp		←	CDS
✓ co-chaperonin for GroEL	40 091 .. 40 414	324 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	40 489 .. 41 007	519 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	41 017 .. 41 577	561 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	41 574 .. 41 891	318 bp		←	CDS
✓ dCMP deaminase	41 902 .. 42 420	519 bp		←	CDS dCMP deaminase
✓ hypothetical protein	42 417 .. 42 659	243 bp		←	CDS

Таблица 62. Биоинформационный анализ соответствия известных генов с данными секвенирования бактериофага *Aeromonas salmonicida*.

Sequence: *Aeromonas hydrophila* (Linear / 198 323 bp)
 Features: 402 visible, 403 total

Feature	Location	Size			Type
source	1 .. 198 323	198 323 bp			source
✓ recombination, repair and...	324 .. 740	417 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	740 .. 913	174 bp		←	CDS
✓ DNA helicase	955 .. 2259	1305 bp		←	CDS DNA helicase
✓ hypothetical protein	2225 .. 2845	621 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	2854 .. 3030	177 bp		←	CDS
✓ DNA ligase	3085 .. 4638	1554 bp		←	CDS DNA ligase
✓ hypothetical protein	4642 .. 5103	462 bp		←	CDS
✓ hypothetical protein	5103 .. 5705	603 bp		←	CDS
✓ single-stranded DNA bindi...	5796 .. 6767	972 bp		←	CDS
✓ loader of DNA helicase	6791 .. 7456	666 bp		←	CDS
✓ late promoter transcriptio...	7453 .. 7692	240 bp		←	CDS
✓ dsDNA-binding protein	7692 .. 8015	324 bp		←	CDS
✓ ribonuclease	8031 .. 8966	936 bp		←	CDS ribonuclease
✓ long tail fiber proximal su...	9025 .. 12 717	3693 bp		→	CDS
✓ hinge long tail fiber proxi...	12 765 .. 16 544	3780 bp		→	CDS
✓ hypothetical protein	16 699 .. 16 818	120 bp		→	CDS
✓ hypothetical protein	16 815 .. 17 717	903 bp		←	CDS
✓ aerobic ribonucleoside di...	17 793 .. 20 042	2250 bp		→	CDS
✓ aerobic ribonucleoside di...	20 085 .. 21 212	1128 bp		→	CDS
✓ NTP anaerobic reductase...	21 273 .. 23 102	1830 bp		→	CDS
✓ anaerobic NTP reductase...	23 099 .. 23 572	474 bp		→	CDS anaerobic NTP red...
✓ thioredoxin	23 574 .. 23 843	270 bp		→	CDS thioredoxin
✓ hypothetical protein	23 833 .. 24 057	225 bp		→	CDS
✓ glutaredoxin	24 057 .. 24 338	282 bp		→	CDS glutaredoxin
✓ hypothetical protein	24 325 .. 24 930	606 bp		→	CDS
✓ hypothetical protein	24 914 .. 25 174	261 bp		→	CDS
✓ hypothetical protein	25 155 .. 26 609	1455 bp		→	CDS
✓ thioredoxin	26 662 .. 27 213	552 bp		→	CDS thioredoxin
✓ hypothetical protein	27 191 .. 27 412	222 bp		→	CDS
✓ hypothetical protein	27 405 .. 27 794	390 bp		→	CDS
✓ endonuclease subunit	27 850 .. 28 881	1032 bp		→	CDS
✓ hypothetical protein	28 878 .. 29 132	255 bp		→	CDS
✓ endonuclease subunit	29 132 .. 31 462	2331 bp		→	CDS
✓ hypothetical protein	31 462 .. 31 650	189 bp		→	CDS
✓ sliding clamp	31 674 .. 32 366	693 bp		→	CDS sliding clamp
✓ clamp loader subunit	32 437 .. 33 417	981 bp		→	CDS
✓ clamp loader small subunit	33 414 .. 33 992	579 bp		→	CDS
✓ translation repressor prot...	33 970 .. 34 359	390 bp		→	CDS
✓ core DNA polymerase of r...	34 411 .. 35 931	1521 bp		→	CDS
✓ core DNA polymerase of r...	35 928 .. 37 103	1176 bp		→	CDS
✓ RecA-like recombination...	37 195 .. 38 304	1110 bp		→	CDS
✓ hypothetical protein	38 682 .. 39 113	432 bp		→	CDS
✓ head vertex assembly cha...	39 155 .. 39 445	291 bp		→	CDS
✓ hypothetical protein	39 447 .. 39 962	516 bp		→	CDS
✓ DNA primase-helicase su...	40 035 .. 41 594	1560 bp		→	CDS
✓ hypothetical protein	41 635 .. 42 576	942 bp		→	CDS
✓ hypothetical protein	42 573 .. 43 022	450 bp		→	CDS
✓ DNA primase	43 080 .. 44 135	1056 bp		→	CDS DNA primase
✓ hypothetical protein	44 135 .. 44 497	363 bp		→	CDS
✓ deoxyuridine 5'-triphosph...	44 510 .. 45 001	492 bp		→	CDS
✓ DNA primase	45 001 .. 45 654	654 bp		→	CDS DNA primase
✓ hypothetical protein	45 660 .. 45 851	192 bp		→	CDS

Таблица 63. Биоинформационный анализ соответствия известных генов с данными сиквенирования бактериофага *Aeromonas hydrophila*.

Sequence: Proteus.gb (Linear / 44 580 bp)
Features: 54 visible, 54 total

Feature	Location	Size			Type
✓ source	1 .. 44 580	44 580 bp			source
✓ regulatory region	403 .. 422	20 bp			regulatory
✓ hypothetical protein	607 .. 882	276 bp			CDS
✓ hypothetical protein	845 .. 1096	252 bp			CDS
✓ hypothetical protein	1096 .. 1305	210 bp			CDS
✓ hypothetical protein	1463 .. 1963	501 bp			CDS
✓ hypothetical protein	2028 .. 2357	330 bp			CDS
✓ hypothetical protein	2536 .. 2754	219 bp			CDS
✓ hypothetical protein	2825 .. 3670	846 bp			CDS
✓ DNA-directed RNA polyme...	3744 .. 6371	2628 bp			CDS
✓ Rho-independent	6383 .. 6424	42 bp			regulatory
✓ HNH endonuclease	6674 .. 7087	414 bp			CDS HNH endonucle...
✓ hypothetical protein	7219 .. 7437	219 bp			CDS
✓ DNA primase/helicase	7647 .. 9635	1989 bp			CDS
✓ Rho-independent	9815 .. 9858	44 bp			regulatory
✓ hypothetical protein	9883 .. 10 494	612 bp			CDS
✓ hypothetical protein	10 636 .. 10 887	252 bp			CDS
✓ hypothetical protein	10 951 .. 11 115	165 bp			CDS
✓ DNA polymerase	11 099 .. 13 651	2553 bp			CDS DNA polymerase
✓ hypothetical protein	13 690 .. 14 235	546 bp			CDS
✓ hypothetical protein	14 238 .. 14 468	231 bp			CDS
✓ hypothetical protein	14 487 .. 14 642	156 bp			CDS
✓ hypothetical protein	14 655 .. 15 461	807 bp			CDS
✓ hypothetical protein	15 465 .. 15 689	225 bp			CDS
✓ hypothetical protein	15 792 .. 16 115	324 bp			CDS
✓ hypothetical protein	16 187 .. 16 339	153 bp			CDS
✓ hypothetical protein	16 406 .. 16 651	246 bp			CDS
✓ exonuclease	16 597 .. 17 631	1035 bp			CDS exonuclease
✓ endonuclease	17 616 .. 18 026	411 bp			CDS endonuclease
✓ protein phosphatase 2a-lik...	18 019 .. 19 026	1008 bp			CDS
✓ hypothetical protein	19 097 .. 19 402	306 bp			CDS
✓ DNA ligase	19 497 .. 20 438	942 bp			CDS DNA ligase
✓ hypothetical protein	20 314 .. 20 625	312 bp			CDS
✓ hypothetical protein	20 498 .. 20 761	264 bp			CDS
✓ N-acetyltransferase putati...	20 761 .. 21 255	495 bp			CDS
✓ head-tail connector	21 436 .. 22 986	1551 bp			CDS
✓ scaffolding protein	22 986 .. 23 867	882 bp			CDS
✓ major capsid protein	23 941 .. 25 053	1113 bp			CDS
✓ tail protein	25 182 .. 25 910	729 bp			CDS tail protein
✓ tail protein	25 852 .. 28 317	2466 bp			CDS tail protein
✓ internal virion protein	28 317 .. 28 994	678 bp			CDS
✓ lysozyme domain-containi...	29 003 .. 31 954	2952 bp			CDS
✓ internal virion protein	32 022 .. 35 843	3822 bp			CDS
✓ tail protein	35 843 .. 36 802	960 bp			CDS tail protein
✓ small terminase subunit	36 870 .. 37 292	423 bp			CDS
✓ large terminase subunit	37 292 .. 39 190	1899 bp			CDS
✓ hypothetical protein	39 357 .. 39 632	276 bp			CDS
✓ hypothetical protein	39 644 .. 39 913	270 bp			CDS
✓ putative M15 family peptid...	39 923 .. 40 276	354 bp			CDS
✓ putative membrane protein	40 303 .. 40 527	225 bp			CDS
✓ membrane protein	40 520 .. 40 717	198 bp			CDS membrane prot...
✓ hypothetical protein	40 831 .. 42 675	1845 bp			CDS
✓ hypothetical protein	42 734 .. 43 606	873 bp			CDS

Таблица 64. Биоинформационный анализ соответствия известных генов с данными секвенирования бактериофага *Proteus*.

Sequence: Enterobacter.gb (Linear / 36 030 bp)
 Features: 83 visible, 83 total

Feature	Location	Size			Type
✓ source	1 .. 36 030	36 030 bp		↔	source
✓ AXI78_gp01	795 .. 1727	933 bp		←	CDS
✓ AXI78_gp01	795 .. 1727	933 bp		←	gene
✓ AXI78_gp02	1829 .. 3436	1608 bp		←	CDS
✓ AXI78_gp02	1829 .. 3436	1608 bp		←	gene
✓ AXI78_gp03	3447 .. 3767	321 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp03	3447 .. 3767	321 bp		←	gene
✓ AXI78_gp04	3795 .. 4046	252 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp04	3795 .. 4046	252 bp		←	gene
✓ AXI78_gp05	4051 .. 4245	195 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp05	4051 .. 4245	195 bp		←	gene
✓ AXI78_gp06	4389 .. 4502	114 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp06	4389 .. 4502	114 bp		←	gene
✓ AXI78_gp07	4484 .. 5395	912 bp		←	CDS exonuclease
✓ AXI78_gp07	4484 .. 5395	912 bp		←	gene
✓ AXI78_gp08	5392 .. 5574	183 bp		←	CDS inhibitor of recBCD...
✓ AXI78_gp08	5392 .. 5574	183 bp		←	gene
✓ AXI78_gp09	5571 .. 5780	210 bp		←	CDS HNS binding protein
✓ AXI78_gp09	5571 .. 5780	210 bp		←	gene
✓ AXI78_gp10	5777 .. 6079	303 bp		←	CDS HNS binding protein
✓ AXI78_gp10	5777 .. 6079	303 bp		←	gene
✓ AXI78_gp11	6096 .. 8210	2115 bp		←	CDS DNA polymerase
✓ AXI78_gp11	6096 .. 8210	2115 bp		←	gene
✓ AXI78_gp12	8278 .. 8562	285 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp12	8278 .. 8562	285 bp		←	gene
✓ AXI78_gp13	8575 .. 8787	213 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp13	8575 .. 8787	213 bp		←	gene
✓ AXI78_gp14	8886 .. 10 400	1515 bp		←	CDS
✓ AXI78_gp14	8886 .. 10 400	1515 bp		←	gene
✓ AXI78_gp15	10 767 .. 11 222	456 bp		←	CDS
✓ AXI78_gp15	10 767 .. 11 222	456 bp		←	gene
✓ AXI78_gp16	11 215 .. 11 676	462 bp		←	CDS endonuclease
✓ AXI78_gp16	11 215 .. 11 676	462 bp		←	gene
✓ AXI78_gp17	11 676 .. 12 374	699 bp		←	CDS
✓ AXI78_gp17	11 676 .. 12 374	699 bp		←	gene
✓ AXI78_gp18	12 427 .. 12 663	237 bp		←	CDS
✓ AXI78_gp18	12 427 .. 12 663	237 bp		←	gene
✓ AXI78_gp19	12 660 .. 12 797	138 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp19	12 660 .. 12 797	138 bp		←	gene
✓ AXI78_gp20	12 784 .. 13 263	480 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp20	12 784 .. 13 263	480 bp		←	gene
✓ AXI78_gp21	13 263 .. 13 520	258 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp21	13 263 .. 13 520	258 bp		←	gene
✓ AXI78_gp22	13 690 .. 14 706	1017 bp		←	CDS DNA ligase
✓ AXI78_gp22	13 690 .. 14 706	1017 bp		←	gene
✓ AXI78_gp23	14 703 .. 15 119	417 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp23	14 703 .. 15 119	417 bp		←	gene
✓ AXI78_gp24	15 146 .. 15 421	276 bp		←	CDS
✓ AXI78_gp24	15 146 .. 15 421	276 bp		←	gene
✓ AXI78_gp25	15 421 .. 15 561	141 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp25	15 421 .. 15 561	141 bp		←	gene
✓ AXI78_gp26	15 654 .. 15 926	273 bp		←	CDS hypothetical protein
✓ AXI78_gp26	15 654 .. 15 926	273 bp		←	gene

Таблица 65. Биоинформационный анализ соответствия известных генов с данными сиквенирования бактериофага *Enterobacter*.

На эти консервативные участки приложением Primer BLAST этой базы данных в режиме on-line были положены праймеры, отвечающие некоторым условиям, определенным нами: длина праймеров должна составлять 18–24 пары нуклеотидов, температура плавления праймера должна быть 60–70 °С, размер фланкируемого праймерами участка гена должна составлять не менее 100 и не более 1000 п.о.

После определения праймеров, они были выровнены программой Gene Runner Version 3.05, определены димеры, при возможном их некомплементарном связывании самими с собой или попарно. В окончанном варианте праймеры, теоретическая специфичность и фрагменты амплифицируемых участков представлены на рисунке 52 и в таблице 66.

Для оптимизации ПЦР-протокола, в реакциях со штаммами *Pseudomonas aeruginosa*, выделенными из клинических образцов был использован электрофоретический метод детекции продуктов амплификации.

Результаты экспериментальных исследований индикации специфического фрагмента гена *ctx* культур *Pseudomonas phage* с разработанными системами олигонуклеотидов представлены на рисунке 53.

2. *Aeromonas hydrophila*

Аналогично были проведены исследования по индикации фрагмента гена *hly*, кодирующего гемолизин (аэролизин) *Aeromonas hydrophila*. Данные по подобранным праймерам представлены на рисунке 54 и в таблице 67.

Таблица 66. Характеристика праймеров к участкам гена *ctx* генома фагов, активных в отношении *Pseudomonas aeruginosa*.

Параметр	Характеристика
участок гена <i>ctx</i>	
Прямой праймер (f) 5'-3'	AAGACTTGCTGGTACTCGCC
Обратный праймер (r) 5'-3'	CCGTCAACTTGCAACAAGGG
Расчетная температура плавления прямого праймера	59,9°С
Расчетная температура плавления обратного праймера	60,0°С
Теоретическая специфичность	<i>Pseudomonas phage phi CTX</i>
Длина амплифицируемого участка (п.о.)	177

Результаты экспериментальных исследований индикации специфического фрагмента гена *hly* культур *Aeromonas hydrophila* с разработанными системами олигонуклеотидов представлены на рисунке 55.

3. *Aeromonas salmonicida*

В отношении *Aeromonas salmonicida* был также выбран фрагмент гена *aerolysin*, кодирующего аэролизин. Данные по подобранным праймерам представлены на рисунке 56 и в таблице 68.

Результаты экспериментальных исследований индикации специфического фрагмента гена *hly* культур *Aeromonas salmonicida* с разработанными системами олигонуклеотидов представлены на рисунке 57.

4. *Listeria monocytogenes*

Для вида *Listeria monocytogenes* был также выбран фрагмент гена *hly*, кодирующего гемолизин. Данные по подобранным праймерам представлены на рисунке 58 и в таблице 69.

Результаты экспериментальных исследований индикации специфического фрагмента гена *hly* культур *Listeria monocytogenes* с разработанными системами олигонуклеотидов представлены на рисунке 59.

5. *Yersinia enterocolitica*

Для вида *Yersinia enterocolitica* был выбран фрагмент гена *ail*, кодирующего локус гена инвазивного белка. Данные по подобранным праймерам представлены на рисунке 60 и в таблице 70.

Результаты экспериментальных исследований индикации специфического фрагмента гена *ail* культур *Yersinia enterocolitica* с разработанными системами олигонуклеотидов представлены на рисунке 61.

6. *Proteus spp.*

Для *Proteus spp.* был выбран фрагмент гена *toxin RelE*. Данные по подобранным праймерам представлены на рисунке 62 и в таблице 71.

Таблица 67. Характеристика праймеров к участкам гена *hly* генома фагов, активных в отношении *Aeromonas hydrophila*.

Параметр	Характеристика
участок гена <i>hly</i>	
Прямой праймер (f) 5'-3'	CTGCAATCCGAACAGGGTCT
Обратный праймер (r) 5'-3'	CTTGCTGCCGCTCATCTTG
Расчетная температура плавления прямого праймера	60,0°C
Расчетная температура плавления обратного праймера	60,0°C
Теоретическая специфичность	<i>Aeromonas hydrophila hemolysin gene</i>
Длина амплифицируемого участка (п.о.)	169

Таблица 68. Характеристика праймеров к участкам гена *aerolysin* генома фагов, активных в отношении *Aeromonas salmonicida*.

Параметр	Характеристика
участок гена <i>aerolysin</i>	
Прямой праймер (f) 5'-3'	CTGCTGGCCTTGTCCTTGTA
Обратный праймер (r) 5'-3'	GACACGCCTCAATCCGGTTA
Расчетная температура плавления прямого праймера	60,1°C
Расчетная температура плавления обратного праймера	59,9°C
Теоретическая специфичность	<i>Aeromonas salmonicida aerolysin gene</i>
Длина амплифицируемого участка (п.о.)	437

Таблица 69. Характеристика праймеров к участкам гена *hly* генома фагов, активных в отношении *Listeria monocytogenes*.

Параметр	Характеристика
участок гена <i>hly</i>	
Прямой праймер (f) 5'-3'	TTTCATCCATGGCACCACCA
Обратный праймер (r) 5'-3'	TTCGCTTTTACGAGAGCACCT
Расчетная температура плавления прямого праймера	59,9°C
Расчетная температура плавления обратного праймера	60,0°C
Теоретическая специфичность	<i>Listeria monocytogenes hly gene</i>
Длина амплифицируемого участка (п.о.)	295

Таблица 70. Характеристика праймеров к участкам гена *ail* генома фагов, активных в отношении *Yersinia enterocolitica*.

Параметр	Характеристика
участок гена <i>ail</i>	
Прямой праймер (f) 5'-3'	AATGTGTACGCTGCGAGTGA
Обратный праймер (r) 5'-3'	CGGCCCCAGTAATCCATAAA
Расчетная температура плавления прямого праймера	60,0°C
Расчетная температура плавления обратного праймера	59,9°C
Теоретическая специфичность	<i>Yersinia enterocolitica ail gene</i>
Длина амплифицируемого участка (п.о.)	292

Результаты экспериментальных исследований индикации специфического фрагмента гена *RelE* культур *Proteus spp.* с разработанными системами олигонуклеотидов представлены на рисунке 63.

7. *Enterobacter spp.*

Для *Enterobacter spp.* был также выбран фрагмент гена *toxin RelE*, кодирующего локус гена инвазивного белка. Данные по подобранным праймерам представлены на рисунке 64 и в таблице 72.

Результаты экспериментальных исследований индикации специфического фрагмента гена *RelE* культур *Enterobacter spp.* с разработанными системами олигонуклеотидов представлены на рисунке 65.

В результате проведенных экспериментов в геномах выделенных и селектированных бактериофагов, перспективных в отношении обработки пищевых продуктов, локусов патогенности выявлено не было.

Таблица 71. Характеристика праймеров к участкам гена *toxin RelE* генома фагов, активных в отношении *Proteus spp.*

Параметр	Характеристика
участок гена <i>toxin RelE</i>	
Прямой праймер (f) 5'-3'	AGCAAATCAAACATATTGGCTACAGA
Обратный праймер (r) 5'-3'	TGCTTTTGGATACGCCATAACT
Расчетная температура плавления прямого праймера	60,0°С
Расчетная температура плавления обратного праймера	59,9°С
Теоретическая специфичность	<i>Proteus mirabilis</i> , <i>Proteus vulgaris RelE gene</i>
Длина амплифицируемого участка (п.о.)	215

Таблица 72. Характеристика праймеров к участкам гена *toxin RelE* генома фагов, активных в отношении *Enterobacter spp.*

Параметр-	Характеристика
участок гена <i>toxin RelE</i>	
Прямой праймер (f) 5'-3'	TCATTCGTTTCGCTTGCCAGA
Обратный праймер (r) 5'-3'	GCAAAGCTGCGTGGGATAAA
Расчетная температура плавления прямого праймера	59.0°С
Расчетная температура плавления обратного праймера	59.0°С
Теоретическая специфичность	<i>Enterobacter sp. plasmid pENTE01 toxin RelE gene</i>
Длина амплифицируемого участка (п.о.)	160

5.5 ОЦЕНКА БЕЗОПАСНОСТИ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ВСПОМОГАТЕЛЬНОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ КОКТЕЙЛЯ ОРИГИНАЛЬНЫХ, ВИРУЛЕНТНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ, АКТИВНЫХ В ОТНОШЕНИИ БАКТЕРИЙ-МИШЕНЕЙ, ВЫЗЫВАЮЩИХ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКУЮ ПОРЧУ ОХЛАЖДЕННОЙ РЫБЫ

Исследование острой токсичности коктейля бактериофагов

Проявление острого токсического действия коктейля бактериофагов оценивали согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты)» [25] у 10 здоровых белых мышей обоего пола массой 19–21 г после однократного внутрибрюшинного введения им 1 мл коктейля бактериофагов в течение 7 сут (таблица 73). Контрольные животные получали 0,9% раствор натрия хлорида по той же схеме.

На основе полученных данных можно говорить о том, что однократное введение максимально возможной дозы коктейля бактериофагов для животных не является токсичным.

Хроническая токсичность коктейля бактериофагов

Оценку хронической токсичности коктейля бактериофагов проводили согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». Исследование осуществляли на 10 здоровых белых мышах обоего пола массой 20–21 г. Коктейль бактериофагов вводили животным внутривентрально по 0,5 мл 1 раз в день в течение 14 дней.

Таблица 73. Оценка острой токсичности коктейля бактериофагов на лабораторных животных

Животные	Кол-во, шт.	Способ введения	Доза, мл/животное	Период наблюдения, сут	Индикаторный показатель (гибель)	Снижение веса
Мыши белые	10	в/в	1	7	нет	Не отмечено
Мыши белые (контроль)	3	в/в	1	7	нет	Не отмечено

Мышам из контрольной группы давали по 0,5 мл внутрижелудочно 0,9 % раствора натрия хлорида также в течение 14 дней. У всех животных ежедневно регистрировали массу тела (рисунок 66), наличие клинических симптомов общей интоксикации, а также возможную гибель (таблица 74).

На 15-е и 21-е сутки после введения препарата проводили макроскопическое исследования органов мышей после эвтаназии углекислым газом. Полученные результаты показали, что ежедневное внутрижелудочное введение исследуемого коктейля бактериофагов в течение 14 сут не приводило к гибели животных и не влияло на состояние их здоровья. Поведенческие реакции, внешний вид мышей, а также общий вес мышей в экспериментальной и контрольной группе не отличались. Вскрытие мышей на 1-е и 7-е сутки после окончания введения препарата показало отсутствие видимых изменений в органах брюшной и грудной полости, а также в головном мозге.

Влияние технологического вспомогательного средства на нормальную микрофлору кишечника лабораторных животных.

Влияние технологического вспомогательного средства на бактериальную флору кишечника *in vivo* изучали на модели белых беспородных мышей (19–21 г). Препарат давали *per os* пяти животным в течение 10 суток. Контрольные животные (3 особи) препарат не получали. На начальные (до введения препарата), 4-е, 10-е и 14-е (через 4 дня после последнего введения препарата) сутки эксперимента у контрольных и опытных мышей отбирали фекалии для проведения бактериологического анализа. Состояние бактериальной микрофлоры кишечника животных оценивали по количеству клеток кишечной палочки, энтерококков, энтеробактера аэрогенес, клебсиелл, лактобацилл и бифидобактерий в 1 г фекалий. Суспензии, полученные из гомогенизированных в физиологическом растворе фекалий, титровали и высевали на соответствующие селективные питательные среды. При проведении данного исследования пользовались методикой постановки анализа на микробиоценоз кишечника. Результаты исследования представлены в таблице 75.

Таблица 74. Схема эксперимента по изучению хронической токсичности ТВС на лабораторных животных (мышях).

Тестируемый продукт	Кол-во животных	День эксперимента	Доза введения	Кол-во животных		
				всего	вскрыто	пало
Коктейль фагов	10	15	0,5 мл	5	5	0
		21		5	5	0
Контроль (0,9 % раствор натрия хлорида)	4	15	0,5 мл	2	2	0
		21		2	2	0

Таблица 75. Микрофлора и вес белых беспородных мышей до, во время и после кормления ТВС в течение 10 дней по 0,5 мл в день.

Мыши	Микроорганизмы	До кормления	4-й день	10-й день	14-й день
Опыт (n=5)	Кишечная палочка с нормальными ферментативными свойствами, КОЕ/г	$1,2 \times 10^6 \pm 1,6$	$6,2 \times 10^5 \pm 5,1^{**}$	$8,2 \times 10^5 \pm 4,0$	$6,0 \times 10 \pm 5,4^*$
	Кишечная палочка лактозонегативная, КОЕ/г	$4,0 \times 10^3 \pm 5,4$	$2,2 \times 10^4 \pm 4,3^{**}$	$2,0 \times 10^4 \pm 4,4$	$2,2 \times 10^4 \pm 4,3^*$
	Энтерококки, КОЕ/г	$8,2 \times 10^4 \pm 4,0$	$6,4 \times 10^4 \pm 4,9^{**}$	$1,4 \times 10^6 \pm 1,5$	$1,6 \times 10^5 \pm 1,3^*$
	Бифидобактерии, КОЕ/г	$2,4 \times 10^5 \pm 1,1$	$1,8 \times 10^4 \pm 1,4^{**}$	$2,2 \times 10^3 \pm 1,4$	$2,8 \times 10^4 \pm 1,9^*$
	Лактобациллы, КОЕ/г	$3,8 \times 10^4 \pm 1,6$	$2,2 \times 10^5 \pm 0,8^{**}$	$2,8 \times 10^5 \pm 1,0$	$1,8 \times 10^5 \pm 1,1^*$
	Вес, г	$20,6 \pm 1,1$	$20,8 \pm 1,3^{**}$	$22,2 \pm 0,8$	$22,6 \pm 1,6^*$
Конт-роль (n=3)	Кишечная палочка с нормальными ферментативными свойствами, КОЕ/г	$1,4 \times 10^6 \pm 0,5$	$1,2 \times 10^6 \pm 0,7^{**}$	$1,5 \times 10^6 \pm 0,8$	$2,1 \times 10^6 \pm 1,7^*$
	Кишечная палочка лактозонегативная, КОЕ/г	$2,3 \times 10^3 \pm 1,2$	$2,6 \times 10^4 \pm 1,4^{**}$	$1,3 \times 10^4 \pm 0,8$	$2,6 \times 10^4 \pm 2,1^*$
	Энтерококки, КОЕ/г	$5,3 \times 10^4 \pm 4,2$	$3,6 \times 10^4 \pm 1,7^{**}$	$4,3 \times 10^5 \pm 3,1$	$2,4 \times 10^5 \pm 2,7^*$
	Бифидобактерии, КОЕ/г	$2,1 \times 10^5 \pm 1,5$	$6,8 \times 10^4 \pm 4,1^{**}$	$5,7 \times 10^4 \pm 3,4$	$6,8 \times 10^4 \pm 5,6^*$
	Лактобациллы, КОЕ/г	$2,6 \times 10^4 \pm 0,9$	$2,6 \times 10^5 \pm 1,6^{**}$	$1,8 \times 10^5 \pm 2,1$	$2,0 \times 10^5 \pm 1,7^*$
	Вес, г	$20,3 \pm 1,1$	$20,6 \pm 1,0^{**}$	$21,4 \pm 1,2$	$22,2 \pm 1,4^*$

Примечание: * - $p > 0,05$ относительно контроля; ** $p > 0,05$ относительно 14 дня корм.

Исходя из полученных данных, мы можем сделать вывод о том, что пероральное применение технологического вспомогательного средства в течение 10 сут не влияло на нормальную микрофлору кишечника мышей.

Кроме того, исследуемый продукт не оказывал негативно-го воздействия на физическое состояние мышей: все опытные

и контрольные животные имели здоровый вид и прибавляли в весе на протяжении всего эксперимента.

Таким образом, в качестве действующего вещества технологического вспомогательного средства для деконтаминации изучаемого нами пищевого сырья нами были отобраны 7 производственно перспективных фагов характеризующихся широким суммарным спектром литической активности на сформированном банке бактериальных штаммов (82 %), высоким титром фаговых частиц (не ниже 10^{11} БОЕ/мл) и предельно низким содержанием токсинов в фаголизате при культивировании по собственному модифицированному методу, устойчивых к агрессивным факторам внешней среды (температуре - от -10 до + 75, хлороформу, кислым и щелочным значениям pH от 3,6 до 9,6). Молекулярно-генетические исследования подтвердили вирулентность и оригинальность отобранных штаммов бактериофагов. В рамках доклинических исследований доказана безопасность коктейля бактериофагов в опытах по изучению острой и хронической (подострой) токсичности на лабораторных животных, показано также, что разработанная рецептура не влияет на нормальную микрофлору кишечника мышей.

Получение готовой формы технологического вспомогательного средства (препарат коктейля бактериофагов) и оценка его эффективности в процессе фаг - опосредованного биопроцессинга

Конструирование рецептуры и разработка технологии получения готовой формы технологического вспомогательного средства (ТВС) на основе бактериофагов.

Отработка рецептуры ТВС (бактериофаговый коктейль)

Действующим веществом технологического вспомогательного средства является смесь стерильных фильтратов фаголизатов, активных в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus ssp.*, *Enterobacter ssp.* Содержание видоспецифических активных бактериофагов в готовой форме продукта составляет 10^9 - 10^{11} БОЕ/мл. Концентрация бактериофаго-

вых частиц подобрана на основании данных зарубежной научной литературы и проведенных собственными силами лабораторных испытаний, экономической целесообразности с учетом последующего разведения для осуществления эффективного фаг-опосредованного биопроцессинга пищевых полуфабрикатов. В качестве вспомогательного компонента рецептуры был использован Equilibration Buffer, используемый как для смыва фаговых частиц с матраса, так и для осуществления процесса аффинной хроматографии. В таблице 76 приведена рецептура ТВС.

Технологическое вспомогательное средство фасуют в асептических условиях по 100 мл во флаконы из темной пластмассы с крышками, обеспечивающими контроль первого вскрытия, объемом 100 ± 10 мл по ГОСТ Р 50962-96.

Пилотная технология получения ТВС

Согласно разработанной рецептуре, в процессе получения 10 экспериментально-производственных партий ТВС была отработана пилотная технология производства технологического вспомогательного средства.

Разработанная технология представляет собой следующую цепочку этапов:

1-й этап. Подготовка стартерных культур пары бактериофаг – штамм-хозяин.

Штаммы бактерий, используемые для наработки бактериофагов, лиофилизируют, используя сублимационную сушку CoolSafe110 FreezeDryer. Штаммы бактерий в соотношении 1:1 смешивают с защитной средой (сахароза 20 %, желатин 1 %), разливают во флаконы по 2 мл и высушивают в течение 12 ч при давлении $\leq 0,03$ гПа и при постепенном повышении температуры от -50 до $+20$ °С.

Таблица 76. Рецептура ТВС.

Наименование компонента	Объем, мл
Equilibration Buffer (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 mM CaCl_2 , pH 7.5)	40
Коктейль бактериофагов	60

Фенотипически и молекулярно-генетически охарактеризованные штаммы бактериофагов лиофилизируют по схеме, соответствующей изложенной выше в отношении штаммов бактерий, используя следующую защитную среду: сахара 20 %, желатин 8 %.

2-й этап. Подготовка помещения и оборудования

Перед началом дезинфекции проверяют эффективность вентиляционного оборудования и НЕРА фильтров. Боксированное помещение и ламинар обрабатывают при помощи аламинола. Дезинфекцию оборудования, предназначенного для розлива и укупорки флаконов с ТВС, а также поддонов для флаконов и емкости для крышек, проводят 70 % раствором спирта.

3-й этап. Приготовление материалов

Перед стерилизацией осуществляют мойку стеклянной посуды. Стерилизацию лабораторной посуды осуществляют по следующему режиму: сухожаровой шкаф – 1 ч при 200 °С. Стерилизацию емкостей большого объема и частей перистальтического насоса (силиконовый шланг) проводят в автоклаве под давлением пара 1,2 атмосферы и рабочей температуре 121 °С, время стерилизации – 20 мин. Сухая стерилизация гамма-лучами пластиковых флаконов и крышек производится по контракту по следующей схеме: 18,5 кГр при скорости конвейера 3,0 см/сек.

4-й этап. Питательные среды

Разливают в литровые матрасы и стерилизуют при следующих режимах: под давлением 1,2 атмосферы и рабочей температуре 121 °С.

5-й этап. Подготовка фаголизатов бактериофагов

Фаголизаты бактериофагов получали способом, запатентованным в РФ (патент №2525141). 4,5 мл 18-часовой бактериальной культуры штамма-хозяина в титре 10^9 КОЕ/мл засевают в матрац для культивирования – скошенная плотная питательная среда толщиной слоя от 10 мм до 25 мм, культивируют в течение 3–3,5 ч при оптимальной температуре для роста культуры штамма-хозяина, затем на полученный газон культуры штамма-хозяина засевают маточный бактериофаг в титре 10^6 – 10^7 БОЕ/мл, герметично закрывают сосуд для культивирования. Культивируют в

течение 4–5 ч при оптимальной температуре для роста культуры штамма бактериофага и толщине слоя воздуха над поверхностью плотной питательной среды от 25 мм до 40 мм, получают фаголизат при суспендировании бактериофага с поверхности плотной питательной среды физиологическим раствором или буферным раствором с рН 7,0–7,2 в количестве 9–10 мл, отсасывают фаголизат в стерильную емкость, добавляют хлороформ в количестве 1:10, выдерживают в течение 30 мин при непрерывном шуттелировании, центрифугируют в течение 30 мин при 5000 об./мин, отбирают надосадочную жидкость в стерильные пробирки и проверяют титр по Грациа. Полученные отдельно бактериофаги в титре не менее 10^{11} БОЕ/мл смешивают в стерильной емкости, в равных объемах.

6-й этап. Стерилизация фаголизата

Полученный коктейль фаголизатов фильтруют через мембранный фильтр 0,22 мкм.

7-й этап. Освобождение от эндотоксина

Стерильный коктейль фильтратов фаголизатов очищают методом аффинной хроматографии от эндотоксинов на колонке EndoTrapHD (Hyglos, Germany) согласно инструкции производителя.

8-й этап. Сведение компонентов технологического вспомогательного средства

Коктейль стерильных фильтратов фаголизатов с учетом конечного титра бактериофагов доводят до объема 100 мл, с помощью уравновешенного буфера (Hyglos) в стерильном флаконе.

9-й этап. Розлив

Асептический розлив и укупорка во флаконы по 100 мл с крышкой, содержащей контроль первого вскрытия.

10-й этап. Маркировка

Маркировка в соответствии с включает следующие сведения о продукте: наименование, указание «не для розничной продажи», наименование и местонахождение изготовителя, объем, дату изготовления и дату упаковывания, срок годности и условия хранения, номер партии.

Критические контрольные точки на этапах создания технологического вспомогательного средства:

1. Контроль микробиологической чистоты флаконов и крышек для розлива. 5 флаконов из партии отбирают в боксе из двойного пакета. Заливают 10 мл стерильного МПБ (можно использовать LB-бульон, тиогликолевую среду). Флаконы закрывают, тщательно встряхивают, ставят в термостат при 37 °С и 25 °С на 48 ч. Затем, из каждого флакона, делают высеv 0,1 мл на чашки с плотными питательными средами (кровяной агар, Сабуро) методом spot-теста. Инкубируют при 37 °С 1 сутки на кровяном агаре и при 25 °С – 3 суток на среде Сабуро. После инкубации контролируют наличие или отсутствие роста на чашках. Стерильным пинцетом выбирают 5 крышек из партии, замачивают в емкости с 250 мл стерильной жидкой питательной среды (МПБ, LB-бульон, тиогликолевая среда). Емкость закрывают, ставят в термостат при 37 °С и 25 °С на 48 ч, после чего повторяют методику высева и учета результатов в соответствии с процедурой, приведенной для флаконов.

2. Контроль специфической активности фаголизатов. Специфическую активность фаголизатов оценивали по методу Грациа (таблица 77).

3. Контроль фаголизата на аномальную токсичность. Объем 1 мл фаголизата вводили внутривбрюшинно 5 здоровым мышам обоего пола. После введения фаголизата наблюдали за животным в течение 7 суток. Технологическое вспомогательное средство считается прошедшим испытание, если в течение предусмотренного срока наблюдения не погибнет ни одно из подопытных животных.

4. Микробиологическая чистота фаголизата

Контролируемые по каждой партии продукта микробиологические показатели приведенные в ТР ТС 029/2012 и ТР ТС 021/2011 указаны в таблице 78.

5. Определение эндотоксина в готовом продукте

Определение уровня эндотоксина после рабочего разведения ТВС (до титра каждого бактериофага 10^9 БОЕ/мл) определяли

Таблица 77. Контроль специфической активности фаголизатов.

Бактериофаг	Средний титр по 10 экспериментально производственным партиям, БОЕ/мл	Контрольные значения титра, БОЕ/мл
Ah 1	$3,7 \times 10^{12} \pm 1,1$	Не менее 10^{11}
УГСХА-Р.а. №4	$5,6 \times 10^{12} \pm 1,7$	Не менее 10^{11}
Ars25- УГСХА	$4,5 \times 10^{12} \pm 1,2$	Не менее 10^{11}
FPr - 13 УГСХА	$8,3 \times 10^{12} \pm 1,1$	Не менее 10^{11}
E4	$4,2 \times 10^{12} \pm 0,7$	Не менее 10^{11}
Lm1	$2,4 \times 10^{12} \pm 1,3$	Не менее 10^{11}
Ye3-f2	$3,6 \times 10^{12} \pm 1,1$	Не менее 10^{11}

Таблица 78. Контроль микробиологической чистоты фаголизата.

Показатели	Результаты	Требования ТР ТС 029/2012 к ферментным ТВС
КМАФАнМ, КОЕ/мл, не более	0	5×10^{-4}
БГКП в 0,1 мл	Не обнаружено	Не допускается
Сальмонеллы в 25 мл	Не обнаружено	Не допускается
<i>E. coli</i> в 25 мл	Не обнаружено	Не допускается
Сальмонеллы в 25 мл	Не обнаружено	Не допускается
<i>Listeria monocytogenes</i> в 25 мл	Не обнаружено	Не допускается
КМАФАнМ, по «рыбная продукция охлажденная», КОЕ/г	0 КОЕ/мл	1×10^5
БГКП в 0,001 г	Не обнаружено	Не допускается
<i>S. aureus</i> в 0,1 г	Не обнаружено	Не допускается
<i>V. parahaemolyticus</i> , КОЕ/г, не более	Не обнаружено	100
Сульфитредуцирующие клостридии, не допускаются в массе продукта, г	Не обнаружено	0,01

Таблица 79. Стабильность специфической литической активности бактериофагов (по Грация) при нормативном хранении ТВС.

Бактериофаг	Титр бактериофагов БОЕ/мл			
	1 мес.	3 мес.	6 мес.	9 мес.
A.h. 1	$3,7 \times 10^{12} \pm 1,1$	$3,5 \times 10^{12} \pm 0,9$	$3,3 \times 10^{12} \pm 0,8$	$3,0 \times 10^{12} \pm 0,6$
УГСХА-Р.а. №4	$5,6 \times 10^{12} \pm 1,7$	$5,4 \times 10^{12} \pm 1,2$	$5,2 \times 10^{12} \pm 1,3$	$4,0 \times 10^{12} \pm 1,6$
Ars25- УГСХА	$4,5 \times 10^{12} \pm 1,2$	$4,2 \times 10^{12} \pm 1,1$	$4,0 \times 10^{12} \pm 0,9$	$3,8 \times 10^{12} \pm 1,1$
FPr - 13 УГСХА	$8,3 \times 10^{12} \pm 1,1$	$8,0 \times 10^{12} \pm 0,9$	$7,8 \times 10^{12} \pm 0,7$	$7,6 \times 10^{12} \pm 1,2$
E4	$4,2 \times 10^{12} \pm 0,7$	$4,1 \times 10^{12} \pm 0,5$	$3,8 \times 10^{12} \pm 0,3$	$3,6 \times 10^{12} \pm 0,6$
Lm1	$2,4 \times 10^{12} \pm 1,3$	$2,1 \times 10^{12} \pm 1,2$	$1,7 \times 10^{12} \pm 1,1$	$1,5 \times 10^{12} \pm 0,9$
Ye3-f2	$3,6 \times 10^{12} \pm 1,1$	$3,3 \times 10^{12} \pm 0,9$	$3,0 \times 10^{12} \pm 0,8$	$2,8 \times 10^{12} \pm 1,2$

с помощью реакции гелирования лизата амебоцитов крови мечехвоста *Limulus polyphemus* (ЛАЛТест). Предельные значения уровня эндотоксина составляло не более 50 ЕЭ/мл.

Определение срока годности технологического вспомогательного средства на основе коктейля бактериофагов

Необходимым этапом при конструировании рецептуры и разработке технологии получения вспомогательного технологического средства является определение срока годности готовой формы, при котором качество продукции удовлетворяет установленному в Технических условиях (ТУ 9197-0001-1966727-2017). Для этого образцы из 6 партий продукции хранили в течение 9 мес при температуре 4 ± 2 °С, периодически отбирая для контроля согласно «Государственной фармакопеи РФ XIII ОФС 1.1.0004.15». В таблице 79 представлены данные по изучению стабильности специфической литической активности бактериофагов в разные сроки с момента выпуска продукции.

Параметры микробиологической чистоты ТВС 10 экспериментально производственных серий соответствовали контрольным значениям приведенным в таблице 78.

Результаты проведенной работы свидетельствуют о том, что в процессе хранения готового продукта при температуре 4 ± 2 °С активность всех бактериофагов не опускалась ниже нормативных значений в течение 6 месяцев + 50 % установленного в ТУ срока годности (содержание БОЕ в 1 мл продукта 10^{11-12}).

5.6 ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТВС НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ ДЕКОНТАМИНАЦИИ ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ

Разработка технологического вспомогательного средства (ТВС) на основе фагов для деконтаминационной обработки мясных, молочных и рыбных полуфабрикатов. В рамках программы научных исследований утвержденной МСХ РФ на 2017 г. нами разработаны 7 средств фаг-опосредованного биопроцессинга для деконтаминации и продления срока годности мясного фарша и рыбы.

Мясной фарш

Для обеззараживания сырых колбас в натуральной оболочке на основе измельченной мякоти свинины (т.н. купат) создано и прошло апробацию в лабораторных условиях на базе НИИЦ-МиБ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ вспомогательное технологическое средство, содержащее коктейль бактериофагов, состав которого описан ниже.

Коктейль бактериофагов, включавший 7 штаммов фагов *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, которые использовали для обработки искусственно контаминированного купатного фарша бактериями *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* в массе 5,0 кг, где 3,3 кг – это мясо и 1,7 литров – вода со специями), что составляло половину приготовленной для лабораторных исследований партии. Вторая половина партии перемешивалась со специями без добавления бактериофагов и далее упаковывалась в натуральную оболочку отдельно от опытной партии. 14,0 мл фагового коктейля вносилось в 1,7 л воды. Финальная концентрация фагов в 1,7 л составляла:

Ah 1 (*Aeromonas hydrophila*) $3,0 \cdot 10^8$ БОЕ/мл,

УГСХА-Р.а. №4 (*Pseudomonas aeruginosa*) $3,0 \cdot 10^8$ БОЕ/мл,

Ars25- УГСХА (*Aeromonas salmonicida*) $4,0 \cdot 10^9$ БОЕ/мл,

FPr - 13 УГСХА (*Proteus spp.*) $3,0 \cdot 10^8$ БОЕ/мл,
 E4 (*Enterobacter spp.*) $1,3 \cdot 10^7$ БОЕ/мл,
 Lm1 (*Listeria monocytogenes*) $1,9 \cdot 10^7$ БОЕ/мл,
 Ye3-f2 (*Yersinia enterocolitica*) $1,3 \cdot 10^7$ БОЕ/мл.

Коктейль бактериофагов вместе с водой вносили в смеситель и перемешивали в течение 10 минут со специями и 3,3 кг мясного фарша, состоявшего из сырого мяса (свинина), жира и лука. После перемешивания обработанный фарш упаковывали в натуральную оболочку (кишки) в виде колбас. В процессе производства нами были отобраны следующие образцы:

I – купата, не обработанная бактериофагом (из контрольной партии);

II – купата, обработанная бактериофагом (из опытной партии).

Все образцы анализировались по следующим параметрам:

1. наличие бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*,
2. общее микробное число (ОМЧ),
3. в образце II определяли в динамике титр каждого из бактериофагов.

Первое исследование проводилось через 6 часов после изготовления купат и далее каждые сутки в течение 7 дней, образцы хранились в холодильнике при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$. В таблице 80 и на рисунке 67 приведены значения титра каждого из фагов, содержащиеся в образце II.

Таблица 80. Значения титра каждого из фагов, содержащихся в образце II

Фаги	6 часов	2 сутки	3 сутки	4 сутки	5 сутки	6 сутки	7 сутки
Ah 1	$3,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$5,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$
УГСХА-Р.а. №4	$3,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^9$	$6,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^5$	$2,0 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$
Ars25- УГСХА	$4,0 \times 10^9$	$1,0 \times 10^5$	$3,0 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$
FPr - 13 УГСХА	$3,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	$8,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4$
E4	$1,3 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$0,5 \times 10^7$	$0,3 \times 10^7$	$2,6 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
Lm1	$1,9 \times 10^7$	$1,8 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	$2,5 \times 10^7$
Ye3-f2	$1,3 \times 10^7$	$0,9 \times 10^7$	$4,5 \times 10^6$	$8,2 \times 10^4$	$7,1 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$

В таблице 81 приведенной ниже представлены показатели, характеризующие контаминацию опытных и контрольных образцов купат.

Проведенный эксперимент показал, что *Listeria monocytogenes* и *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* в 25 г исходных образцов обнаружено не было. Согласно СанПиН 2.3.2.1078-01 (и ТР ТС 021/2011) ОМЧ (КМАФАнМ) не должно превышать в 1 г купат 10^6 КОЕ. Общее микробное число в начальных образцах было порядка 10^7 КОЕ/г. По мере нахождения образцов в холодильнике количество ОМЧ увеличивалось. На 7 сутки хранения их количество достигло 1×10^{12} КОЕ/г, однако во II образце, который обрабатывали бактериофагами, ОМЧ было меньше в 5 раз, чем в I образце (контроль без фагов).

Начиная с 5 суток в купатах без фагов появился характерный запах протухшего мяса и зеленоватое потемнение фарша, в то время как в обработанном образце присутствия подобного запаха не было выявлено и органолетически купаты выглядели более свежими даже после 7 суток хранения в холодильнике (рисунок 68-69).

Рыба

В лабораторных условиях НИИЦМиБ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ с целью биоконсервации потрошенных тушек свежельовленного карпа было использовано ТВС на основе коктейля бактериофагов, активных в отношении *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, являющихся по нашим данным микроорганизмами, вызывающими порчу.

Коктейль бактериофагов объемом 85 мл разводили в 10 литрах воды. Финальный титр бактериофагов в 10 л получался следующий: Ah 1 (*Aeromonas hydrophila*) $3,0 \cdot 10^8$ БОЕ/мл, УГС-ХА-Р.а. №4 (*Pseudomonas aeruginosa*) $3,0 \cdot 10^8$ БОЕ/мл, Ars25- УГ-СХА (*Aeromonas salmonicida*) $4,0 \cdot 10^9$ БОЕ/мл, FPr - 13 УГСХА (*Proteus spp.*) $3,0 \cdot 10^8$ БОЕ/мл, E4 (*Enterobacter spp.*) $1,3 \cdot 10^7$ БОЕ/

мл, Lm1 (*Listeria monocytogenes*) $1,9 \cdot 10^7$ БОЕ/мл, Ye3-f2 (*Yersinia enterocolitica*) $1,3 \cdot 10^7$ БОЕ/мл.

Нами, путем погружения на 30 секунд в емкость с 10 литрами воды, содержащей бактериофаги в титре представленном выше, была обработана потрошенная рыба в количестве 21 штуки массой 600-800 г. Общий вес обработанной рыбы составил 12,6-16,8 кг. Ниже в таблице 83 приведены данные по контаминации рыбы до постановки эксперимента. Образцы охлажденной рыбы мас-

Таблица 81. Показатели, характеризующие контаминацию опытных и контрольных образцов купат.

Параметр	До обработки		1 сутки		2 сутки		3 сутки		4 сутки		5 сутки		6 сутки		7 сутки	
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
Listeria, КОЕ/25 г	нет	нет	нет	нет			нет	нет			нет	нет				
Pseudomonas aeruginosa	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено
Aeromonas hydrophila	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено
Aeromonas salmonicida	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено	$1 \cdot 10^2$	Роста не обнаружено

Продолжение таблицы 81

Органолептические свойства	ОМЧ, КОЕ/г	Enterobacter spp	Proteus spp.	Yersinia enterocolitica	Параметр	
					I	II
Свежее мясо	2·10 ⁷	1·10 ²	1·10 ²	1·10 ²	До обработки	
	1,4·10 ⁷	1·10 ²	1·10 ²	1·10 ²		
Свежее мясо		1·10 ²	1·10 ²	1·10 ²	1 сутки	
		1·10 ²	1·10 ²	1·10 ²		
Свежее мясо	6,4·10 ⁸	1·10 ²	1·10 ²	1·10 ²	2 сутки	
	1,8·10 ⁷	Роста не обнаружено	Роста не обнаружено	Роста не обнаружено		
Свежее мясо	≈10 ⁹	1·10 ²	1·10 ²	1·10 ²	3 сутки	
	≈10 ⁹	Роста не обнаружено	Роста не обнаружено	Роста не обнаружено		
Свежее мясо	4,3 ·10 ¹⁰	1·10 ²	1·10 ²	1·10 ²	4 сутки	
	2,2 ·10 ¹⁰	Роста не обнаружено	Роста не обнаружено	Роста не обнаружено		
Запах протухшего мяса		1·10 ²	1·10 ²	1·10 ²	5 сутки	
		Роста не обнаружено	Роста не обнаружено	Роста не обнаружено		
Запах протухшего мяса		1·10 ²	1·10 ²	1·10 ²	6 сутки	
		Роста не обнаружено	Роста не обнаружено	Роста не обнаружено		
Запах протухшего мяса, зеленоватый оттенок	5 ·10 ¹²	1·10 ²	1·10 ²	1·10 ²	7 сутки	
	1,0·10 ¹²	Роста не обнаружено	Роста не обнаружено	Роста не обнаружено		

сой 1 г отобранные из контрольной и опытной (обработанной бактериофагом) групп 17.09.2017 и доставленные в НИИЦМиБ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ 17.09.2017. Транспортировка образцов осуществлялась при температуре от + 2 до +4°С.

За фоновую (или исходную) контаминацию образцов охлажденной рыбы можно принять значения, полученные в контрольной группе. Результаты в опытной группе отражают действие бактериофагов через 24 часа после деконтаминации (таблица 84-85). Дальнейшие исследования, проведенные в соответствии с планом эксперимента представлены в таблице 67. Результаты микробиологического исследования на 18-е сутки опытных образцов, совпадают с 12-ми сутками контрольных образцов, что свидетельствует о задержке порчи продукции на 6 суток. Однако, продолжение эксперимента не имело смысла из-за выхода микробиологических и органолептических показателей за пределы порогового значения установленного в СанПиНе и ТР ТС 021/2011 (КМАФАнМ не выше 10^5 КОЕ/г).

Оценка эффективности литического действия бактериофагов на поверхности охлажденной рыбы в лабораторных условиях

В ходе отработки метода деконтаминации охлажденной рыбы в лабораторных условиях мы использовали для сравнения между собой следующие способы: 1) с погружением контаминированных образцов в фаголизат; 2) с капельным нанесением фаголизата на контаминированную поверхность по схеме оценки эффективности дезинфекционных средств. Стерилизованные 70% спиртом, а затем отмытые в стерильном физиологическом растворе контрольные и опытные образцы в 5 повторностях приобретенной в торговой сети охлажденной рыбы (куски, содержащие мышечные волокна с весом $5 \pm 0,5$ г) были искусственно контаминированы при комнатной температуре в течение часа, путем погружения в 5 мл суспензии *L. monocytogenes*, содержащей 10^6 КОЕ/мл. После чего опытные образцы погружали на сутки в стерильные емкости с 5 мл стерильного фильтрата ли-стериозного фаголизата Lm 1 с титром 10^9 БОЕ/мл. Контрольные куски рыбы помещали в контейнеры, на сутки, с 0,9 % раство-

Таблица 83. Данные контроля микробной контаминации рыбы до начала эксперимента.

Контроль 1	Контроль 2	Контроль 3
30 КОЕ/г	30 КОЕ/г	140 КОЕ/г
66,7 КОЕ/г		

Таблица 84. Данные соответствующие суточному хранению рыбы с применением ТВС.

Опыт 1	Опыт 2	Опыт 3
0 КОЕ/г	0 КОЕ/г	10 КОЕ/г
3,3 КОЕ/г		

Таблица 85. Результаты экспериментов по деконтаминации рыбы.

Первые сутки (опыт) и фоновые значения контаминации (контроль) рыбы		
17.09.2017	Титр, КОЕ/г	Органолептические свойства
Опыт 1	0	Запах свежей рыбы
Опыт 2	0	Запах свежей рыбы
Опыт 3	10	Запах свежей рыбы
Среднее значение	3,3	
Контроль 1	30	Запах свежей рыбы
Контроль 2	30	Запах свежей рыбы
Контроль 3	140	Запах свежей рыбы
Среднее значение	66,7	
Высев бактерий из рыбы на 10-е сутки:		
27.09.2017	Титр, КОЕ/г	Органолептические свойства
Опыт 1	$2 \cdot 10^2$	Запах свежей рыбы
Опыт 2	$5 \cdot 10^3$	Запах свежей рыбы
Опыт 3	$2 \cdot 10^3$	Запах свежей рыбы
Среднее значение	$2,4 \cdot 10^2$	
Контроль 1	$9 \cdot 10^3$	Запах свежей рыбы
Контроль 2	$4,0 \cdot 10^4$	Запах свежей рыбы
Контроль 3	$2,1 \cdot 10^4$	Запах свежей рыбы
Среднее значение	$2,3 \cdot 10^4$	
Высев бактерий из рыбы на 12-е сутки:		
29.09.2017	Титр, КОЕ/г	Органолептические свойства
Опыт 1 (1 проба)	10^4	Запах свежей рыбы
Опыт 2 (1 проба)	10^4	Запах свежей рыбы
Опыт 3 (1 проба)	10^3	Запах свежей рыбы
Высев бактерий из рыбы на 12-е сутки:		
Опыт 1 (2 проба)	10^4	Запах свежей рыбы
Опыт 2 (2 проба)	10^4	Запах свежей рыбы
Опыт 3 (2 проба)	10^4	Запах свежей рыбы
Среднее значение	$8,5 \cdot 10^3$	
Контроль 1	10^7	Запах свежей рыбы Некондиционный продукт (согласно приложению №2 п. 1.2 КМАФАнМ больше нормы)

Продолжение таблицы 85

Контроль 2	1,6*10 ⁵	Запах свежей рыбы Некондиционный продукт (согласно приложению №2 п. 1.2 КМАФАнМ больше нормы)
Контроль 3	2,1*10 ⁵	Запах свежей рыбы Некондиционный продукт (согласно приложению №2 п. 1.2 КМАФАнМ больше нормы)
Среднее значение	3,5*10 ⁶	
Высев бактерий из рыбы на 18-е сутки эксперимента		
	Титр, КОЕ/г	Органолептические свойства
Опыт 1	10 ⁷	Некондиционный продукт (согласно приложению №2 ТР ТС 021/2011 п. 1.2 КМАФАнМ больше нормы)
Опыт 2	10 ⁶	Некондиционный продукт (согласно приложению №2 ТР ТС 021/2011 п. 1.2 КМАФАнМ больше нормы)
Опыт 3	10 ⁶	Некондиционный продукт (согласно приложению №2 ТР ТС 021/2011 п. 1.2 КМАФАнМ больше нормы)
Среднее значение	4,0*10 ⁶	

ром натрия хлорида такого же объема. Опытные и контрольные образцы деконтаминировали при температуре 4±2 °С в течение 24 ч. Затем оценивали количество бактериальных клеток на образцах путем посева 0,1 мл суспензии, в которой они хранились, на хромогенном агаре Уриселект 4 (таблица 86).

Уровень листерий в опытной группе относительно контрольной снижался более чем на 99 %, составляя в среднем не более 10 КОЕ/г, в то время как количество бактериальных клеток в контрольных образцах превышало 0,3×10⁴ эффективности бактериофага Lm 1 при обработке исследуемых кусочков (период деконтаминации 24 часа) Ниже приведены примеры деконтаминации образцов охлажденно исследуемого субстрата различными фаголизатами, входящими в состав ТВС по способу 1 (при этом время контаминации, деконтаминации и хранение обработанных образцов варьировалось). Стерилизованные в 70% спирте, а затем отмытые в стерильном физиологическом растворе образцы рыбы (куски, содержащие мышечные волокна, весом 5±0,5 г) искусственно заражали в стерильной емкости 5 мл суспензии, содержащей 10⁶ КОЕ/мл *Aeromonas salmonicida* в течение 15 мин при комнатной температуре. После этого опытные и кон-

Таблица 86. Оценка эффективности бактериофага Lm 1 при обработке кусочков охлаждённого пищевого сырья.

Опыт, КОЕ/мл	Контроль, КОЕ/мл
4,6 ± 4,1	0,3 × 10 ⁴ ± 0,1

Примечание: * - $p < 0,01$ по сравнению с контрольными значениями

трольные образцы перемещали в другие стерильные емкости, где опытные образцы деконтаминировали в фаголизате гомологичного фага с титром 10^9 БОЕ/мл в течение 15 мин при комнатной температуре, а контрольные образцы деконтаминировали физиологическим раствором. Затем опытные и контрольные образцы помещались в стерильные емкости с МПБ (опыт 1, 2 и контроль 1, 2) и в стерильные пустые емкости (опыт 3, 4 и контроль 3, 4), после этого образцы оставляли в холодильнике при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$. В образцах, содержащих МПБ, количество бактериальных клеток оценивали путем посева 0,1 мл суспензии на среду Уриселект 4 (BIO-RAD, США) каждые 24 ч на протяжении 7 дней. В емкостях без среды оценивали исключительно изменение органолептических свойств (внешний вид и запах) каждые 24 ч на протяжении 7 дней. В данный эксперимент были дополнительно включены опытные и контрольные образцы нестерилизованных кусков, деконтаминированные в соответствии с вышеприведенной схемой.

Эти пробы обозначены в таблице: опыт и контроль 5 содержались в стерильном МПБ, опыт и контроль 6 в пустой стерильной емкости. Ежедневно в течение 7 дней определяли микробиологическую чистоту у образцов 5 и контролировали органолептические показатели у образцов 6 (таблица 87).

После обработки фаголизатом Pf 1 Ars25- УГСХА в опытных образцах уже на следующие сутки уровень *A. salmonicida* падал до 0 КОЕ/мл и не обнаруживался на протяжении всего эксперимента, а опытные образцы в стерильных емкостях дольше сохраняли кондиционное состояние.

Ниже приводятся эксперименты по деконтаминации образцов охлажденной рыбы способом 2.

Стерилизованные 70 % спиртом, а затем отмытые в стерильном физиологическом растворе контрольные и опытные образцы приобретенной в торговой сети охлажденной рыбы, нарезанные стерильным ножом, на стерильной доске, кусочками 5×5 см, были искусственно контаминированы: 0,5 мл бактериальной суспензии содержащей не менее 2×10^9 КОЕ/мл: 1 обра-

Таблица 87. Оценка микробиологических и органолептических показателей опытных и контрольных образцов рыбы.

№	Опыт (1 сутки)	Контроль (1 сутки)	Опыт (2 сутки)	Контроль (2 сутки)	Опыт (3 сутки)	Контроль (3 сутки)	Опыт (4 сутки)	Контроль (4 сутки)	Опыт (7 сутки)	Контроль (7 сутки)
1	A. salmonicida роста нет (другая флора 0,3×10 ³ КОЕ/г)	A. salmonicida сплошной рост >106 (другая флора 128 КОЕ/г)	A. salmonicida да роста нет (другая флора 4×10 ² КОЕ/г)	A. salmonicida сплошной рост >106 (другая флора 2×10 ² КОЕ/г)	A. salmonicida нет, сплошной рост	A. salmonicida сплошной рост + вторичный рост	A. salmonicida нет, ОМЧ 1×10 ³ КОЕ/г	ОМЧ 1×10 ⁶ КОЕ/г	A. salmonicida нет, ОМЧ 1×10 ³ КОЕ/г	ОМЧ 1×10 ⁶ КОЕ/г
2	A. salmonicida (другая флора 0,3×10 ³ КОЕ/г)	A. salmonicida сплошной рост >106 (другая флора 130 КОЕ/г)	A. salmonicida да роста нет (другая флора >0,3×10 ³ КОЕ/г)	A. salmonicida сплошной рост >106 (другая флора 0,3×10 ³ КОЕ/г)	A. salmonicida нет, сплошной рост	A. salmonicida сплошной рост + вторичный рост	ОМЧ 1×10 ³ КОЕ/г	ОМЧ 1×10 ⁶ КОЕ/г	ОМЧ 1×10 ³ КОЕ/г	ОМЧ 1×10 ⁶ КОЕ/г
3	Нормального цвета, запах рыбы	Внешне суховат, нормального цвета, запах рыбы	Нормального цвета, запах рыбы	Внешне суховат, запах рыбы	Нормального цвета, запах рыбы	Внешне начал изменяться цвет, суховат, запах рыбы	Нормального цвета, запах рыбы	Внешне суховат, цвет темнеет, запах рыбы	Резкий тухлый запах, цвет нормальный, появляются красные прожилки	Резкий запах брожения, внешне суховат, цвет темнеет
4	Нормального цвета, запах рыбы	Нормального цвета, запах рыбы	Нормального цвета, запах рыбы	Внешне суховат, запах рыбы	Нормального цвета, запах рыбы	Внешне суховат, начал изменяться цвет, запах рыбы	Нормального цвета, запах рыбы	Внешне суховат, цвет темнеет, запах рыбы	Резкий запах брожения, тухлой рыбы	Резкий запах брожения, внешне суховат, цвет темнеет
5	A. salmonicida (другая флора 0,3×10 ³ КОЕ/г)	A. salmonicida (другая флора 4×10 ² КОЕ/г)	A. salmonicida да роста нет (другая флора 0,3×10 ³ КОЕ/г)	A. salmonicida сплошной рост >106 (другая флора >4×10 ² КОЕ/г)	A. salmonicida нет, сплошной рост	A. salmonicida сплошной рост + вторичный рост	A. salmonicida ns нет, ОМЧ 1×10 ³ КОЕ/г	ОМЧ 1×10 ⁶ КОЕ/г	ОМЧ 1×10 ³ КОЕ/г	ОМЧ 1×10 ⁶ КОЕ/г
6	Нормального цвета, запаха нет	Нормального цвета, запаха нет	Внешне суховат, запах нейтрален	Внешне суховат, запах нейтрален	Нормального цвета, запаха нет	Внешне суховат, начал изменяться цвет, запаха нет	Внешне нормального цвета, запаха ихорозный	Внешне суховат, цвет изменяется, запах ихорозный	Внешне ослизнен, цвет темнеет, запах ихорозный	Внешне ослизнен, цвет темнеет, запах ихорозный
7	A. salmonicida (другая флора 0,5×10 ³ КОЕ/г)	A. salmonicida (другая флора 2×10 ² КОЕ/г)	A. salmonicida да роста нет (другая флора 0,8×10 ³ КОЕ/г)	A. salmonicida сплошной рост >106 (другая флора >4×10 ² КОЕ/г)	A. salmonicida нет, сплошной рост	A. salmonicida сплошной рост + вторичный рост	A. salmonicida ns нет, ОМЧ 1×10 ³ КОЕ/г	ОМЧ 1×10 ⁶ КОЕ/г	ОМЧ 1×10 ³ КОЕ/г	ОМЧ 1×10 ⁶ КОЕ/г
8	Нормального цвета, запаха нет	Нормального цвета, запаха нет	Внешне суховат, запах нейтрален	Внешне суховат, запах нейтрален	Нормального цвета, запаха нет	Внешне суховат, начал изменяться цвет, запаха нет	Внешне нормального цвета, запаха ихорозный	Внешне суховат, цвет изменяется, запах ихорозный	Внешне ослизнен, цвет темнеет, запах ихорозный	Внешне ослизнен, цвет темнеет, запах ихорозный

зец - *L. monocytogenes*, 2 образец - *Aeromonas hydrophila*, 3 образец - *Pseudomonas aeruginosa*, 4 образец - *Proteus spp.*, 5 образец - *Enterobacter spp.*, 6 образец - *Yersinia enterocolitica*, 7 образец - *Aeromonas salmonicida*. Бактериальная суспензия наносилась каплей и равномерно распределялась по верхним поверхностям кусков рыбы стеклянным шпателем. Поверхности подсушивали в течение 30 мин, а затем наносили на них при помощи пипетки 1,0 мл стерильного фильтрата фаголизата с титром не ниже 1×10^{11} БОЕ/мл: 1 образец - Lm 1, 2 образец - Ah 1, 3 образец - УГСХА-Р.а. №4, 4 образец - FPr - 13 УГСХА, 5 образец - Е4 и 6 образец - Ye3-f2, 7 образец - Ars25- УГСХА. В данном случае параметр множественности инфицирования соответствовал 100:1. Время обеззараживания составляло 24 ч. Поверхности контрольных образцов были обработаны 0,9 % раствором натрия хлорида. Исследование проводили при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$. Эффективность деконтаминации определяли следующим образом: марлевой салфеткой 5×5 см, смоченной нейтрализатором бактериофагов (экстракт гранатовой кожуры с сульфатом железа), тщательно протирали тест-поверхность опытных образцов, затем эту салфетку погружали в 10 мл того же нейтрализующего раствора, где ее отмывали в течение 5 мин, при постоянном встряхивании. Отмывную жидкость сеяли на 3 чашки по 0,1–0,2 мл в каждую, растирали по поверхности шпателем, затем чашечки помещали в термостат при температуре 28°C для образцов, обработанных *L. monocytogenes*, *A. hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* и 37°C - *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* Учет результатов проводили на следующие сутки путем подсчета количества выросших колоний и процента обеззараживания, принимая в расчет количество колоний, выросших на контрольной поверхности за 100 % (таблица 88).

Уровень бактерий в опытных группах относительно контрольных снижался более чем на 99 %, составляя в среднем не более 30 КОЕ/см², что соответствовало категории эффективных дезинфицирующих средств по [21], в то время как количество

бактериальных клеток в контрольных образцах превышало 10^5 КОЕ/см².

В следующем лабораторном эксперименте мы оценивали эффективность фаг-опосредованного биопроцессинга и стабильность титра бактериофагов входящих в ТВС, на поверхности охлажденной рыбы, после ее деконтаминации. Потрошеного карпа (18 образцов, средний вес 600 ± 50 г, из расчета по 3 рыбы на каждые сутки эксперимента) искусственно контаминировали в суспензии, содержащей следующие виды бактерий: *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* в титре не менее 2×10^9 КОЕ/мл путем погружения в нее тушек на 10 мин. Контаминированную рыбу подсушивали на стерильных лоточках в течение 1 ч для адаптации бактерий на поверхности гидробионтов. Затем проводили фаг-опосредованный биопроцессинг: рыбу погружали на 30 с в стерильный фильтрат коктейля фаголизатов Lm 1, Ah 1, УГСХА-Р.а. №4, FPr - 13 УГСХА, Е4, Ye3-f2, Ars25- УГСХА с титром каждого фага не ниже 1×10^8 БОЕ/мл (MOI = 1:10). Образцы закладывали в пенопластовые коробки со льдом при температуре 4 ± 2 °С. Эффективность деконтаминации на протяжении всего срока хранения проверяли следующим образом: 10 граммовый кусок охлажденной рыбы, отрезанный от каждого образца, гомогенизировали в 90 мл МПБ, после чего 0,1 мл полученной смеси наносили на чашки Петри с МПА. Учет количества перечисленных выше бакте-

Таблица 88. Оценка эффективности действия бактериофагов, входящих в ТВС, после 24 ч деконтаминации кусочков охлажденной рыбы.

Бактерия	L. monocytogenes	A. hydrophila	A. salmonicida	P. aeruginosa	Y. enterocolitica	Proteus spp.	Enterobacter spp.
	15,6 ± 2,3* КОЕ/см ²	8,6 ± 2,7* КОЕ/ см ²	17,6 ± 1,7* КОЕ/см ²	26,6 ± 2,6* КОЕ/ см ²	14,6 ± 4,3* КОЕ/ см ²	7,6 ± 2,4* КОЕ/см ²	6,3 ± 1,3* КОЕ/см ²
Контроль (0,9 % раствор натрия хлорида)	1,5 × 10 ⁵ ± 0,2 КОЕ						

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольными значениями

рий проводили после термостатирования в течение 24 ч, при температуре 28 °С *L. monocytogenes*, *A. hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Yersinia enterocolitica* и 37 °С - *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* Количество бактериофагов на поверхности образцов охлажденной рыбы определяли следующим образом: в суспензии с гомогенизированными кусочками рыбы полученными по методике описанной выше добавляли хлороформ в соотношении 1:10. После этого пробы шуттелировали 30 мин, а затем откручивали на центрифуге со скоростью 5000 об/мин. Надосадочную жидкость отбирали в стерильную пробирку и титровали по методу Грациа клеток на поверхности охлажденной рыбы после 30-секундной обработки коктейлем бактериофагов.

В результате проведенного эксперимента, полная деконтаминация образцов охлажденной рыбы, детектировалась через 24 часа. В этот же период титр каждого из бактериофагов, используемых в ТВС, достигал максимальных значений. Микробиологически подтвержденное исчезновение фаговых частиц с поверхности рыбы происходило через 72 часа от начала эксперимента (через 48 часов после полной элиминации бактерий-мишеней).

Таким образом, технологическое вспомогательное средство наработываемое в соответствие с собственной пилотной технологией стабильно при температуре хранения 4 ± 2 °С в течение 6 месяцев, эффективно на сложной поверхности гидробионтов в отношении очерченного спектра бактерий мишеней (*Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*) при использовании экспериментально подобранного титра бактериофагов не менее 10^8 БОЕ/мл и может быть использовано для деконтаминации охлажденной рыбы на предприятиях рыбоперерабатывающей отрасли.

6

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Микробиологическая безопасность пищи в XXI в. остается ведущей проблемой гигиены питания. Появление новых технологий хранения пищевых полуфабрикатов на холоде, вакуумной упаковки в пленку, минимальной переработки охлажденного сырья, длительной транспортировки, а также несоблюдение правил гигиены работниками сферы общественного питания увеличивают возможность накопления в готовых блюдах возбудителей пищевых инфекций, таких как *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Edwardsiella*, *Listeria*, *Nocardia*, *Shewanella*. Бактериальная контаминация охлажденных продуктов приводит, наряду с другими факторами, вызывающими порчу, к сокращению установленных в нормативной документации сроков годности на данную категорию полуфабрикатов. Применение химических и физических методов консервации в пищевой отрасли не решает эту проблему, снижая уровень экологической чистоты продукции и провоцируя появление новой категории патогенов – штаммов условно-патогенных бактерий, резистентных к антибиотикам [1-4, 57-58, 85-89, 114-119].

В Америке, Канаде и странах Евросоюза с конца 1990-х годов рост числа спорадических случаев и вспышек инфекций, передающихся пищевым путем, послужил поводом для развития нового класса технологических вспомогательных средств, регистрируемых с 2006 г. US FDA (Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) в форме Processing Aid, действующим началом которых являются бактериофаги. Несколько позднее все фагосодержащие продукты, регистрируемые этим ведомством, были отнесены этим ведомством к категории GRAS (Generally Recognised as Safe) – в целом безопасный [140-144].

В Российской Федерации, невзирая на принятое еще в июне 2011 г. Ученым Советом Роспотребнадзора решение о разработке новых средств на основе бактериофагов, активных в отношении пищевых патогенов, с возможностью их дальнейшего использования на перерабатывающих предприятиях, фагосодержащие технологические вспомогательные средства в качестве антимикробных веществ в ТР ТС 029/2012 «Требования безопасности пищевых добавок, ароматизаторов и технологических вспомогательных средств» до сих пор отсутствуют. В связи с этим целью настоящего исследования стало создание безопасного и эффективного средства деконтаминации на основе поливалентного коктейля бактериофагов, активного в отношении бактериальных патогенов, вызывающих как порчу охлажденной пищевой продукции, так и пищевые инфекции у человека [145-148].

Отсутствие в Российской Федерации прецедента по созданию, регистрации и применению технологического вспомогательного средства на основе бактериофагов поставило перед нами проблему по формированию собственного алгоритма его разработки:

- от выделения и селекции вирулентных штаммов бактериофагов,
- отработки технологии получения высокоактивных стерильных очищенных от токсинов фаголизатов, подтверждения их безопасности на молекулярногенетическом уровне и
- до сборки готовой формы фагового коктейля, не токсичного в испытаниях на лабораторных животных и эффективно элиминирующего в лабораторных и промышленных условиях бактерии, вызывающие ускоренную порчу охлажденной пищевой продукции и, инфекции, передающие пищевым путем. Перечисленные этапы создания фагосодержащего продукта для деконтаминации и продления срока годности охлажденной рыбы послужили задачами настоящего исследования.

Анализ литературных данных, собственные исследования по оценке микробиологической чистоты пищевого сырья и продуктов питания, представленной в розничной торговой сети, опре-

делили спектр видов бактерий, которые тестировались нами на возможность вызывать преждевременную порчу охлажденных полуфабрикатов в условиях, соответствующих их нормативному хранению по ТУ.

Мы остановились на следующих 7 видах: *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* Необходимость борьбы с этими видами бактерий не ограничивается только порчей пищевых полуфабрикатов, по данным литературы, употребление в пищу контаминированной данными видами микроорганизмов без соответствующей кулинарной обработки может привести к развитию тяжелых случаев острых кишечных и пищевых токсикоинфекций, заканчивающихся длительной госпитализацией или даже смертью (листериоз).

При исследовании распространения аэромонад в соме было проверено 228 проб филе сома на трех перерабатывающих предприятиях в дельте Миссисипи. *A. hydrophila* и *A. sobria* были найдены в 36% проб, в то время как *A. caviae* обнаружили в 11%. Большинство преобладающих видов были способны к α-гемолизу эритроцитов бараньей крови. При исследовании возможности заражения сома от оборудования в ходе обработки на двух предприятиях в избытке были обнаружены *Aeromonas* и *Pseudomonas spp.* [31]. При детальном изучении причин типичной порчи рыбы при исследовании стерильного мясного сока брюшных мышц рыбы, было установлено, что микробные контаминанты принадлежали к родам *Pseudomonas* и *Acinetobacter-Moraxella*, а не к коринеформам, микрококкам или флавобактериям. При характеристике контаминантов относительно их способности использовать некоторые вещества было выяснено, что большинство из них было неспособно разжижать желатин или разлагать яичный альбумин. Предполагается, что дальнейшая микробная порча рыбы во многом схожа с порчей говядины при общем отсутствии полного протеолиза. Введение чистой культуры из трески в толщу мышц пикши не привело к размягчению ткани.

Липиды, содержащиеся в рыбе (особенно в сельди, макрели, лососе и др.), подвергаются прогорканию в ходе микробной порчи. Необходимо отметить, что кожа рыбы богата коллагеном. Чешуя большинства рыб состоит из склеропротеинов, принадлежащих кератиновой группе, и является той частью рыбы, которая удаляется в последнюю очередь. При исследовании микрофлоры кожи четырех различных рыб были обнаружены следующие микроорганизмы: *Pseudomonas-Aeromonas* – 32-60%, *Moraxella-Acinetobacter* – 18-37% [31].

Исследование куриных тушек в Аргентине показало, что 7 из 70 содержали *Yersinia spp.*, включая *Y. enterocolitica* выделенные *Y. enterocolitica* принадлежали к биогруппе 1А, серотипу 0:5 и фаготипу Х2. Изменения в составе кишечных бактерий на различных этапах холодильной обработки птицы были исследованы в работе Сох и др., которые обнаружили, что число микроорганизмов на тушке до охлаждения составляло $\log_{10} 3,17$ КОЕ/см² для АПК и $\log_{10} 2,27$ КОЕ/см² - для *Enterobacteriaceae*. После охлаждения количество последних снижалось больше чем количество АПК. Вначале 85% кишечных бактерий было представлено *E. coli*, но после 10 дней хранения при 4 °С их число уменьшалось до 14%, тогда как число *Enterobacter spp.* увеличивалось с 6 до 88% за это же время.

Из 32800 пакетов сосисок, исследованных FDA в США, в 532 (1,6 %) случаях обнаружена *L. monocytogenes*, причем приблизительно 90 % составляли серотипы 1/2а [96]. В обширном исследовании мяса для ланча в отношении *L. monocytogenes* в штатах Мэриленд и Калифорния этот микроорганизм был найден в 82 случаях из 9199, или 0,89 %.

Большое количество родов бактерий являются причиной закисаний ветчины, среди них - *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Proteus*, *Micrococcus* и *Clostridium*.

В свиной печени, хранившейся при 5 °С в течение 7 дней, доминировали *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, молочные стрептококки и *B. thermosphacta*. В 5 образцах говяжьей печени, хранившихся при 2 °С в течение 14 дней, *Pseudomonas* составля-

ли от 7 до 100 % всех бактерий порчи, а значение pH снижалось с 6,49 до 5,93.

В исследовании порчи бараньей печени Gill и DeLase установлено, что поверхностная биота порчи преимущественно представлена *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Enterobacter*; в соке целой печени выявляли *Pseudomonas* и *Enterobacter*, тогда как *Enterobacter* и лактобактерии доминировали в глубине тканей. В этой работе было показано, что начальный уровень pH упал с 6,4 до 5,7 в образцах, обработанных антибиотиками, что доказывает, что гликолитические процессы в печени могут приводить к уменьшению значения pH в отсутствие организмов, хотя эти образцы на самом деле содержали $<10^4$ микроорганизмов на см². Высокий уровень глюкозы был достаточным для того, чтобы колонии бактерий смогли вырасти до размера, различимого визуально, прежде чем появлялся запах, что может объяснить доминирование не молочно- кислых бактерий в микробиоте порчи.

Штаммы отобранных выше бактерий, прошедшие проверку на отсутствие умеренных бактериофагов, интегрированных в клетку, с помощью тестов с митомицином С и УФО легли в основу банка культур-хозяев для изолирования из окружающей среды бактериофагов. Общее количество бактериальных штаммов составило 211 шт.

Из различных объектов санитарно-эпидемиологического надзора (образцов сточных вод, почвы, воды из водоема, используемого для разведения рыбы и т.д.) было выделено 36 фагов, активных в отношении штаммов *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*

На следующем этапе нами были исследованы биологические свойства фагов-кандидатов:

- определяли спектр литической активности бактериофагов на сформированном банке бактериальных штаммов,
- проверяли их устойчивость к агрессивным факторам внешней среды,

- оценивали урожайность на жидких и плотных питательных средах,
- определяли морфологическую структуру бактериофагов и их возможное таксономическое положение с помощью электронной микроскопии нативных фаговых частиц,
- изучали параметры инфекционного процесса в системе фаг-клеткахозяин (время адсорбции, латентный период и выход фаговых частиц из одной бактериальной клетки).

По результатам проведенных экспериментов было отобрано 7 производственно-перспективных фагов: Lm 1, Ah 1, УГСХА-Р.а. №4, FPr - 13 УГСХА, Е4, Ye3-f2, Ars25- УГСХА, характеризующихся широким суммарным спектром литической активности на сформированном банке бактериальных штаммов – 82 %, титром фаговых частиц в фаголизате не ниже 10^{11} БОЕ/мл, устойчивых к хлороформу и температурным скачкам в пределах от -10 до +75 °С.

Далее бактериофаги, отобранные на основании их биологических свойств, подвергались молекулярно-генетическому и биоинформатическому анализу для исключения из состава будущего фагосодержащего технологического вспомогательного средства умеренных и содержащих в своем ДНК нежелательные гены фагов.

Для получения полногеномных последовательностей ДНК бактериофагов использовали высокопроизводительное секвенирование второго поколения Ion Torrent Sequencing. Данные каждого раунда секвенирования были проанализированы методами биоинформатического анализа. Собранные полногеномные последовательности сравнивали с известными ДНК бактериофагов, депонированных в базе данных GenBank NCBI, а потенциальные продукты генов анализировались при помощи программного обеспечения РНАСТS, позволяющего предсказать тип жизненного цикла бактериофага (умеренный или вирулентный). В результате проведенных экспериментов в геномах выделенных и селектированных бактериофагов, перспективных

в отношении обработки пищевых продуктов, локусов патогенности выявлено не было.

Таким образом, в качестве действующих веществ в готовую форму технологического вспомогательного средства объемом 100 мл были включены фаголизаты 7 перечисленных выше бактериофагов в титре не ниже 10^{10} БОЕ/мл каждого, вспомогательным компонентом продукта выбран уравнивающий буферследующего состава – 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 mM CaCl_2 , pH 7,5, обеспечивающий как техническую возможность очистки коктейля бактериофагов от бактериальных токсинов методом аффинной хроматографии на колонке EndoTrap HD (Hyglos, Germany), так и стабильность титра фаговых частиц при хранении в течение 6 месяцев при температуре от 2 до 8 °C.

Качество готовой формы технологического вспомогательного средства обеспечивалось разработанной пилотной технологией его получения, включавшей несколько стадий: от подготовки исходного сырья и материалов через наработку лиофилизированного посевного материала стартерных культур пары фагхозяин, получения отдельных фаголизатов, их сведения в коктейль и последующей стерилизующей фильтрации и очистки полуфабриката от токсинов до фасовки готовой формы во флаконы и укупорки в промаркированную потребительскую тару. Контрольные мероприятия, в том числе оценка микробиологической чистоты и специфической активности фагосодержащего продукта, осуществлялись на каждой из основных технологических стадий. Необходимо отметить отработку модифицированного способа получения высокоактивного фаголизата на плотной питательной среде, существенно сокращающего длительность этого технологического этапа относительно описанного в патенте на изобретение РФ №2525141, на 14 ч.

При проверке стабильности основного показателя качества разработанного технологического вспомогательного средства – его специфической антибактериальной активности, при температуре хранения от 2 до 8 °C в течение 6 месяцев титр фаговых частиц по Грация на штаммах-хозяевах падал не более чем на 1%.

На следующем этапе исследования нами была проведена оценка безопасности технологического вспомогательного средства в опытах по изучению острой и хронической (подострой) токсичности на лабораторных животных. В результате проведенных экспериментов было показано, что при однократном введении максимальной дозы исследуемого фагосодержащего продукта признаков интоксикации у мышей не наблюдалось. Поведенческие реакции, внешний вид и привес мышей в экспериментальной и контрольной группах при длительном пероральном приеме технологического вспомогательного средства также не отличались. Для исключения вероятности возникновения побочных эффектов по влиянию бактериофагов на нормальную микрофлору кишечника *in vivo* (на модели беспородных белых мышей) дополнительно определяли изменение количества основных представителей микробиоценоза толстого кишечника на фоне 10-дневного внутрижелудочного введения фагового коктейля. Разработанная рецептура не влияет на нормальную микрофлору кишечника мышей.

Эффективность разработанного состава исходно оценивали по уровню его бактерицидного действия в модельных экспериментах на искусственно обсемененных микроорганизмами фрагментах охлажденной пищевой продукции. Образцы, стерилизованные 70 % спиртом, контаминировали суспензиями, содержащими штаммы *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* в различных сочетаниях (использовали как моно-, так и микстконтаминацию) в титре от 10^6 до 10^9 КОЕ/мл, а затем обрабатывали бактериофагом (или гомологичным заражающим культурам коктейлем бактериофагов) с титром от 10^9 до 10^{11} БОЕ/мл и проводили постоянный микробиологический мониторинг загрязненных поверхностей. Элиминация 99 % микроорганизмов с поверхности образцов подтверждалась при условии множественности инфицирования фаг-бактерия-хозяин не менее 100:1 (100 фаговых частиц на 1 бактерию или, например, *L. monocytogenes* 10^6 КОЕ/мл – бакте-

риофаг Lm 1 10^9 БОЕ/мл) и времени деконтаминации не менее 2 ч, при этом температурный режим мог варьировать от 2 до 25 °С.

Таким образом, в процессе исследования определены виды бактериальной микрофлоры пищевого сырья, вносящие существенный вклад в ускорение порчи охлажденной рыбы, выделены бактериофаги, обладающие широким спектром литической активности в отношении обозначенных бактерий-мишеней и являющиеся основным действующим веществом безопасного и эффективного технологического вспомогательного средства, применение которого на сложной поверхности пищевого полуфабриката в экспериментально подобранном нами титре.

Элиминация *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* с поверхности полуфабрикатов методом фаг-опосредованного биопроцессинга снижает риск возникновения спорадических случаев и вспышек инфекций, передающихся пищевым путем.

Постоянный рост количества пищевых инфекций и отравлений в детских коллективах, воинских частях, на предприятиях общественного питания демонстрирует удручающую картину сохранения здоровья населения РФ. Используемые в настоящее время физические и химические методы деконтаминации пищевого сырья и продуктов питания приводят к понижению качества самих продуктов и безопасности их использования. Необходима разработка новых щадящих методов обработки сырья и продуктов питания населения.

Сохранение здоровья потребителей продуктов питания животного происхождения – это одна из целей с/х производства. Увеличение сроков хранения, связанных с порчей пищевого сырья микробной этиологии тем самым профилактика пищевых отравлений. Предлагаемые методы биопроцессинга решают обе эти социальные задачи.

Обработка пищевого сырья животного происхождения бактериофагами будет обходиться производителю в разы дешевле, так как нет необходимости в приобретении консервантов хи-

мического происхождения и дорогостоящего оборудования для физической деконтаминации. Обработка бактериофагами увеличивает сроки хранения скоропортящихся продуктов питания и пищевого сырья (мясного и рыбного) на 7 дней.

Прогнозируемый экономический эффект от применения бактериофагового биопрепарата составляет 2,5 рубля на 1 рубль.

ВЫВОДЫ

- выделены из разных источников, селекционированы, изучены и отобраны бактериофаги, активные в отношении бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*);

- сконструирован биопрепарат – ТВС - на основе бактериофагов Lm 1, Ah 1, УГСХА-Р.а. №4, FPr - 13 УГСХА, Е4, Ye3-f2, Ars25- УГСХА, селекционированных по основным биологическим свойствам (литической активности, спектру литического действия, специфичности, по изменению литической активности при хранении, урожайности фагов) признакам;

- для промышленного получения фаговых биопрепаратов разработана технология, позволяющая получать фаголизаты с высокими титрами литической активности - не менее 10^{11} БОЕ/мл, гарантированно ее сохраняющим без существенных изменений в течение 6 мес. при температуре 2–8 °С;

- референтным центрам ветеринарии и сельскохозяйственным пищевым производствам и перерабатывающим предприятиям предложены новые высокоэффективные фаговые биопрепараты *Listeria monocytogenes* - Lm 1, *Pseudomonas aeruginosa* - УГСХА-Р.а. №4, *Aeromonas hydrophila* - Ah 1, *Aeromonas salmonicida* - Ars25- УГСХА, *Yersinia enterocolitica* - Ye3-f2, *Proteus spp.* - FPr - 13 УГСХА, *Enterobacter spp.* - Е4 для опосредованного биопроцессинга (обработки бактериофагами пищевого сырья и готовой продукции, способствующей увеличению сроков хранения), позволяющие элиминировать (разрушать) патогенные микроорганизмы с поверхности рыбного и мясного сырья и готовой продукции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Разработанное технологическое вспомогательное средство на основе коктейля бактериофагов, может быть рекомендовано перерабатывающим предприятиям, для фаг-опосредованного биопроцессинга мясных полуфабрикатов и гидробионтов, на этапе перед упаковыванием продукции в транспортные коробки, с целью продления сроков годности продукции и снижения риска возникновения инфекций, передаваемых пищевым путем.

1. Разработана «Временная инструкция по изготовлению и контролю лабораторной серии бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus ssp.*, *Enterobacter ssp.*»

2. Составлен «Лабораторный регламент производства консорциума бактериофагов *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus ssp.*, *Enterobacter ssp.*»

3. Предложены для практического применения «Методические рекомендации по применению бактериофагов для опосредованного биопроцессинга, позволяющего элиминировать патогенные микроорганизмы с поверхности рыбного и мясного сырья и готовой продукции.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Впервые в РФ разработка предлагаемого метода биопроцессинга, основанного на сконструированном участниками проекта биопрепарате на основе фагов. Он позволяет использовать не химические, не физические методы деконтаминации микрофлоры пищевых продуктов, а биологический метод, который относительно недавно начал применяться в мировой практике в биопроцессинге. Это требует продолжения исследований по адаптации технического вспомогательного средства (бактериофаги) к технологии промышленного производства предлагаемых препаратов и адаптации методик применения предлагаемых биопрепаратов в зависимости от структуры пищевого сырья и продуктов питания.

Продолжить осуществления мониторинга за микрофлорой мясных полуфабрикатов и охлажденной рыбы для расширения музея бактерий-мишеней и бактериофагов-кандидатов с целью своевременного внесения изменений в штаммовый состав коктейля бактериофагов, обеспечивающий поддержания его эффективности.

Продолжить исследования по применению сконструированного ТВС на основе фагов *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus ssp.*, *Enterobacter ssp.* в условиях производства – мясо- и рыбоперерабатывающих предприятиях регионов Российской Федерации.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АТСС	– американская коллекция типовых культур
БОЕ/г	– бляшкообразующих единиц в грамме продукта
ГДР	– Германская Демократическая Республика
ГНЦ	– Государственный научный центр
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
КОЕ/г	– колониеобразующих единиц в грамме продукта
ВСЭ	– ветеринарно-санитарная экспертиза
ЕНЕС	– налидиксово-устойчивая энтерогеморрагическая кишечная палочка O157:H7 RM4407
МЕ	– Международная единица мутности
Мкм	– микрометр
МЛУ	– множественная лекарственная устойчивость
МОИ	– множественность инфицирования
МПА	– мясо-пептонный агар
МПБ	– мясо-пептонный бульон
НИИЦМиБ	– Научно-исследовательский инновационный центр микробиологии и биотехнологии
НИР	– научно-исследовательская работа
НПО	– научно-производственное объединение
ОКИ	– острые кишечные инфекции
ОМЧ	– общее микробное число
П.о.	– пар-оснований
ПЦР	– полимеразно-цепная реакция
рРНК	– рибосомные рибонуклеиновые кислоты
США	– Соединенные Штаты Америки
ТВС	– техническое вспомогательное средство
УФО	– ультрафиолетовое облучение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Абдуллаева, А. М. Микробиологическая обсеменность полуфабрикатов из мяса птицы / А. М. Абдуллаева, А. Д. Колесникова, Т. А. Першина // Фундаментальные и прикладные научные исследования: сборник статей по материалам международной научно-практической конференции. - 2017. - С. 23-29.
2. Алешкин, А. В. Биодеконтаминация и продление сроков годности мясных и рыбных полуфабрикатов с помощью бактериофагов / А. В. Алешкин, Э. Р. Зулькарнеев, Ю. В. Ларина // Астраханский медицинский журнал, г. Астрахань. – 2015. - № 4. т. 10. – С. 40-48.
3. Алешкин, А. В. Возможности применения бактериофагов в качестве пробиотических средств деконтаминации в области питания / А. В. Алешкин, М.В. Зейгарник // Вопросы диетологии. – 2012. – Т. 2. - № 4. – С. 24 – 34.
4. Алешкин, А. В. Бактериофаги как пробиотики и средства деконтаминации пищевых продуктов / А. В. Алешкин, Н. В. Воложанцев, Э. А. Светоч, В. А. Алешкин, С. С. Афанасьев, А. И. Борзилов, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, А. В. Караулов, Х. М. Галимзянов, Ю. Ф. Космачев, И. А. Киселева, М. С. Афанасьев, Е. О. Рубальский, М. О. Рубальский // Астраханский мед. журнал. – 2012. – № 3 (7), – С. 31-39.
5. Артемов, Р. В. Обоснование и разработка технологии охлаждения рыбы в льдо-водо-солевой системе: автореф. дис. ... канд. тех. наук: 05.18.04 / Артемов Роман Викторович. – Москва, 2011. – С. 7-9.
6. Байгулина, Ф. А., Способы выделения бактериофагов: патент 2109055 / Ф. А. Байгулина, Н. Л. Киняпина, А. Г. Исрафилов // Вирусология. - 1998. - № 12. - С. 115.
7. Бактериофаги зооантропонозных и фитопатогенных бактерий / под ред. Д. А. Васильева и С. Н. Золотухина. – Ульяновск, 2017. – 176 с.
8. Бакулов, И. А. Листерии и листериоз. // И. А. Бакулов, Д. А. Васильев, Д. В. Колбасов. Ульяновск: УГСХА, 2008. – 167 с.
9. Белова, К. В. Разработка фагового препарата *Bacillus coagulans* и область его практического применения / К. В. Белова // В сборнике:

Молодежный инновационный форум. Сборник аннотаций проектов.
- 2016. - с. 303-307.

10. Божко, М. Г. Лецитіназна активність мікробів, здатних до роїння (на прикладі бактерій роду *Proteus*) / М. Г. Божко // Ветеринарна медицина. - 2012. - № 96. - С. 97-99.
11. Васильев, Д. А. Учебно-методическое пособие по методам общей бактериологии/Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, Н. М. Никишина. - Ульяновск, 1998. – 151 с.
12. Васильев, Д. А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Enterobacter*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения / Д. А. Васильев, Е. Н. Пожарникова, С. Н. // Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными, экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных Международная научно-практическая конференция, посвященная 50-летию ВНИИВВиМ. – Покров, 2008. - С. 228-230.
13. Васильев, Д. А. Выделение бактериофагов бактерий *Pseudomonas putida* и их селекция в целях создания биопрепарата для диагностики псевдомоноза рыб / Д. А. Васильев, Д. А. Викторов, И. И. Богданов // Естественные и технические науки. - 2011. - №2(52). - С. 79-82.
14. Васильев, Д. А. Детекция *Aeromonas hydrophila* в пищевой продукции из гидробионтов с применением биосенсоров на основе гомологичных бактериофагов / Д. А. Васильев, Д. А. Викторов, И. Р. Насибуллин, С. Н. Золотухин, А. А. Нафеев, И. Г. Горшков, Н. Г. Куклина, Н. Г. Барт // Фундаментальные исследования. - 2014. - № 5-1. - С. 50-54.
15. Васильев, Д. А. Изучение основных биологических свойств бактериофагов *Aeromonas hydrophilia* / Д. А. Васильев, А. В. Алёшкин, С. Н. Золотухин, Н. А. Феоктистова, К. В. Мартынова, И. Р. Насибуллин, П. С. Майоров, Е. В. Сульдина, А. В. Мاستиленко, А. Г. Шестаков, И. Г. Швиденко, И. Л. Обухов // Естественные и технические науки. – 2018. - № 1.
16. Васильев, Д. А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофага *Aeromonas salmonicida* / Д. А. Васильев, А. В. Алёшкин, С. Н. Золотухин, Н. А. Феоктистова, Н. Г. Куклина,

- П. С. Майоров, Е. В. Сульдина, К. В. Мартынова // Естественные и технические науки. – 2018. - № 1.
17. Васильев, Д. А. Конструирование экспериментального биопрепарата на основе бактериофага Ars25-УГСХА // Д. А. Васильев, А. В. Алёшкин, С. Н. Золотухин, Н. А. Феоктистова, Н. Г. Кукулина, П. С. Майоров, Е. В. Сульдина, К. В. Мартынова // Естественные и технические науки. – 2018. - № 1.
 18. Васильев, Д. А. Разработка фагового биопрепарата *Aeromonas hydrophila* для деконтаминации рыбного, мясного сырья и готовых продуктов питания из них / Д. А. Васильев, А. В. Алёшкин, С. Н. Золотухин, Н. А. Феоктистова, К. В. Мартынова, И. Р. Насибуллин, П. С. Майоров, Е. В. Сульдина, А. В. Мاستиленко, А. Г. Шестаков, И. Г. Швиденко, И. Л. Обухов // Естественные и технические науки. – 2018. - № 1.
 19. Васильев, Д. А. Антология научно - методических материалов по изучению бактериофагов / Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин. - Ульяновск, УГСХА, 2017. – 201 с.
 20. Викторов, Д. А. Разработка системы тестов для выделения и идентификации *Pseudomonas putida* / Д. А. Викторов, И. И. Богданов, А. Г. Шестаков, Д. А. Васильев // В сборнике: Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2009. - С. 21-25.
 21. Викторов, Д. А. Усовершенствование методов выделения, идентификации и индикации бактерий *Pseudomonas putida*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.02.03; 03.01.06/Викторов Денис Александрович. – Саратов, 2011. – 22 с.
 22. Викторов, Д. А. Применение реакции нарастания титра фага для индикации патогенных псевдомонад / Д. А. Викторов, Д. А. Васильев // Актуальные проблемы инфекционной патологии в ветеринарной медицине: Материалы II-ой конференции молодых ученых, Покров, 16-17 мая 2012. – С. 108-111.
 23. Габрилович, И. М. Общая характеристика бактериофагов / И. М. Габрилович // Основы бактериофагии. Минск, 1973. С. 5 – 24.
 24. Габрилович, И. М. Биологические свойства бактериофагов *Serratia marcescens* / И. М. Габрилович // ЖМЭИ. – 1992. – № 6. – С. 10–12.

25. Ганюшкин, В. Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В. Я. Ганюшкин. – Ульяновск: УГСХА, 1988. – С. 42–45.
26. Гаврюсева, Т. В. Патогены гидробионтов Камчатки/Т. В. Гаврюсева, Н. В. Сергеев, Е. А. Устименко//Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого Океана. – 2012. - № 25. – С. 190-211.
27. Ганюшкин, В. Я. Бактериофаги сальмонелл и их применение в ветеринарии / В. Я. Ганюшкин. - Ульяновск, 1988. - С. 45.
28. Гольдфарб, Д. М. Бактериофагия // Д. М. Гольдфарб. – М.: Медгиз, 1961. – С. 169–187.
29. Горшков И. Г. Перспективы применения бактериофагов для индикации патогенных бактерий рода *Aeromonas* / И. Г. Горшков, Н. Г. Кукина, Д. А. Викторов, И. Р. Насибуллин, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2013. - С. 5-7.
30. ГОСТ 7702.2.7 - 2013. Мясо птицы, субпродукты и полуфабрикаты из мяса птицы. Методы выявления бактерий рода *Proteus*. Poultry meat, edible offal and poultry meat ready-to-cook. Methods for detection of *Proteus* bacteria. - М.: ФГУП «СТАНДАРТИНФОРМ», 2014. – 8 с.
31. ГОСТ 28560-90 Продукты пищевые. Метод выявления бактерий родов *Proteus*, *Morganella*, *Providencia*. Food products. Method for detection of bacteria of *Proteus*, *Morganella*, *Providencia* genera. - Сб. ГОСТов. - М.: Стандартиформ, 2010. – 11 с.
32. Джей, Дж.М. Современная пищевая микробиология / Дж. М. Джей, М. Дж. Лесснер, Д. А. Гольден. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 886 с.
33. Долганова, Н. В Микробиология рыбы и рыбных продуктов / Н. В. Долганова, Е. В. Першина, З.К. Хасанова // Санкт-Петербург: Лань. – 2012. – 286 с.
34. Ефименкова, Д. А. Эффективные способы продления сроков хранения охлажденной форели / Д. А. Ефименкова, В. Г. Урбан // Иппология и ветеринария - 2011. - № 2. – С. 115-118.

35. Ефимочкина, Н. Р., Новые бактериальные патогены в пищевых продуктах: экспериментальное обоснование и разработка системы контроля с применением методов микробиологического и молекулярно-генетического анализа: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 14.02.01 / Ефимочкина Наталья Рамозановна. – Москва, 2010. – С.3-4.
36. Золотухин, Сергей Николаевич. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дисс. ...докт. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / С. Н. Золотухин. – Ульяновск, 2007. - С. 3-5.
37. Золотухин, Сергей Николаевич. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: дисс. ...докт. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / С. Н. Золотухин. – Ульяновск, 2007. – 341с.
38. Каттер, Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; науч. ред. А. В. Летаров; [пер. с англ. Е. Е. Куликов и др.]. - Москва: Научный мир, 2012. - 636 с.
39. Киселева, И.А. Специализированный продукт диетического профилактического питания на основе коктейля бактериофагов: конструирование, технология производства, оценка безопасности и эффективности применения: дисс. ...канд. биол.наук: 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии) 03.02.03 – микробиология / Киселева Ирина Анатольевна. – Москва, 2015. – 202 с.
40. Киселева, Т. Ф. Изменение качества охлажденной рыбы в процессе хранения / Т. Ф. Киселева, Е. Н. Неверов, И. В. Мозжерина // Ползуновский вестник – 2011. - №3/2. – С. 197-201.
41. Контарева, В. Ю. Изучение влияния функциональных кисломолочных продуктов на *Proteus mirabilis* / В. Ю. Контарева, В. В. Крючкова, Т. С. Савицкая // Сборники конференций НИЦ Социосфера. - 2016. - № 56. - С. 418-421.
42. Коритняк, Б. М. Сравнительное изучение различных методов выделения фагов возбудителя кишечного иерсиниоза / Б. М. Коритняк, С. Н. Золотухин, Д. А. Васильев // Материалы Всероссийской научно-производственной конференции «Инновационные технологии в аграрном образовании, науке и АПК России» 60-летию академии посвящается. – Ульяновск, Ульяновская государственная академия, 2003. - С. 231-233.

43. Коритняк, Б. М. Эпидемиология кишечного иерсиниоза / Б. М. Коритняк, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. - 2004. - № 12. - С. 60-63.
44. Коритняк, Б. М. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов *Yersinia enterocolitica* и их применение в диагностике: автореф. дис. ...канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Коритняк Богдан Михайлович. – Саратов, 2005. – С.12.
45. Куклина, Н. Г. Изучение культуральных свойств бактерии вида *Aeromonas salmonicida* / Н. Г. Куклина, И. Г. Горшков, Д. А. Виктор, Д. А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы V Международной научно-практической конференции.- Ульяновск, 2013. - С. 81-83.
46. Куклина, Н. Г. Конструирование питательных сред для выделения и индикации бактерий рода *Aeromonas* / Н. Г. Куклина, И. Г. Горшков, Д. А. Виктор, Д. А. Васильев // Вестник ветеринарии. - 2013. - № 1 (64). - С. 75-77.
47. Куклина, Н. Г. Использование реакции нарастания титра фага для индикации бактерии *Aeromonas salmonicida* в объектах водной среды / Н. Г. Куклина, А. А. Нафеев, Д. А. Васильев // Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии: материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов, 2017. – С. 160-161.
48. Лабинская, А. С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологического исследования/А. С. Лабинская, Л. П. Блинкова, Л. П. Ещина.- М.: «Медицина», 2004. – С. 23-26.
49. Лаженцева, Л. Ю. Влияние протеолитически активных бактерий на качество сырья из морских объектов // Техника и технология пищевых производств. – 2012. – Т. 1. – № 24. – С. 52-55.
50. Лурия, С. Общая вирусология / С. Лурия, Д. Дарнелл. – М., Мир, 1970. - С.36-47.
51. Мауль, О. Г. Проблема выделения сальмонелл из продуктов, обсемененных бактериями рода *Proteus* / О. Г. Мауль, О. Е Чугунова, Н. А. Татарникова // Пермский аграрный вестник.- 2016. - № 1(13). - С. 60-63.

52. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 томах. / [В. В. Алексеев и др.]: под ред. А. И. Карпищенко. – 3-е изд... перераб и доп. – Т.2 – М.: ГОЭТАР-Медиа, 2013.- 792с. - С. 422-423.
53. Методические указания по применению унифицированных микробиологических (бактериологических) методов исследования в клиникодиагностических лабораториях. Приложение № 1 к приказу МЗ СССР. – М.: Министерство здравоохранения СССР, 22.04.1985. – № 535. – 22 с.
54. Методы лабораторных исследований и испытаний медико- профилактических дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. - 615 с.
55. Мирошников, К. А. Молекулярно-биологические и генетические принципы селекции терапевтических бактериофагов бактерий родов *Pseudomonas* и *Staphylococcus* / К. А. Мирошников, Е. Е. Куликов, О. С. Дарбеева, К. А. Лыско, Г. М. Игнатьев // Прикладная биохимия и микробиология. - 2014. - Т. 50. - № 3. - С. 338.
56. Мухин, Е.Б. Разработка фагосодержащего биопрепарата / Е. Б. Мухин, Т. Т. Минибаев, Д. Р. Шапирова, А. Р. Зиятдинова, В. О. Семенова, Ю. Б. Васильева, Д. А. Васильев // Молодежь и наука XXI века: материалы Международной научной конференции. – Ульяновск, 2017. – С. 3-6.
57. Насибуллин, И. Р. Выделение фагов бактерий *Aeromonas hydrophila* и изучение их биологических свойств / И. Р. Насибуллин, Д. А. Викторов, Д. А. Васильев, А. А. Нафеев, И. Г. Швиденко // Вестник ветеринарии. Издательство: Энтропос. - Ставрополь, 2013. - С. 8.
58. Натидзе, Л. Бактериофаги в ветеринарии: реальность и перспективы / Л. Натидзе, С. Ригвава, М. Натидзе, Л. Гваладзе, Н. Пиранишвили // Перспективы использования препаратов бактериофага для превенции и лечения инфекций, вызванных патогенными и условно-патогенными микроорганизмами: материалы международного семинара. – Тбилиси, 2005. – С.15.
59. Паршуков, А. Н. Микробиоценоз радужной форели в садковых хозяйствах северной Карелии / А. Н. Паршуков, Н. А. Сидорова // Уче-

- ные записки петрозаводского государственного университета. Серия: естественные и технические науки. - 2014. - Т. 1. - № 8. - С. 28-33.
60. Подволоцкая, А. Б. Современные аспекты санитарной обработки и дезинфекции производственной среды мясоперерабатывающих предприятий / А. Б. Подволоцкая, Е. С. Фищенко, О. М. Сон, М. А. Наумчик, Л. А. Балабанова // Хранение и переработка сельхозсырья. - 2016. - № 12. - С. 28-30.
61. Пожарникова, Е. Н. Фагоиндикация бактерий рода *Enterobacter* / Е. Н. Пожарникова, С. Н. Золотухин, Д. А. Васильев // Роль молодых ученых в реализации национального проекта «РАЗВИТИЕ АПК»: материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2007. - С. 296-298.
62. Поздеев, О. К. Энтеробактерии: руководство для врачей / О. К. Поздеев, Р. В. Федоров. – М.: ГЭОТАР «Медиа», 2007. – С.238.
63. Разработка бактериофаговых биопрепаратов для деконтаминации (уничтожения) микрофлоры, вызывающей порчу рыбного и мясного сырья и готовой продукции/ под ред. Д. А. Васильева и С. Н. Золотухина. – Ульяновск, 2017. – 210 с.
64. Ревенко, И. П. Бактериофаги и их использование в ветеринарной практике / И. П. Ревенко. - Киев: Урожай, 1978. - С. 88.
65. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А. Н. Миронова - М.: Гриф и К, 2013. - 536 с.
66. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриева - М.: Медицина, 2005. - 832 с.
67. Сидоров, М. А. Определитель зоопатогенных микроорганизмов: справочник / М. А. Сидоров. – М.: Колос, 1995. – С.104–112.
68. Сульдина, Е. В. Количественное определение патогенных листерий в пищевом сырье и продуктах питания / Е. В. Сульдина, Д. А. Васильев // Инновации в пищевой технологии, биотехнологии и химии: материалы Международной научно-практической конференции. – Саратов, 2017. - С. 202-204.

69. Сульдина, Е. В. Бактериофаги бактерий *Enterobacter* и их основные биологические характеристики / Е. В. Сульдина, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, И. И. Богданов // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2017. - № 4 (40). - С. 94-98.
70. Сятчихина, Е. Н. Критерии отбора бактериальных штаммов и бактериофагов для формирования производственной коллекции, специфически лизирующих бактерии родов: *Klebsiella*, *Echerichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* / Е. Н. Сятчихина, П. А. Набатников, С. А. Коровкин, А. В. Катлинский, Г. М. Игнатъев // Биопрепараты. Профилактика. Диагностика. Лечение. – 2016. – Т. 16. - № 2 (58). – С. 90-95.
71. Угрозов, В. В. Изменение физико-химических показателей охлажденной рыбы в процессе хранения в гелеобразном льду / В. В. Угрозов, И. А. Громов // Пищевая промышленность. – 2010. – № 6. – С. 52-53.
72. Феоктистова, Н. А. Биологические особенности бактерий рода *Proteus* и их роль в патологии животных // Региональные проблемы народного хозяйства: Матер. Всерос. науч.- практ. конф. молодых ученых, 8-9 апреля 2004 г. – Ульяновск, 2004. – Ч. 1 – С. 329-336.
73. Феоктистова, Н. А. Выделение фагов бактерий рода *Proteus* из объектов внешней среды / Н. А. Феоктистова, А. С. Мелехин, С. Н. Золотухин, Д. А. Васильев // Современное развитие АПК: региональный опыт, проблемы, перспективы Материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Ульяновск, 2005. - С. 173-175.
74. Феоктистова, Н. А. Изучение некоторых биологических свойств выделенных фагов бактерий рода *Proteus* / Н. А. Феоктистова, А. С. Мелехин, С. Н. Золотухин, Д. А. Васильев // Современное развитие АПК: региональный опыт, проблемы, перспективы Материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Ульяновск, 2005. - С. 176-179.
75. Феоктистова, Н. А. Поиск бактериофагов бактерий рода *Proteus* и селекция клонов фагов / Н. А. Феоктистова, С. Н. Золотухин, Д. А. Васильев, А. В. Тарасова // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. 2006. - № 1 (2). - С. 51-53.
76. Феоктистова, Н. А. Разработка схемы исследования материала с целью выделения и ускоренной идентификации бактерий рода *Proteus*

- / Н. А. Феоктистова Н. А. // Аграрная наука и образование в реализации национального проекта «Развитие АПК» : материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Ульяновск, 2006. - С. 342-345.
77. Феоктистова, Н. А. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов рода *Proteus*, конструирование на их основе биопрепарата и разработка параметров практического применения: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.07, 03.00.23 / Феоктистова Наталья Александровна. – Саратов, 2006. – 166 с.
78. Феоктистова, Н. А. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерии рода *Proteus* / Н. А. Феоктистова / Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. - Ульяновск, 2013. – 315 с.
79. Феоктистова, Н. А. Протейные бактериофаги: изучение некоторых биологических свойств / Н. А. Феоктистова, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии». - 2017. - № 4 (40). – С. 75-81.
80. Феоктистова, Н. А. Биологические особенности протейных бактериофагов / Н. А. Феоктистова, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, Е. В. Сульдина, А. В. Мاستиленко, П. С. Майоров, К. В. Мартынова, Н. И. Молофеева, И. Л. Обухов, Б. И. Шморгун, И. Г. Швиденко // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 6; URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=27200> - дата обращения: 24.11.2017.
81. Феоктистова, Н. А. Конструирование биопрепарата на основе бактериофагов *Enterobacter* / Н. А. Феоктистова, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин, Е. В. Сульдина, А. В. Мاستиленко, П. С. Майоров, К. В. Мартынова, Н. И. Молофеева, И. Л. Обухов, Б. И. Шморгун, И. Г. Швиденко // Естественные и технические науки. – 2018. - № 1. –
82. Чугунова, Е. О. Изучение свойств протейных бактериофагов / Е. О. Чугунова, Н. А. Татарникова // Научно-практический журнал Пермский аграрный вестник. - 2016. - № 3 (15). - С. 108-113.
83. Шевелева, С. А. Обоснование микробиологических показателей безопасности для новых видов пищевой продукции / С. А. Шевелева, Н. Р. Ефимочкина, И. Б. Быкова, С. Ю. Батищева // Вопросы питания. - 2014. - Т. 83. - № S3. - С. 162.

84. Шестаков, А. Г. Схема выделения и идентификации бактерий *Pseudomonas aeruginosa* / А. Г. Шестаков, И. И. Богданов, Д. А. Васильев // Естественные и технические науки. – 2009. – №6 (44). – С. 118-120.
85. Шестаков, А. Г. Результаты разработки схемы выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa* / А. Г. Шестаков, И. И. Богданов, Д. А. Васильев // Аграрная наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения: материалы Международной научно-практической конференции. – Ульяновск, 2009. – С. 120-123.
86. Шестаков, А. Г. Выделение и изучение основных биологических свойств бактериофагов бактерии вида *Pseudomonas aeruginosa* / Шестаков А. Г., Богданов И. И. // Бактериофаги микроорганизмов значимых для животных, растений и человека. - Ульяновск, 2013. С. 262-273.
87. Abbas, M. S. Isolation of bacteria from fish // Int. J. Adv. Res. – 2014. – V. 2. – P. 274-279.
88. Alikhan, N.F. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons [Электронный ресурс] / N.F. Alikhan, N.K. Petty, N.L. Ben Zakour, S.A. Beatson // BMC Genomics. – 2011. – V. 12. – doi: 10.1186/1471-216412-402. – URL: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/12/402> - дата обращения 12.01.2017.
89. Ashiru, A. W. Isolation and antibiotic profile of *Aeromonas* species from Tilapia fish (*Tilapia nilotica*) and Catfish (*Clarias betrachus*) / A.W. Ashiru, P.O. Uaboi-Egbeni, J.E. Oguntowo, C.N. Idika //Pakistan Journal of Nutrition. – 2011. – V. 10. – № 10. – P. 982-986
90. Austin, B. The bacterial microflora of fish, revised / B. Austin // The Scientific World Journal. – 2006. – V. 6. – P. 931-945.
91. Basti, A.A. Bacteria pathogens in fresh, smoked, and salted Iranian fish / A.A. Basti, A. Misaghi, T.Z. Salehi, A. Kamkar // Food Control. – 2006. – №17. – P. 183-188.
92. Bergey's manual of determinative bacteriology / Bergey's. - 9th ed. - Baltimore: Williams and Wilkins Co., 1993. - p. 1258.
93. Berkel, B.M. Preservation of Fish and Meat / B.M. Berkel, B.V. Boogaard, C. Heijnen // Agromisa Foundation – 2004. - P. 78-80.

94. Bigot, B. Control of *Listeria monocytogenes* growth in a ready-to-eat poultry product using a bacteriophage / B. Bigot, W.-J. Lee, L. McIntyre, T. Wilson, J.A. Hudson, C. Billington, J.A. Heinemann // *Food microbiology*. – 2011. – V. 28. – № 8. – P. 1448-1452.
95. Bradeeba, K. Antibiotic susceptibility of selected pathogenic bacteria isolated from raw meat sample obtained from Chidambaram, Tamil Nadu / K. Bradeeba, P. K. Sivakumaar // *J. Chem. Pharm. Res.* – 2013. - № 5(1). – P. 64-6
96. Buller, N.B. *Bacteria from Fish and Other Aquatic Animals A Practical Identification Manual* / N.B. Buller. - CABI Publishing, 2004. – 390 p.
97. Carpentier, B. Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises / B. Carpentier, O. Cerf // *International journal of food microbiology*. – 2011. – V. 145. – № 1. – P. 1-8.
98. Chopra, A. K. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis / A.K. Chopra, C. W. Houston // *Microbes and Infection*. – 1999. – V. 1. – № 13. – P. 11291137.
99. Collins, B. The ABC transporter AnrAB contributes to the innate resistance of *Listeria monocytogenes* to nisin, bacitracin, and various β -lactam antibiotics / B. Collins, N. Curtis, P.D. Cotter, C. Hill, R.P. Ross // *Antimicrobial agents and chemotherapy*. – 2010. – V. 54. – № 10. – P. 4416-4423.
100. Dalgaard, P. Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) - effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage / P. Dalgaard, H.L. Madsen, N. Samieian, J. Emborg // *Journal of Applied Microbiology*. – 2006. – V. 101. – № 1. – P. 80-95.
101. Davies, A. R. Incidence of foodborne pathogens on European fish / A.R. Davies, , C. Capellb, D. Jehannoc, G.J.E. Nychasd, R.M. Kirbyb // *Food control*. – 2001. – V. 12. – № 2. – P. 67-71.
102. Davies, E. A. Resistance of *Listeria monocytogenes* to the bacteriocin nisin / E.A. Davies, M.R. Adams // *International journal of food microbiology*. – 1994. – V. 21. – № 4. – P. 341-347.
103. Di Bonaventura, G. Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food - contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity / G. Di Bonaventura, R.

- Piccolomini, D. Paludi, V. D'Orio, A. Vergara, M. Conter, A. Ianieri // Journal of applied microbiology. – 2008. – V. 104. – № 6. – P. 1552-1561.
104. Di Ciccio, P. *Listeria monocytogenes*: biofilms in food processing / P. Di Ciccio, M. Conter, E. Zanardi, S. Ghidini, A. Vergara, D. Paludi, A.R. Festino, A. Ianieri // Italian Journal of Food Science. – 2012. – V. 24. – № 3. – P. 203-213
105. Disson, O. Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes* / O. Disson, M. Lecuit // Virulence. – 2012. – V. 3. – № 2. – P. 213-221.
106. Department of Justice Canada / Food and Drug Act. – 2009. – Режим доступа: <http://laws.justice.gc.ca/en/showtdm/cr/C.R.C.-c.870>
107. Doganay, M. Listeriosis: clinical presentation // FEMS Immunology & Medical Microbiology. – 2003. – V. 35. – № 3. – P. 173-175.
108. Doores, S. Organic acids // Food science and technology-New York-Marcel Dekker – 2005. – T. 145. – C. 91.
109. Endersen, L. Phage therapy in the food industry / L. Endersen, J. O'Mahony, C. Hill, R.P. Ross, O. McAuliffe, A. Coffey // Annual review of food science and technology. – 2014. – V. 5. – P. 327-349.
110. FAO., Fisheries Technical Papers-T142. The production of fish meal and oil. Fisheries Industries Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy. - 1986. – URL: <http://www.fao.org/DOCREP/003/X6899E/X6899E00.HTM> - дата обращения 13.04.2017.
111. FAO., Post-harvest changes in fish. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization, Rome, Italy. - 2005. – URL: - <http://www.fao.org/fishery/topic/12320/en> - дата обращения 13.04.2017.
112. Fernandes, R. Microbiology handbook: Fish and seafood. – Royal Society of Chemistry, 2009. – P. 258.
113. Ferrini, G. The effect of thermal processing condition on the physicochemical and sensory characteristics of fermented sausages dried by Quick-Dry-Slice process® / G. Ferrini, J. Arnau, M.D. Guardia, J. Comaposada // Meat science. – 2014. – V. 96. – № 2. – P. 688-694.

114. Fraser, O. P. Compositional changes and spoilage in fish (part II) microbiological induced deterioration / O. P. Fraser, S. Sumar // Nutrition & Food Science. – 1998. – V. 98. – № 6. – P. 325-329.
115. Gálvez, A. Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol / A. Gálvez, H. Abriouel, N. Benomar, R. Lucas // Current opinion in biotechnology. – 2010. – V. 21. – № 2. – P. 142-148.
116. Garcia, P. Bacteriophages and their application in food safety / P. Garcia, B. Martinez, J.M. Obeso, A. Rodríguez // Letters in applied microbiology. – 2008. – V. 47. – № 6. – P. 479-485.
117. Ghaly, A.E. Fish spoilage mechanisms and preservation techniques: review / A.E. Ghaly, D. Dave, S. Budge, M.S. Brooks // American Journal of Applied Sciences. – 2010. – T. 7. – № 7. – P. 859.
118. Gold, W. L. Aeromonas hydrophila infections of skin and soft tissue: report of 11 cases and review / W.L. Gold, I.E. Salit // Clinical Infectious Diseases. – 1993. – V. 16. – № 1. – P. 69-74.
119. Gram, L. Fish spoilage bacteria—problems and solutions / L. Gram, P. Dalgaard // Current opinion in biotechnology. – 2002. – V. 13. – № 3. – P. 262-266.
120. Gram, L. Microbiological spoilage of fish and seafood products // Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. – Springer New York, 2010. – P. 87-119.
121. Guenther, S. Bacteriophage biocontrol of Listeria monocytogenes on soft ripened white mold and red-smear cheeses / S. Guenther, M.J. Loessner // Bacteriophage. – 2011. – V. 1. – № 2. – P. 94-100.
122. Guenther, S. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods / S. Guenther, D. Huwyler, S. Richard, M.J. Loessner // Applied and environmental microbiology. – 2009. – V. 75. – № 1. – P. 93-100.
123. Hagens, S. Phages of Listeria offer novel tools for diagnostics and biocontrol / S. Hagens, M.J. Loessner // Gram-Positive Phages: From Isolation to Application. – 2015. – V. 94.
124. Harwood, C. S. Flagellation of Pseudomonas putida and analysis of its motile behavior / C.S. Harwood, K. Fosnaugh, M. Dispensa // Journal of bacteriology. – 1989. – V. 171. – № 7. – P. 4063-4066.

125. Huss, H. H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood / H.H. Huss // Food control. – 1997. – V. 8. – № 2. – P. 91-98.
126. Janda, J.M. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection/ J.M. Janda, S.L. Abbott // Clinical Microbiology Reviews. - 2010. - Vol. 23. - №1. - P.35-73.
127. Janda, J.M. The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection/ J.M. Janda, S. L. Abbott // Clinical Microbiology Reviews.- 2010.-Vol. 23.- №1.-P.35–73.
128. Maftoonazad, N. Use of edible films and coatings to extend the shelf life of food products / N. Maftoonazad, F. Badii // Recent patents on food, nutrition & agriculture. – 2009. – V. 1. – № 2. – P. 162-170.
129. Mazzotta, A. S. Nisin induces changes in membrane fatty acid composition of *Listeria monocytogenes* nisin resistant strains at 10° C and 30° C / A.S. Mazzotta, T.J. Montville // Journal of Applied Microbiology. – 1997. – V. 82. – № 1. – P. 32-38.
130. McLauchlin, J. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods / J. McLauchlin, R.T. Mitchell, W.J. Smerdon, K. Jewell // International journal of food microbiology. – 2004. – V. 92. – № 1. – P. 15-33.
131. Mohan, C. O. Effect of reduced oxygen atmosphere and sodium acetate treatment on the microbial quality changes of seer fish (*Scomberomorus commerson*) steaks stored in ice / C.O. Mohan, C.N. Ravishankar, T.K.S. Gopal, K.V. Lalitha, K.A. Kumar // Food microbiology. – 2010. – V. 27. – № 4. – P. 526-534.
132. Parisi, S. Histamine in Fish and Fishery Products / S. Parisi, C. Barone, G. Caruso, A.S. Delia, Gab. Caruso, P. Laganà // Microbial Toxins and Related Contamination in the Food Industry. – Springer International Publishing, 2015. – P. 1-11.
133. Phuvasate, S. Effects of electrolyzed oxidizing water and ice treatments on reducing histamine-producing bacteria on fish skin and food contact surface / S. Phuvasate, Y.C. Su // Food control. – 2010. – V. 21. – № 3. – P. 286-291.
134. Piette, J. P. Role of flagella in adhesion of *Pseudomonas fluorescens* to tendon slices / J.P. Piette, E.S. Idziak // Applied and environmental microbiology. – 1991. – V. 57. – № 6. – P. 1635-1639.

135. Ray, B. Indicators of bacterial pathogens / B. Ray // *Fundamental food microbiology*. – 2004. – P. 625
136. Rodrigues, M.J. Characterization and identification of microflora from soaked cod and respective salted raw materials / M.J. Rodrigues, P. Ho, M.E. Lopez-Caballero, P. Vaz-Pirez, M.L. Nunes // *Food Microbiology*. – 2003. – № 20. – P. 471-481.
137. Schlech, W. F. Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food / W.F. Schlech, P.M. Lavigne, R.A. Bortolussi, A.C. Allen, E.V. Haldane, A.J. Wort, A.W. Hightower, S.E. Johnson, S.H. King, E.S. Nicholls, C.V. Broome // *New england journal of medicine*. – 1983. – V. 308. – № 4. – P. 203-206.
138. Silva, E. N. G. Control of *Listeria monocytogenes* growth in soft cheeses by bacteriophage P100 / E.N.G. Silva, A.C.L. Figueiredo, F.A. Miranda, R.C.C. Almeida // *Brazilian Journal of Microbiology*. – 2014. – V. 45. – № 1. – P. 11-16.
139. Soni, K. A. Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue / K.A. Soni, R. Nannapaneni // *Journal of Food Protection*. – 2010. – V. 73. – № 1. – P. 32-38.
140. Soni, K. A. Reduction of *Listeria monocytogenes* on the surface of fresh channel catfish filets by bacteriophage Listex P100 / K.A. Soni, R. Nannapaneni, S. Hagens // *Foodborne pathogens and disease*. – 2010. – V. 7. – № 4. – P. 427-434.
141. Sulakvelidze, A. Using lytic bacteriophages to eliminate or significantly reduce contamination of food by foodborne bacterial pathogens / A. Sulakvelidze // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2013. – V. 93. – № 13. – P. 3137-3146. 168. Thomas, B. S. A Lethal Case of *Pseudomonas putida* Bacteremia Due to Soft Tissue Infection / B.S. Thomas, K. Okamoto, M.J. Bankowski, T. Setto // *Infectious diseases in clinical practice (Baltimore, Md.)*. – 2013. – V. 21. – № 3. – P. 147.
142. Tocmo, R. *Listeria monocytogenes* in Vacuum Packed Smoked Fish Products: Occurrence, Routes of Contamination, and Potential Intervention Measures / R. Tocmo, K. Krizman, W.J. Khoo, L.K. Phua, H.G. Yuk // *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. – 2014. – V. 13. – № 2. – P. 172-189.

143. Tompkin, R. B. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment // *Journal of Food Protection*®. – 2002. – V. 65. – № 4. – P. 709-725.
144. Trakhna, F. Rapid *Aeromonas hydrophila* identification by TaqMan PCR assay: comparison with a phenotypic method / F. Trakhna, C. Harf-Monteil, A. AbdelNour // *Letters in Applied Microbiology*. - 2009. - V. 49, N 2. - P. 186-190.
145. U.S. Food and Drug Administration / Agency response letter GRAS notice no. GRN 000198 - URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm154675.htm>. - дата обращения: 12.05.2017.
146. U.S. Food and Drug Administration / Food additives permitted for direct addition to food for human consumption: bacteriophage preparation, p. 47729–47732. 21 CFR, part 172 - URL: <http://edocket.access.gpo.gov/2006/E6-13621.htm> - дата обращения 12.05.2017.
147. U.S. Food and Drug Administration / Agency response letter GRAS notice no. GRN 000218 - URL: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153865.htm>. - дата обращения: 12.05.2017.
148. US FDA. Department of health and Human services Food and Drug Administration, 21 CFR Part 172 [Docket No. 2002F–0316 (formerly 02F-0316)], Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Bacteriophage Preparation. Agency: Food and Drug Administration, HHS. Action: Final rule. Federal Register Vol. 71, No. 160 (12.01.2017) Rules and Regulations. 2006: 47729-47732.
149. Zhiyong, Z., *Aeromonas hydrophila* infection: clinical aspects and therapeutic options / Z. Zhiyong, L. Xiaoju, G. Yanyu // *Rev. Med. Microbiol.* 2002. - V. 13. - P. 12.
150. Tewari, R. Isolation of *Aeromonas salmonicida* from Human Blood Sample: A Case Report/R. Tewari, M. Dudeja, S. Nandy , A.K. Das// *J Clin Diagn Res.*- 2014- Vol.-8.- №2.- P.139-140.
151. Техэксперт. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности пищевых продуктов. Санитарные правила и нормы. СанПиН 2.3.2.1078-01. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/901806306> - дата обращения 14.12.2016

152. Техэксперт. ГОСТ 10444.15-94 Продукты пищевые. Методы определения количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200022648> - дата обращения 14.12.2016.
153. Техэксперт. ГОСТ 26669-85 Продукты пищевые и вкусовые. Подготовка проб для микробиологических анализов – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200022785> - дата обращения 14.12.2016.
154. Техэксперт. ГОСТ 26670-91 Продукты пищевые. Методы культивирования микроорганизмов – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200021109> - дата обращения 14.12.2016.
155. Техэксперт. ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200105310> - дата обращения 14.12.2016.
156. Техэксперт. ГОСТ 814-96. Межгосударственный стандарт: Рыба охлажденная, Технические условия ICED FISH. SPECIFICATIONS. <http://docs.cntd.ru/document/1200022142> – дата обращения 14.12.2016.
157. Техэксперт. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции» – URL: <http://docs.cntd.ru/document/902320560> - дата обращения 24.09.2016.
158. Техэксперт. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 022/2011 «Пищевая продукция в части ее маркировки» – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200131693> - дата обращения 24.09.2016.
159. Техэксперт. ГОСТ 32951-2014 Полуфабрикаты мясные и мясосодержащие. Общие технические условия. Semi-prepared meat and meat-contained product. General specifications – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200113849> - дата обращения 24.09.2016.
160. Техэксперт. МУК 4.2.1847-04 «Санитарно-эпидемиологическая оценка обоснования сроков годности и условий хранения пищевых продуктов» – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200035982> - дата обращения 25.09.2016.
161. Техэксперт. Технический регламент Таможенного союза «О безопасности мяса и мясной продукции» (ТР ТС 034/2013) – URL: <http://docs.cntd.ru/document/499050564> - дата обращения 25.09.2016.

162. StandartGOST. МУК 4.2.2316-08 «Методы контроля бактериологических питательных сред» - URL: <https://standartgost.ru/g/pkey-14293831170> - дата обращения 14.12.2016.
163. StandartGOST. ГОСТ Р 51419-99 Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Подготовка испытуемых проб – URL: https://standartgost.ru/g/ГОСТ_P_51419-99 - дата обращения 14.12.2016.
164. StandartGOST. ГОСТ Р 26668-85 Продукты пищевые и вкусовые. Методы отбора проб для микробиологических анализов - URL: https://standartgost.ru/g/ГОСТ_P_26668-85 - дата обращения 14.12.2016
165. StandartGOST. ГОСТ Р 51426-99 Микробиология. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Общее руководство по приготовлению разведений для микробиологических исследований - URL: https://standartgost.ru/g/ГОСТ_P_51426-99 - дата обращения 14.12.2016.
166. StandartGOST. ГОСТ 51446-99. Микробиология. Продукты пищевые. Общие правила микробиологических исследований - URL: https://standartgost.ru/g/ГОСТ_P_51446-99 - дата обращения 14.12.2016

ИЛЛЮСТРАЦИИ

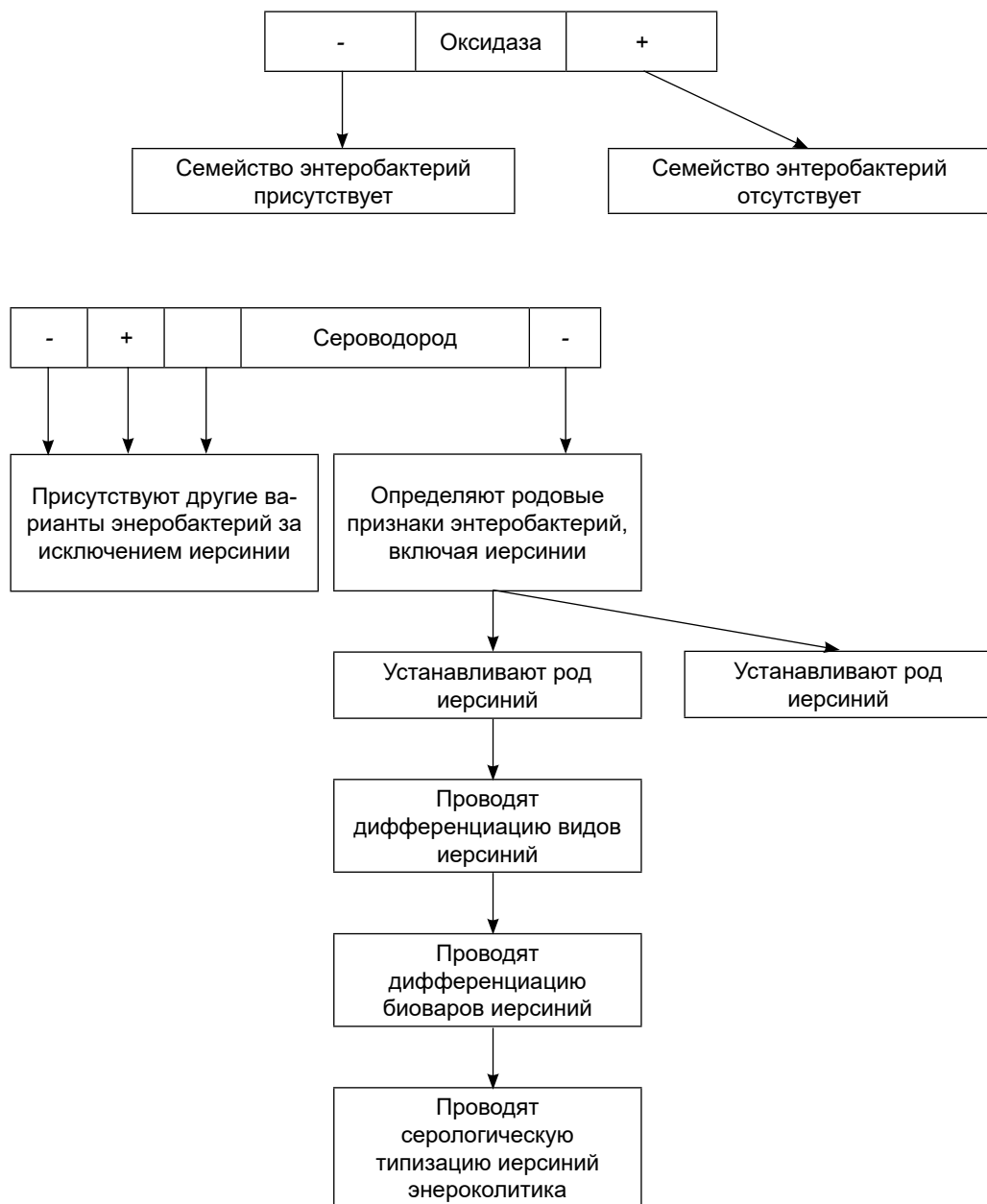


Рисунок 1. Схема дифференциации иерсиний.

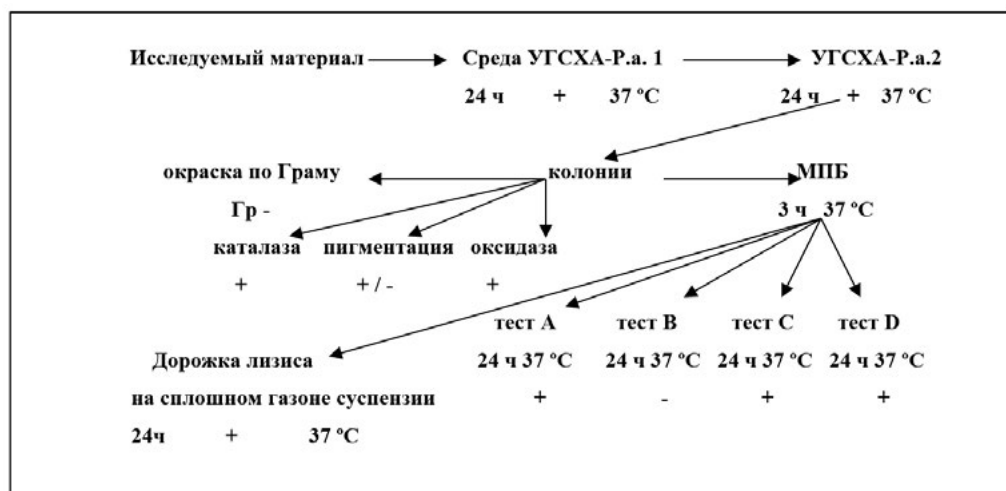


Рисунок 2. Схема выделения и идентификации *Pseudomonas aeruginosa* из объектов внешней среды, пищевого сырья и пищевых продуктов.

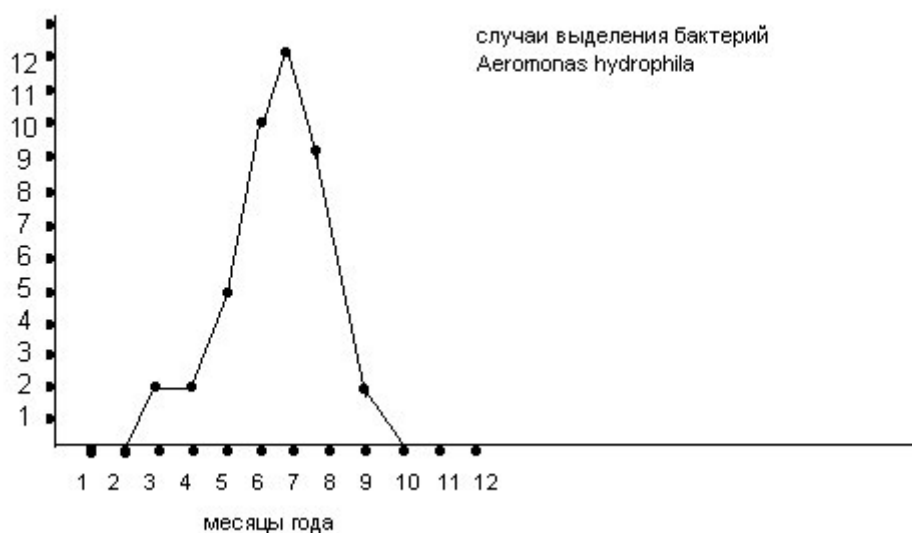


Рисунок 3. Сезонные различия в количественном содержании бактерий рода *Aeromonas* в воде.

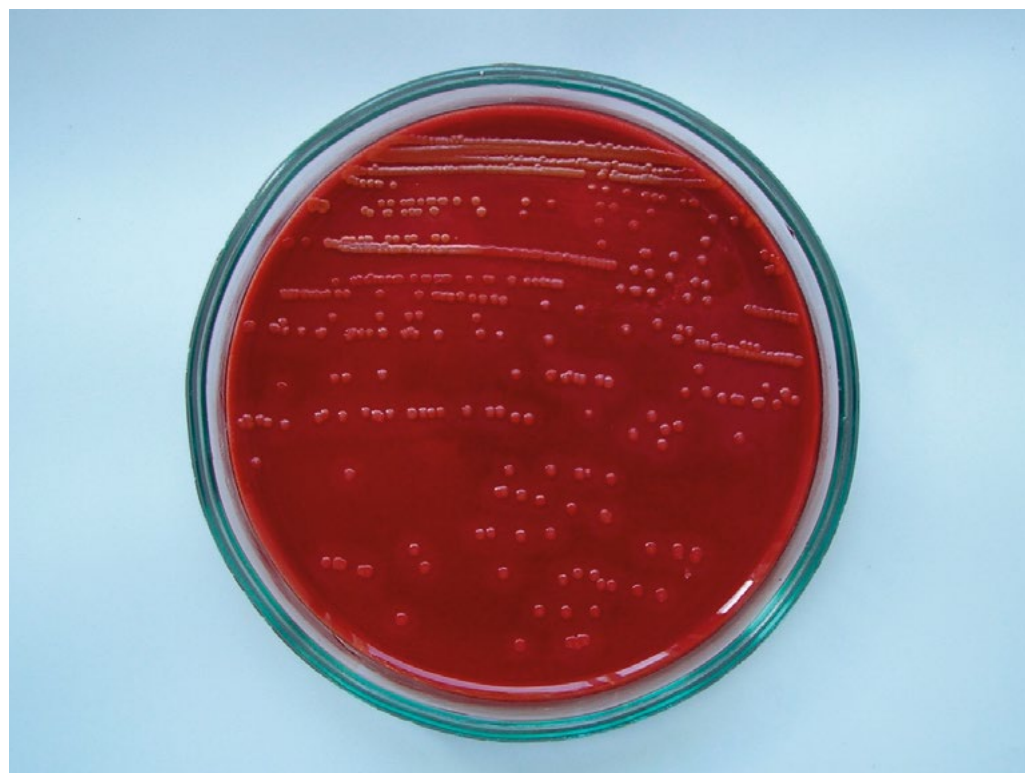


Рисунок 4. Колонии *Aeromonas hydrophila* в чашке Петри на селективной среде УГСХА – 2 А. h.

Исследуемый материал

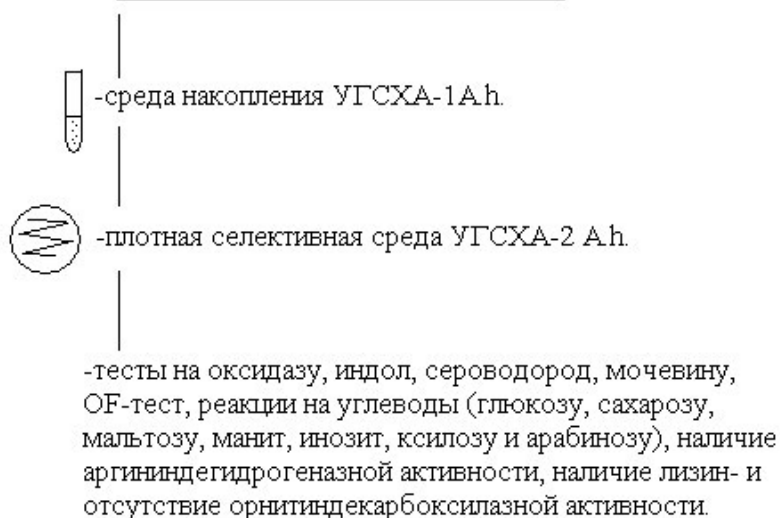


Рисунок 5. Схема выделения и бактериологической идентификации *Aeromonas hydrophila*.

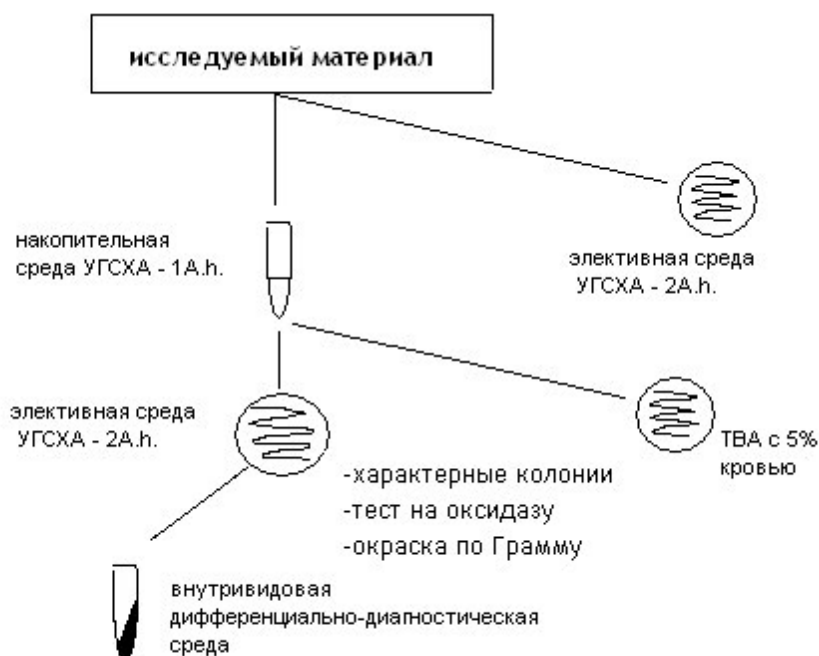


Рисунок 6. Схема выделения и бактериологической идентификации биоваров *Aeromonas hydrophila*.

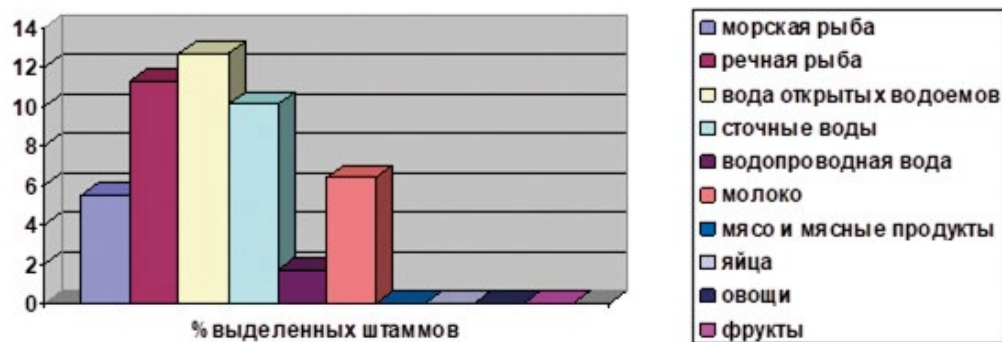


Рисунок 7. Процент выделенных штаммов *Aeromonas hydrophila* по отношению к объектам исследования.

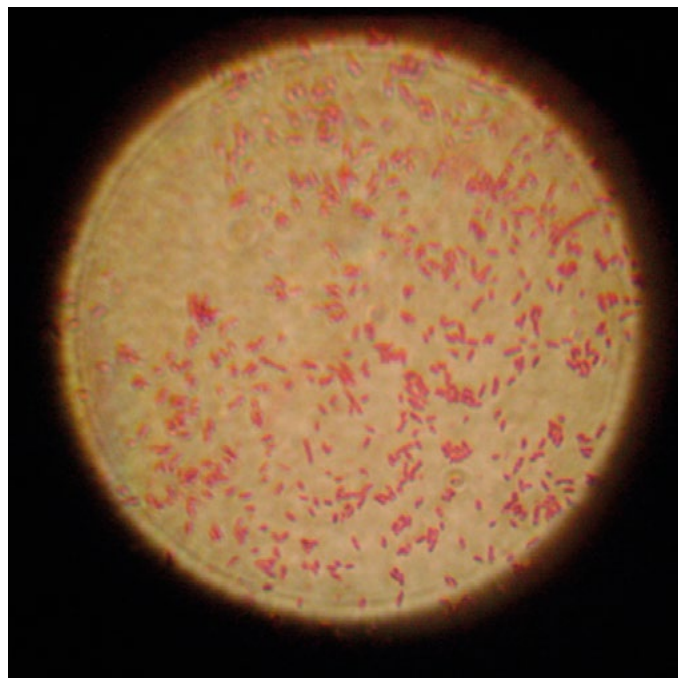


Рисунок 8. Грамотрицательные палочки *Aeromonas hydrophila* в поле светового микроскопа.

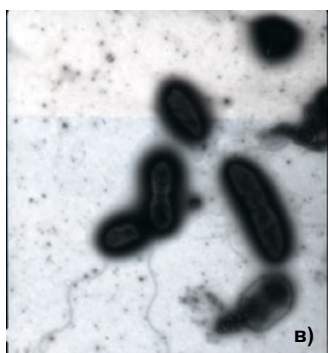
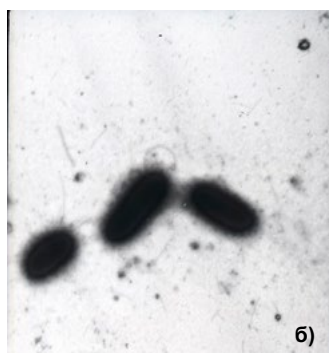


Рисунок 9. Электронная микроскопия *Aeromonas hydrophila* (увеличение 13 x103).

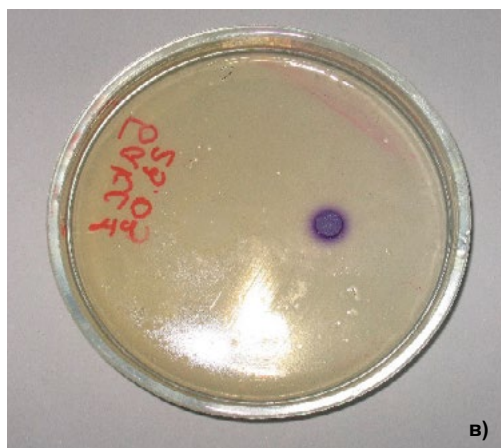
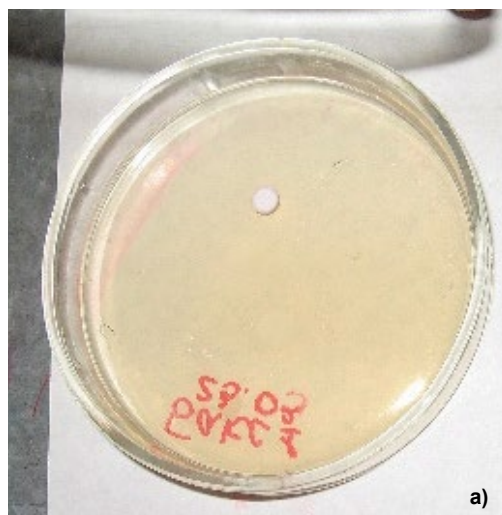


Рисунок 10. Определение оксидазы (положительная реакция).

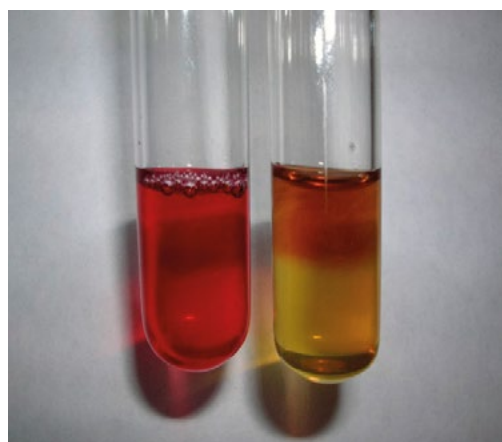


Рисунок 11. Реакция с метиловым красным и Фогеса-Проскауэра.



Рисунок 12. Обесцвечивание среды Хью-Лейвсона в обеих пробирках.

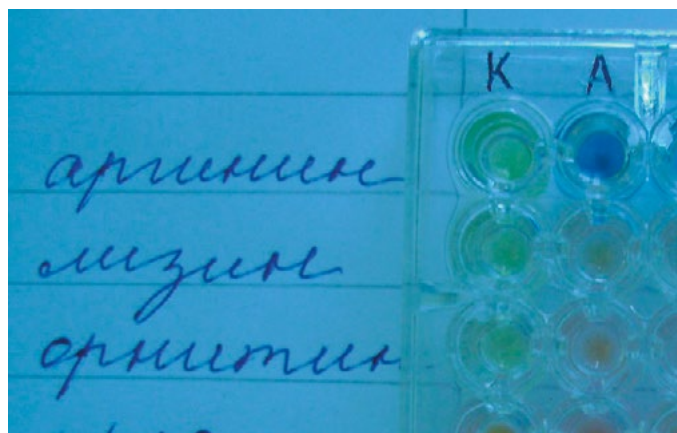


Рисунок 13. Положительная реакция на аргининдигидролазу и отрицательные реакции на лизиндекарбоксилазу и орнитиндекарбоксилазу (К – лунки контроля цвета среды тест-реактива, А – лунки с добавлением бактерий *Aeromonas hydrophila*).

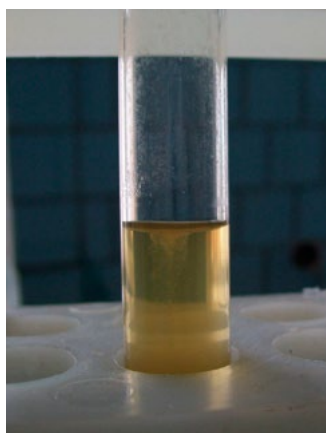


Рисунок 14. Рост бактерий *Aeromonas hydrophila* по всей питательной среде с равномерным ее помутнением.

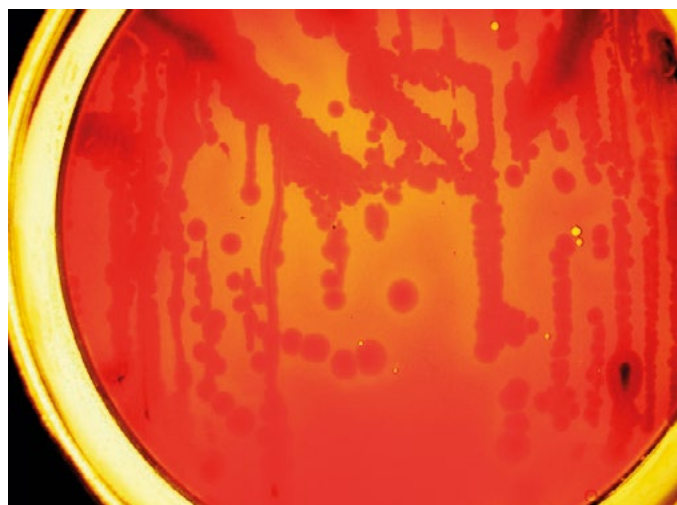


Рисунок 15. Наличие гемолиза вокруг колоний *Aeromonas hydrophila*.



Рисунок 16. Разжижение желатина в верхней пробирке, нижняя пробирка – контрольная.

Рисунок 17. Определение ДНКазной активности на среде DNA BA (Difco).



Рисунок 18. Наличие зоны лизиса вокруг колоний *Aeromonas hydrophila* при определении ДНКазной активности.

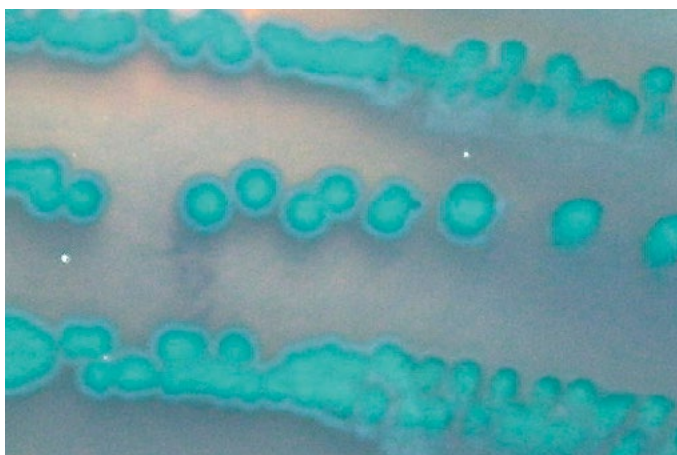
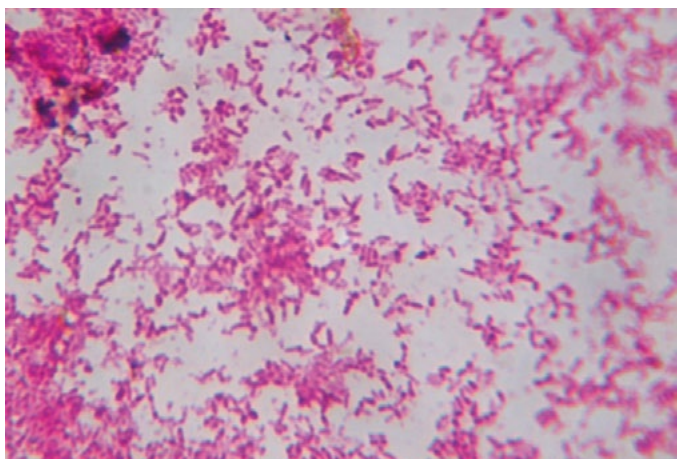


Рисунок 19. Грамотрицательные палочки *Aeromonas salmonicida*.



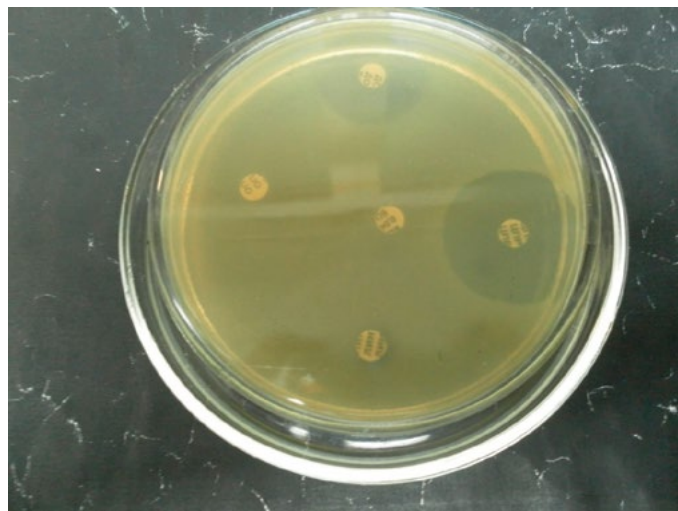


Рисунок 20. Результат исследования штамма *Aeromonas salmonicida* ATCC 33658 на устойчивость к антибиотикам: доксицилина, оптохину, линкомицину, бацитрацину, цефоперазону.



Рисунок 21. Рост *A. salmonicida* на дифференциально-диагностической среде А. SI.2-УГСХА.



Рисунок 22. Рост штаммов на жидкой накопительной среде А. SI 1- УГСХА.

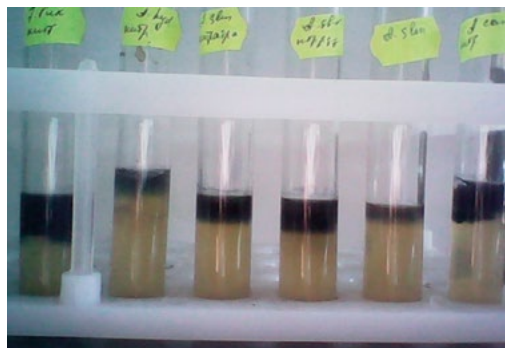


Рисунок 23. Определение способности к нитратредуктазе.



Рисунок 24. Реакция на наличие желатиназы.

Рисунок 25. Тест Хью-Лейфсона (слева – пробы с бактериями *A. salmonicida* ATCC 33658, справа – контроль).

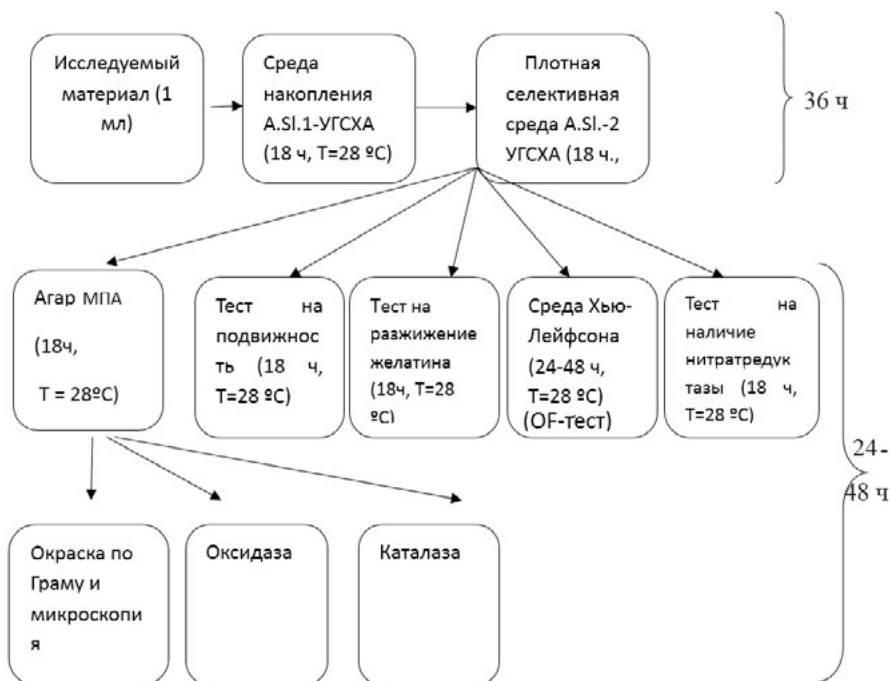
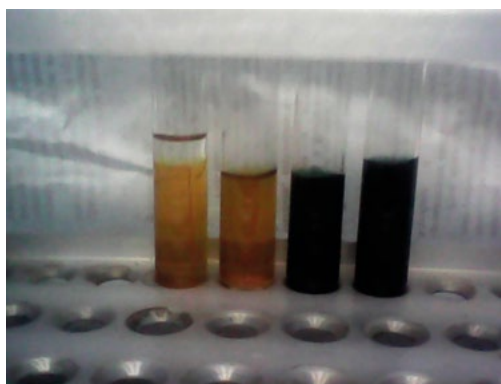


Рисунок 26. Схема выделения и идентификации бактерий *Aeromonas salmonicida*.

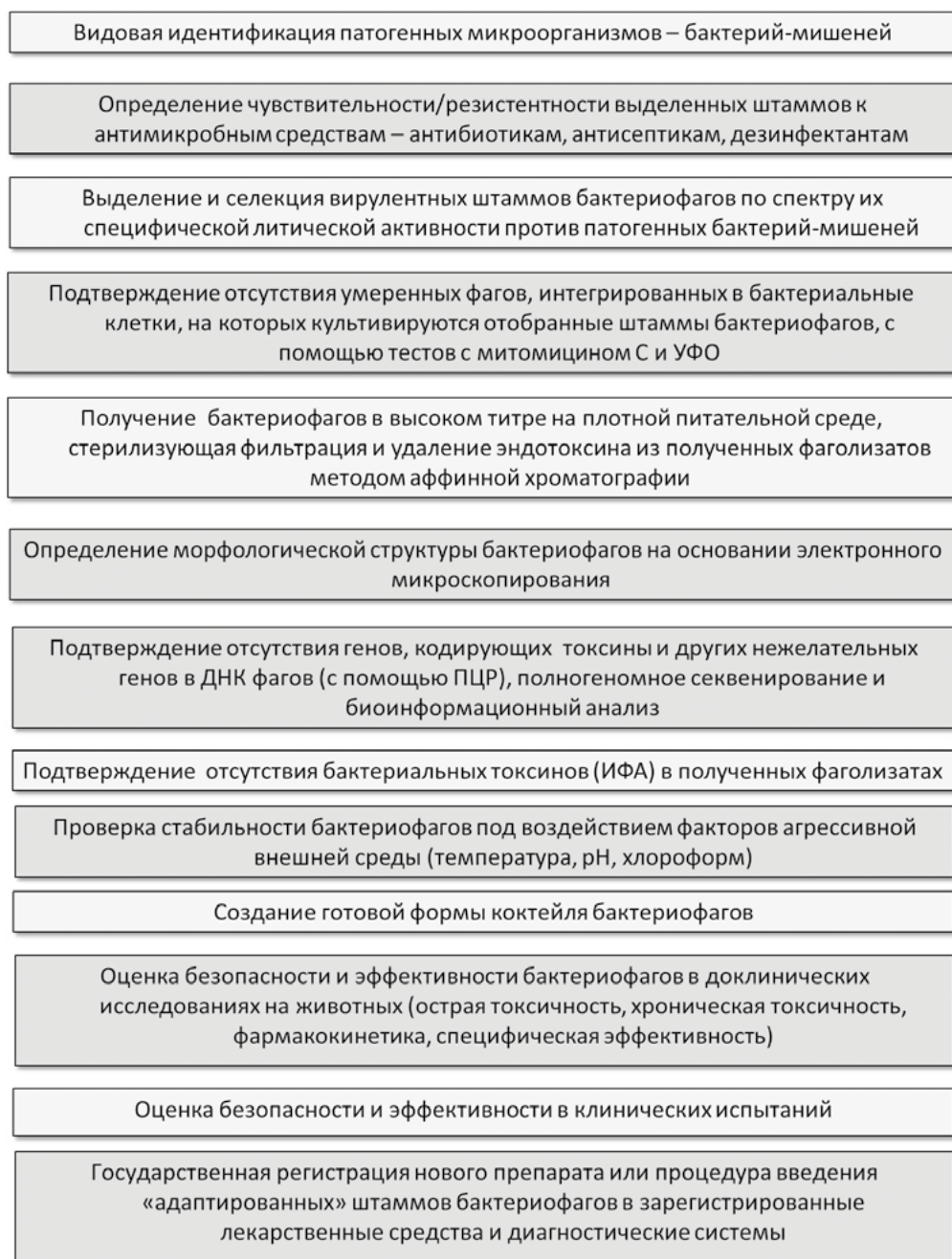


Рисунок 27. Предлагаемая схема алгоритма создания нового или «адаптированного» препарата на основе бактериофагов.

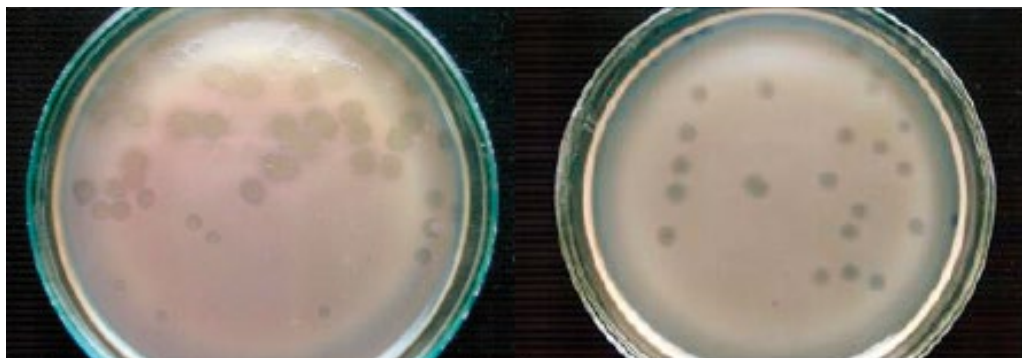


Рисунок 28. Морфология бляшкообразующих единиц протейных фагов: А) FPr - 12 УГСХА и B) FPr - 10 УГСХА.

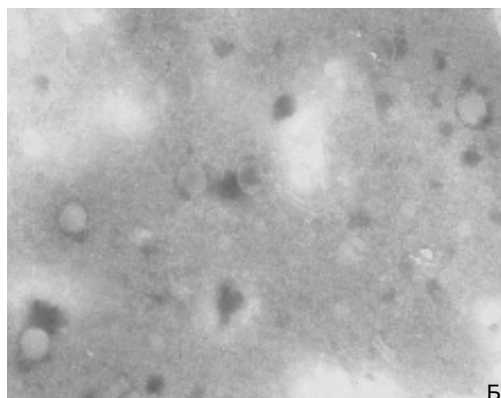
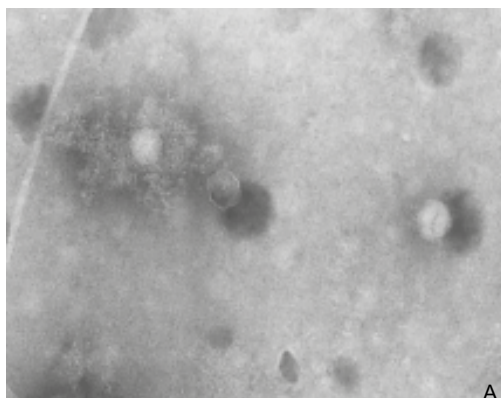


Рисунок 29. Морфология электронной микроскопии фага: А) бактериофага FPr-11 УГСХА; Б) фага FPr-13 УГСХА.



Рисунок 30. Морфология негативных колоний бактериофага Ars25- УГСХА.



Рисунок 31. Лизис бактериального газона бактерии *Aeromonas hydrophila*.

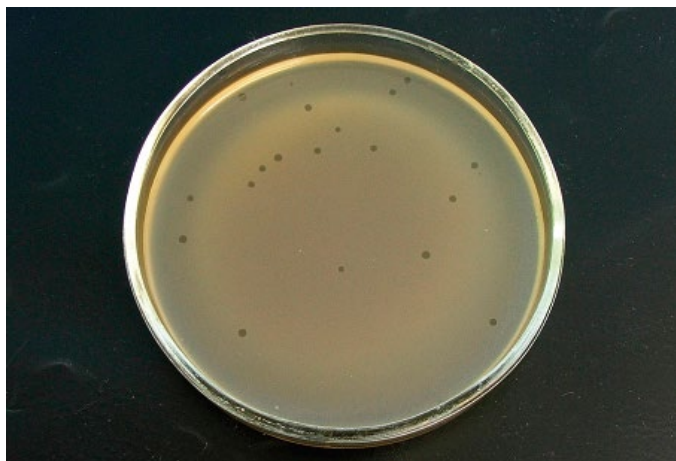


Рисунок 32. Негативные колонии бактериофага А.н. 43 - УГСХА.



Рисунок 33. Дорожки лизиса на сплошном бактериальном газоне индикаторной культуры *L.monocytogenes* 9-127.

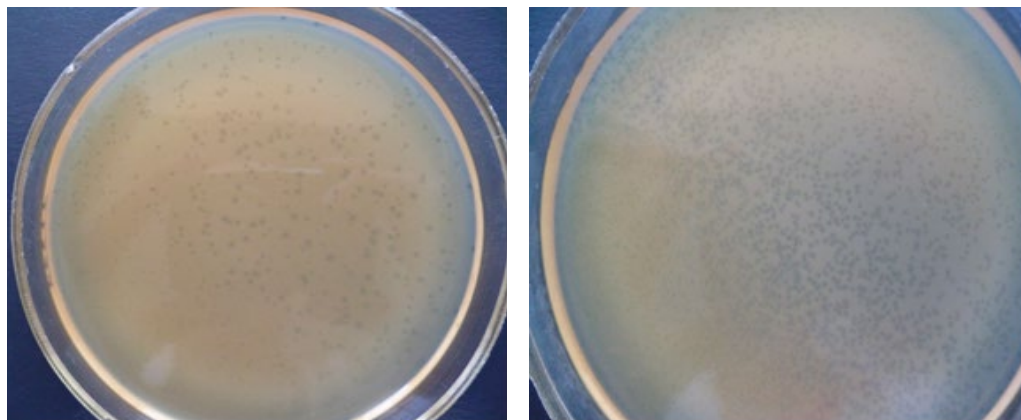


Рисунок 34. Негативные колонии листериозных бактериофагов, а – L.m-1, б - L.m-12.



Рисунок 35. Негативные колонии фага *Y. enterocolitica* Ye-2-f1 в зоне «стекающей капли».

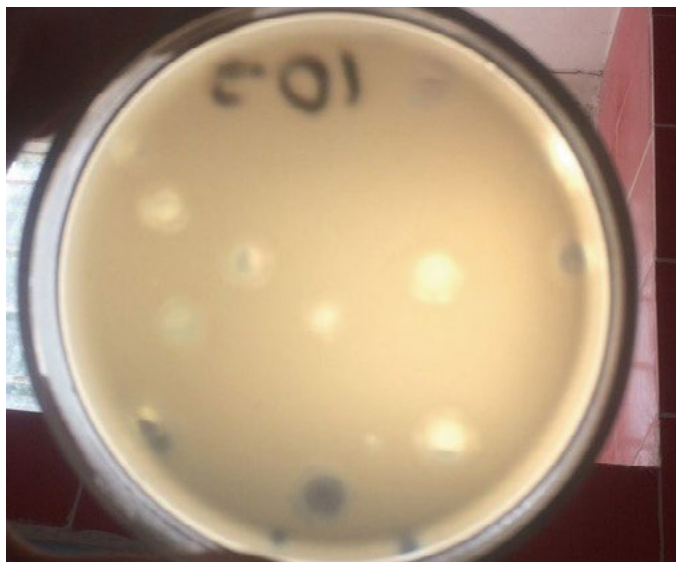


Рисунок 36. Негативные колонии фага Ye3-f2.

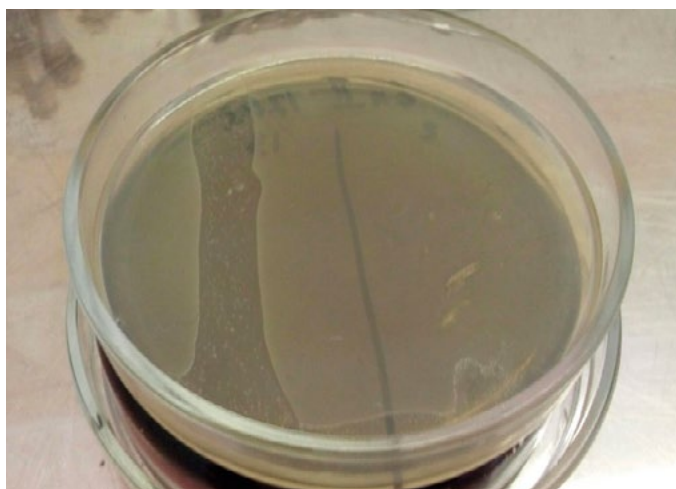


Рисунок 37. Зона лизиса на месте «стекающей капли».

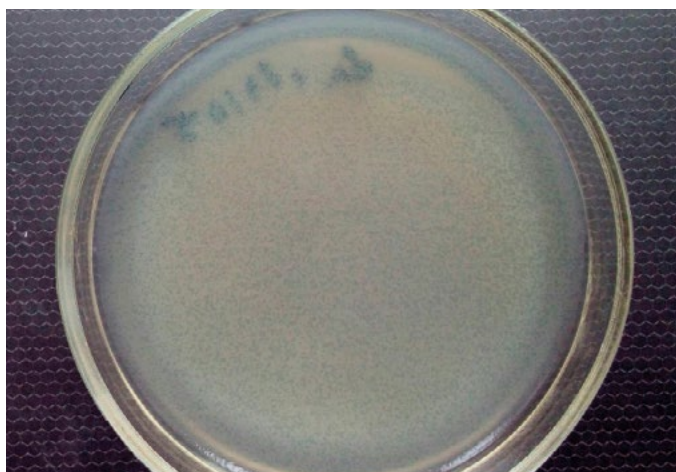


Рисунок 38. Негативные колонии фага E-3.

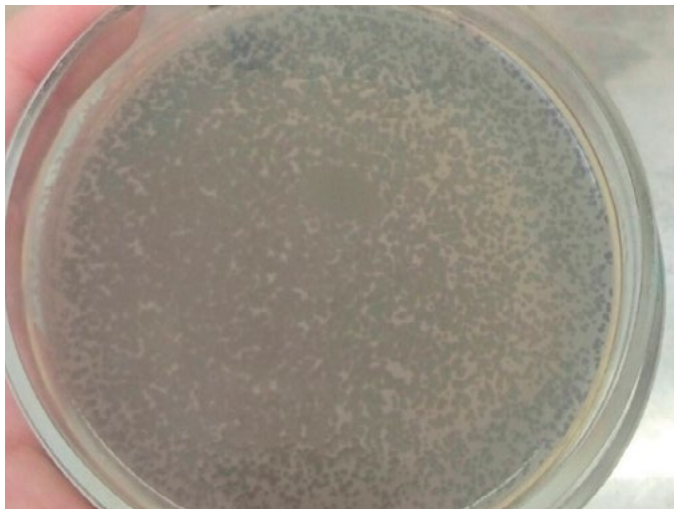


Рисунок 39. Негативные колонии фага E-4.

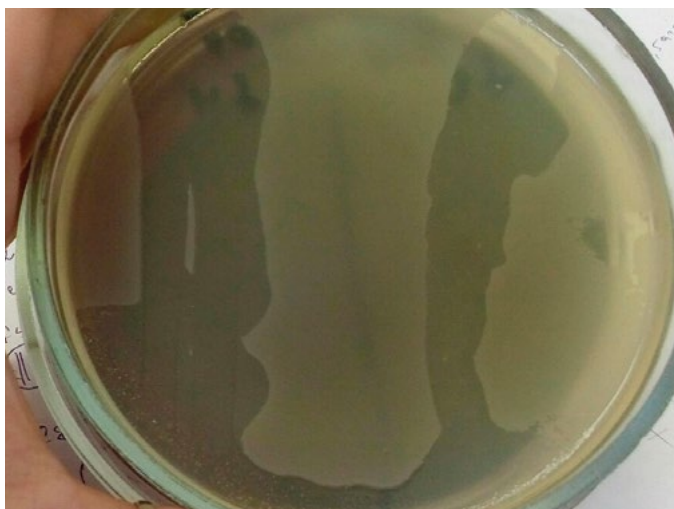


Рисунок 40. Изучение спектра литической активности выделенных бактериофагов E1 и E4 на культуре *E. dissolvens* 1.

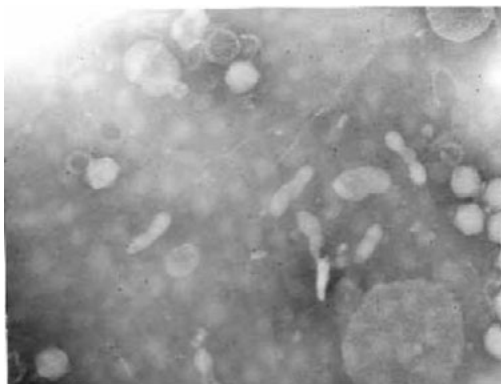


Рисунок 41. Морфология вирионов бактериофага Eп7 (x98000).

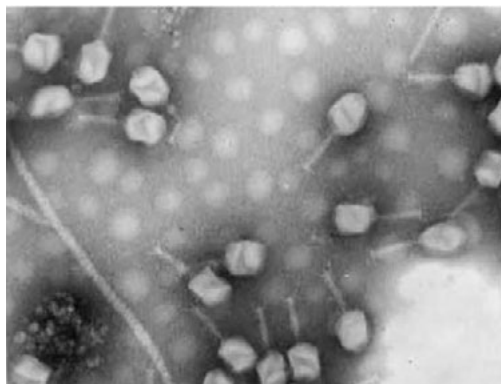


Рисунок 42. Морфология вириона бактериофага Eп4 (x98000).

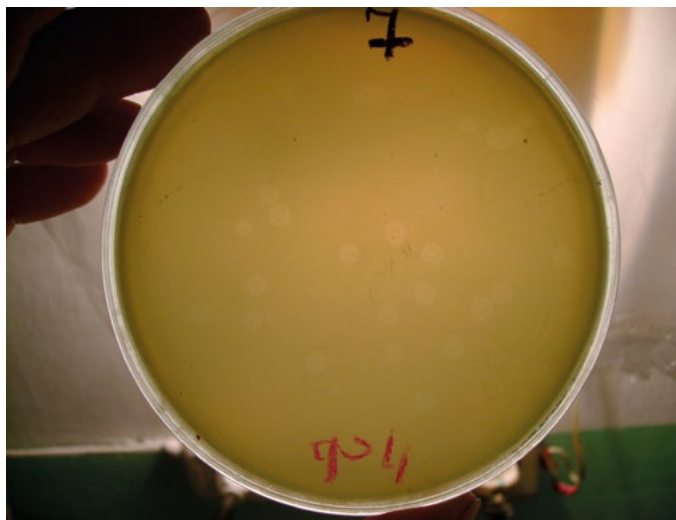


Рисунок 43. Негативные колонии бактериофага УГСХА – Р.а. № 4.



Рисунок 44. Четкие стерильные зоны лизиса в месте нанесения фага УГСХА- Р.а.№4 и зоны слабого лизиса с вторичным ростом культуры в месте нанесения фага УГСХА - Р.а.№1.

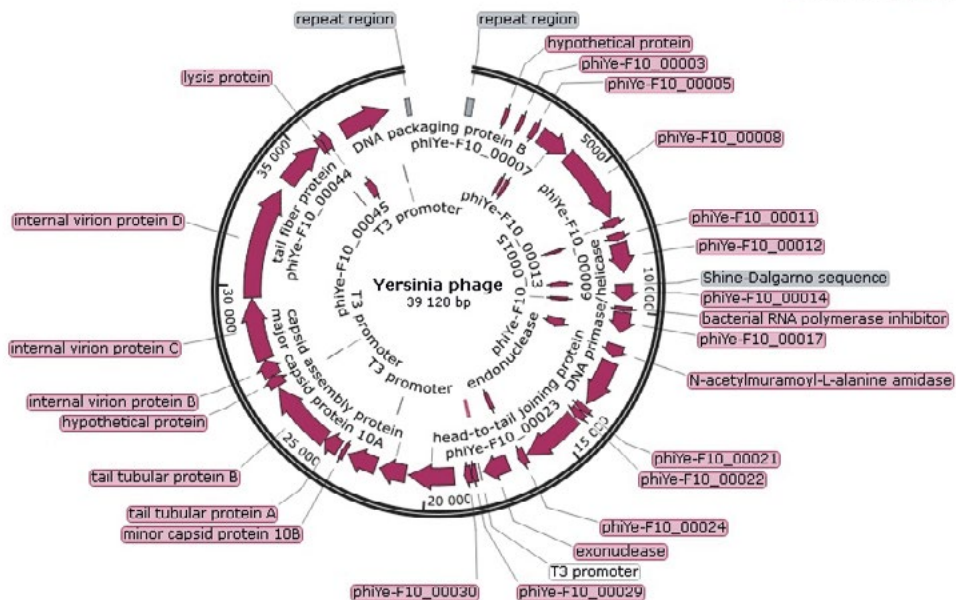


Рисунок 45. Карта линейной ДНК бактериофага *Yersinia enterocolitica* с расшифровкой кодирующих областей генома

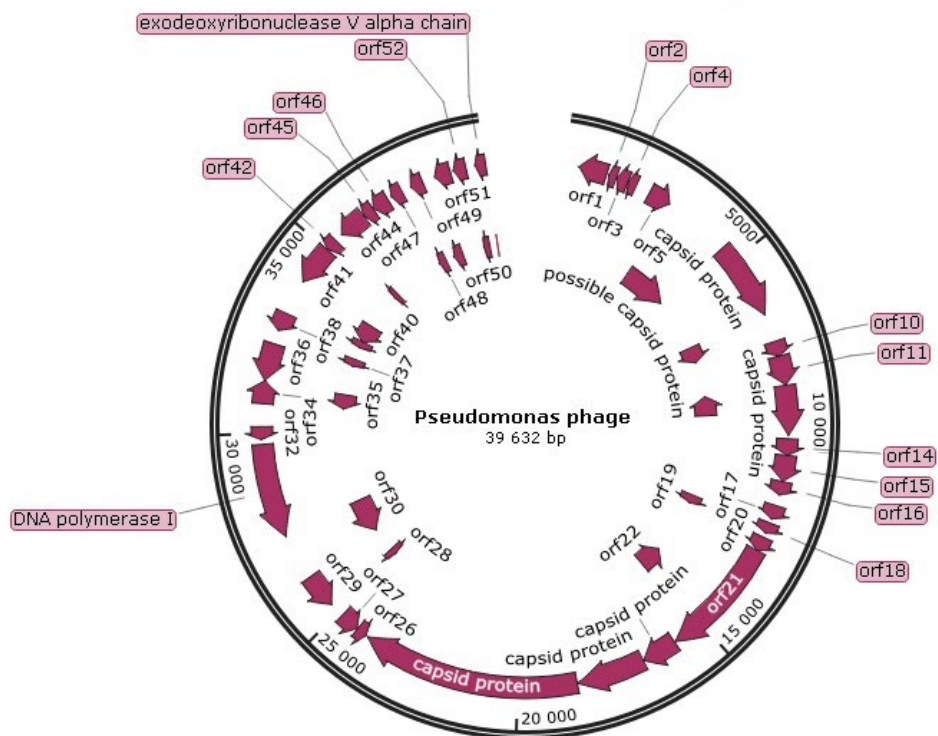


Рисунок 45. Карта линейной ДНК бактериофага *Pseudomonas aeruginosa* с расшифровкой кодирующих областей генома

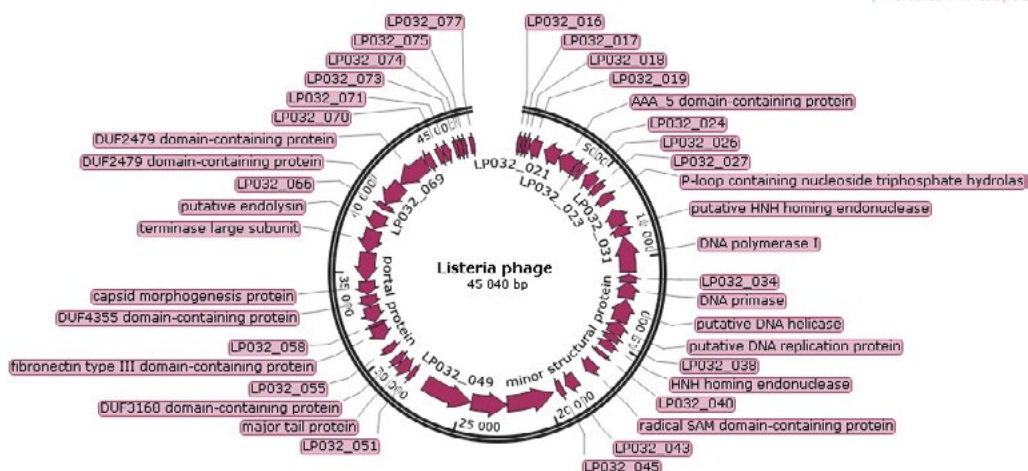


Рисунок 47. Карта линейной ДНК бактериофага *Listeria monocytogenes* с расшифровкой кодирующих областей генома.

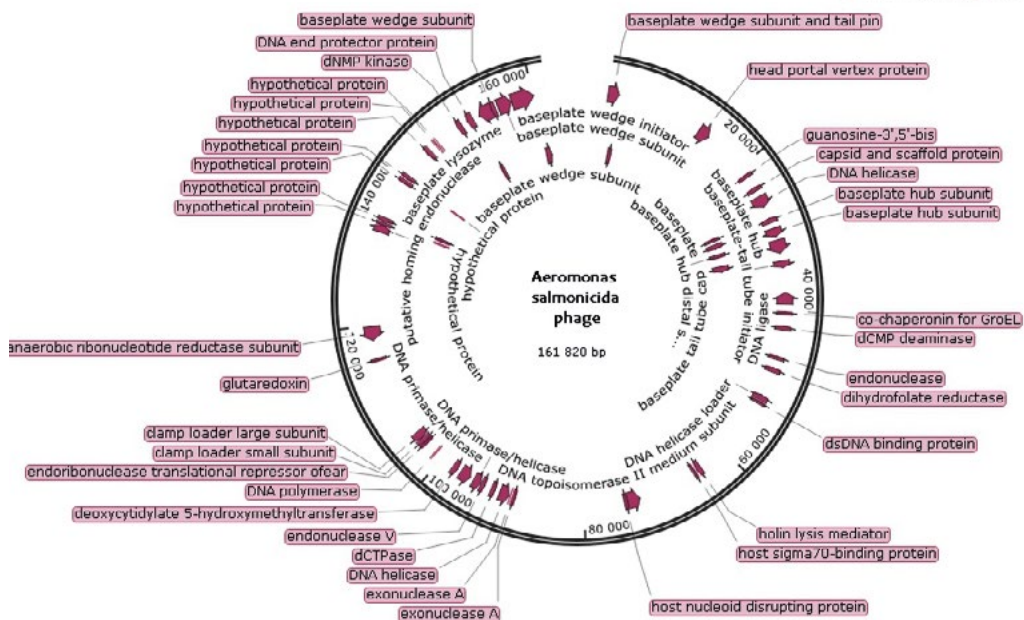


Рисунок 48. Карта линейной ДНК бактериофага *Aeromonas salmonicida* с расшифровкой кодирующих областей генома.

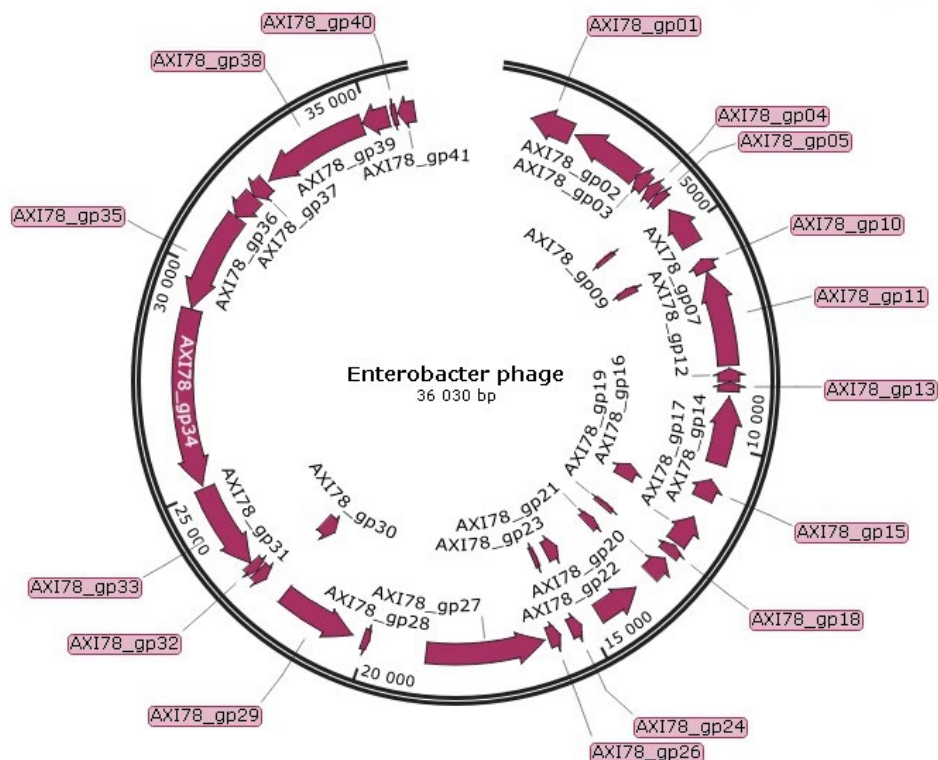


Рисунок 51. Карта линейной ДНК бактериофага *Enterobacter* с расшифровкой кодирующих областей генома.

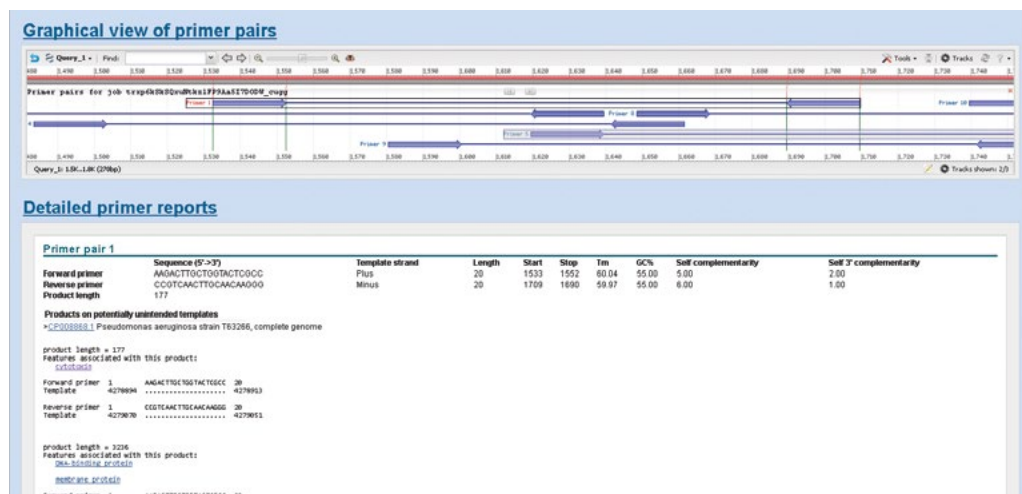


Рисунок 52. Варианты праймерных систем для амплификации гена *ctx* генома фагов, активных в отношении *Pseudomonas aeruginosa*.

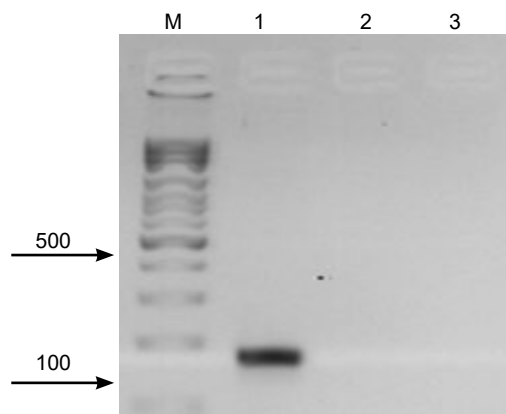


Рисунок 53. Индикация фрагмента гена *ctx* культур *Pseudomonas phage*. М – маркер молекулярного веса, 1 – положительный контроль, 2 – отрицательный контроль, 3 – ДНК бактериофага *Ps.aer. 1*, специфичного в отношении *Pseudomonas aeruginosa*.

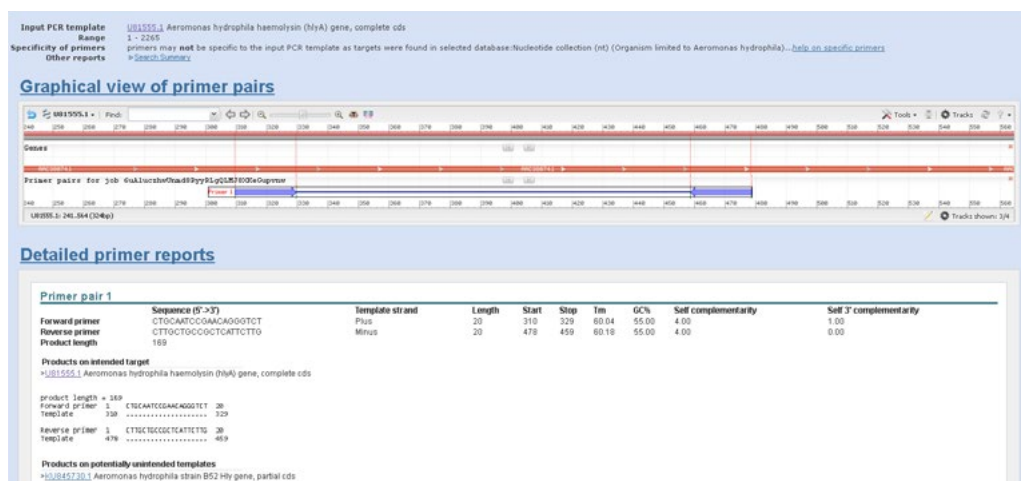


Рисунок 54. Варианты праймерных систем для амплификации гена *hly* генома фагов, активных в отношении *Aeromonas hydrophila*.

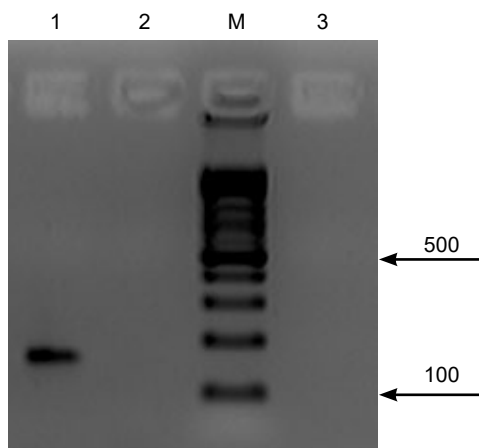


Рисунок 55. Индикация фрагмента гена *hly* культур phage *Aeromonas hydrophila* М – маркер молекулярного веса, 1 – положительный контроль, 2 – отрицательный контроль, 3 – ДНК бактериофага A.h. 43-УГСХА, специфичного в отношении *Aeromonas hydrophila*

Рисунок 59. Индикация фрагмента гена *hly* культур phage *Listeria monocytogenes* M – маркер молекулярного веса, 1 – положительный контроль, 2-3 – отрицательный контроль, 4-5 – ДНК бактериофага Lm4, специфичного в отношении *Listeria monocytogenes*

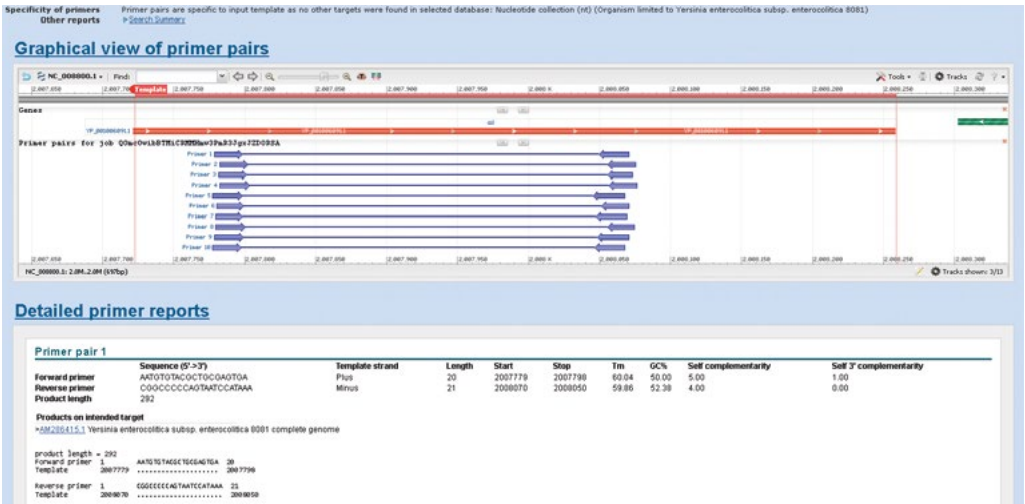
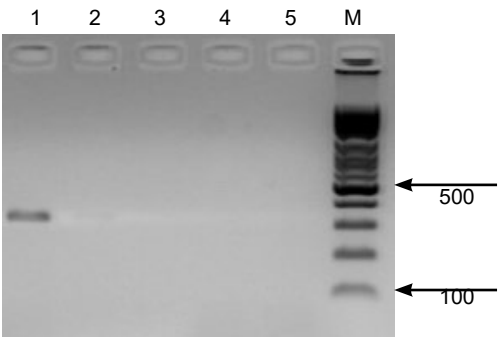
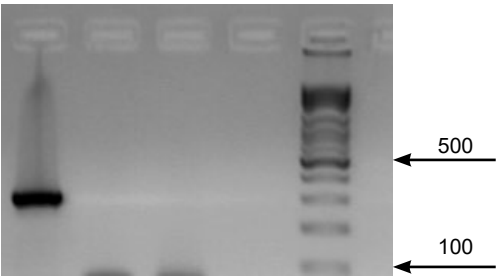


Рисунок 60. Варианты праймерных систем для амплификации гена *ail* генома фагов, активных в отношении *Yersinia enterocolitica*.

Рисунок 61. Индикация фрагмента гена *ail* культур *Yersinia enterocolitica* phage. M – маркер молекулярного веса, 1 – положительный контроль, 2 – отрицательный контроль, 3-4 – ДНК бактериофага Ye3-f2, специфичного в отношении *Yersinia enterocolitica*.



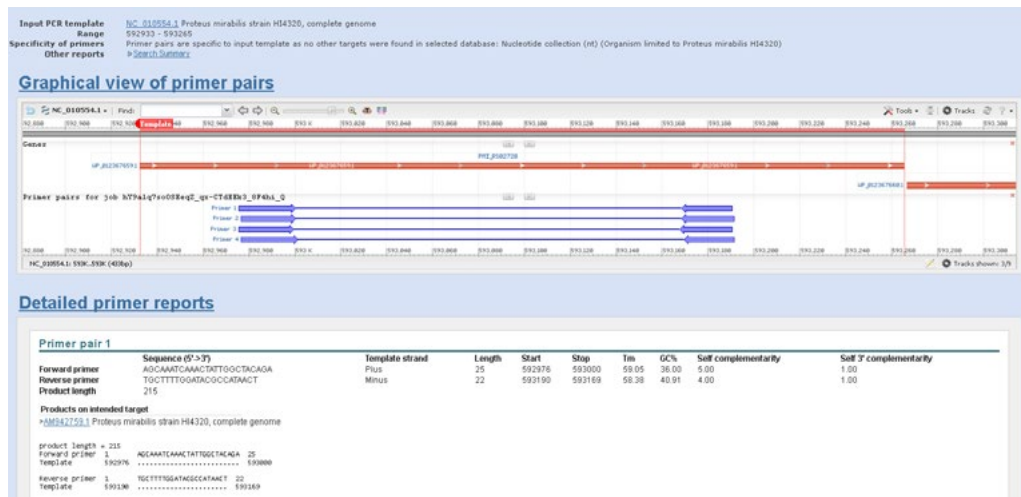


Рисунок 62. Варианты праймерных систем для амплификации гена *toxin RelE* генома фагов, активных в отношении *Proteus spp.*

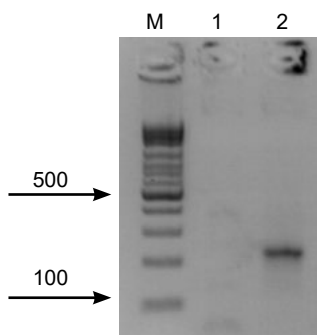


Рисунок 63. Индикация фрагмента гена *RelE* phage *Proteus*. М – маркер молекулярного веса, 1 – ДНК бактериофага *FPr* – 13 УГСА, специфичного в отношении *Proteus spp.*, 2- положительный контроль.

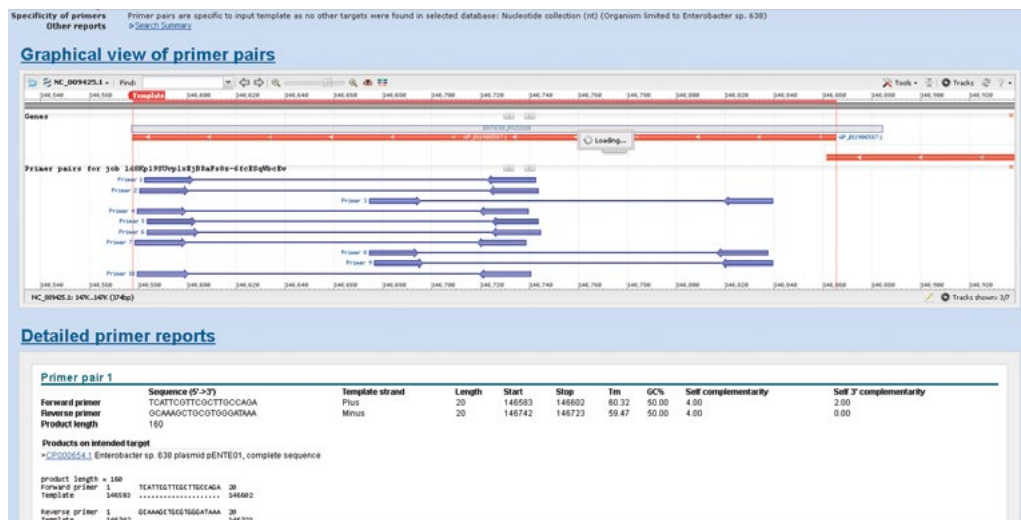


Рисунок 64. Варианты праймерных систем для амплификации гена *toxin RelE* генома фагов, активных в отношении *Enterobacter spp.*

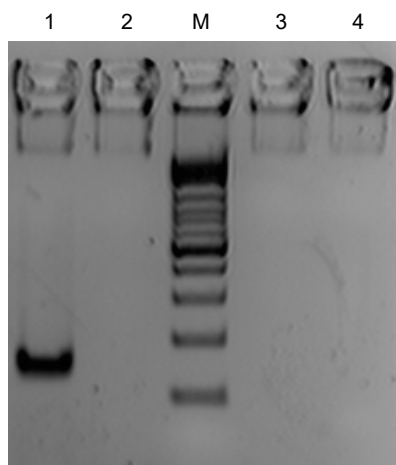


Рисунок 65. Индикация фрагмента гена RelE специфичного в отношении *phage Enterobacter spp.* M – маркер молекулярного веса, 1- положительный контроль, 2- отрицательный контроль, 3-4 – ДНК бактериофагов E4 и E7 УГСХА.

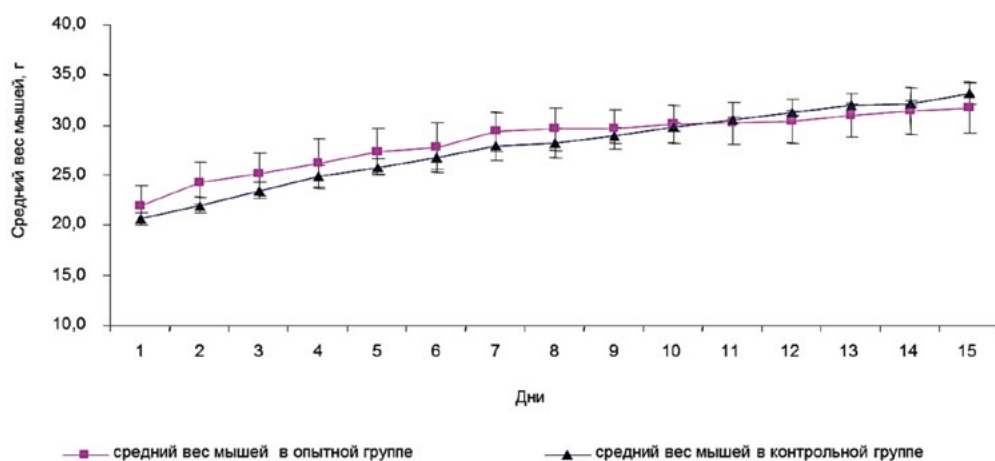


Рисунок 66. Изменение веса мышей в ходе изучения хронической токсичности технологического вспомогательного средства.

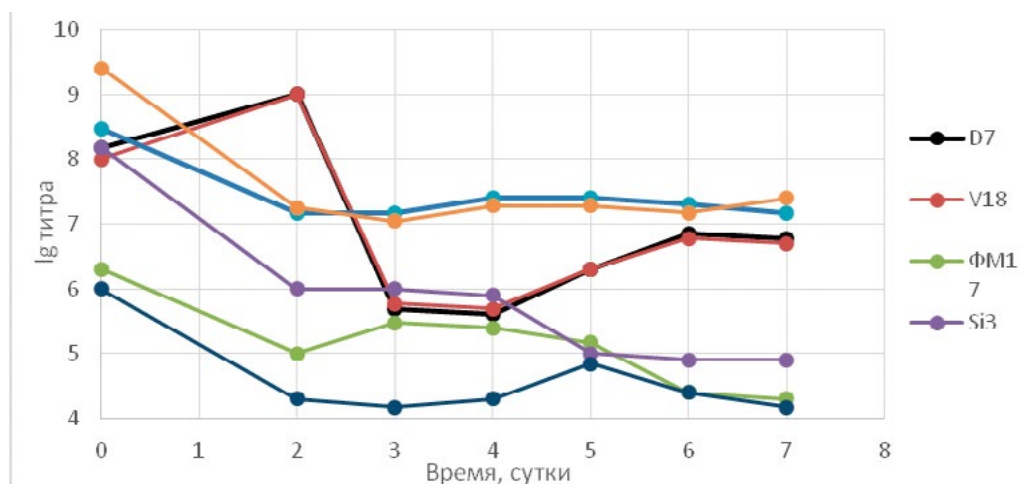


Рисунок 67. Изменение титра изучаемых фагов.



Рисунок 68. Внешний вид купат в первый день эксперимента.

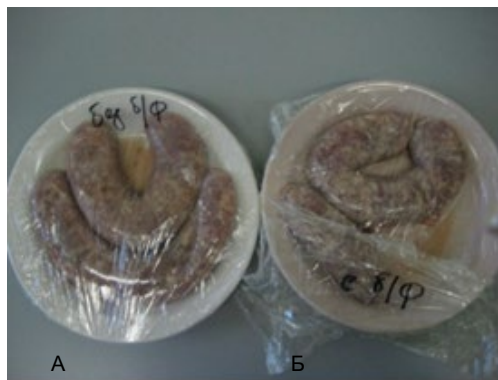


Рисунок 69. Внешний вид купат в седьмой день эксперимента: А) без бактериофагов; Б) с бактериофагами.

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	6
2. СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	12
3. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ИЗУЧАЕМОЙ ПРОБЛЕМЕ, ВКЛЮЧАЯ ОПУБЛИКОВАННЫЕ НАМИ РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ДАННОЙ ТЕМЕ НИР	24
3.1. Бактерии, вызывающие инфекции, передаваемые пищевым путем, вызывающие порчу пищевого сырья, пищевой продукции и изучаемые в данной теме НИР.....	25
3.1.1. Листерии и листериоз. Бактерия – <i>L. monocytogenes</i>	26
3.1.2. Протей – <i>Proteus vulgaris</i> и <i>Proteus mirabilis</i>	76
3.1.3. Иерсинии и кишечный иерсиниоз. Бактерии - <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i>	92
3.1.4. Псевдомоноз и псевдомонады. Бактерия – <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>	116
3.1.5. Аэромоноз и аэромонады. Бактерии - <i>Aeromonas hydrophila</i>	133
3.1.6. Аэромоноз, вызываемый бактериями <i>Aeromonas salmonicida</i>	183
3.1.7 Энтеробактериозы и бактерии <i>Enterobacter spp.</i>	204
3.2. Подходы к деконтаминации пищевых полуфабрикатов	211
4. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	231
4.1. Методология НИР	232

5. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	256
1.1. Фенотипическая характеристика (биологические свойства и морфологическая структура) изолированных штаммов-кандидатов бактериофагов, лизирующих бактерии, вызывающие микробиологическую порчу	257
5.1.1 Бактериофаги бактерий рода <i>Proteus</i>	257
5.1.2 Бактериофаги <i>Aeromonas salmonicida</i>	268
5.1.3 Бактериофаги бактерий <i>Aeromonas hydrophila</i>	276
5.1.4. Бактериофаги бактерий рода <i>Listeria</i>	284
5.1.5. Бактериофаги бактерий <i>Yersinia enterocolitica</i>	288
5.1.6 Бактериофаги бактерий <i>Enterobacter</i>	294
5.1.7 Бактериофаги <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	299
5.2. Определение частоты возникновения фагорезистентных бактериальных мутантов	303
5.3 Модификация метода получения фаговой биомассы с высокой литической активностью и предельно низким содержанием токсинов. Подбор оптимальных значений температуры для культивирования бактериофагов.	304
5.4 Молекулярно-генетическая характеристика штаммов бактериофагов	306
5.5 Оценка безопасности технологического вспомогательного средства на основе коктейля оригинальных, вирулентных бактериофагов, активных в отношении бактерий-мишеней, вызывающих микробиологическую порчу охлажденной рыбы.	319
5.6 Оценка эффективности ТВС на основе бактериофагов для деконтаминации пищевого сырья	329
6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	342
7. ВЫВОДЫ	353
8. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ	354
9. ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	355
10. СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ	356
11. СПИСОК ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ	357
12. ИЛЛЮСТРАЦИИ	377

Д. А. Васильев, А. В. Алешкин, С. Н. Золотухин,
Н. А. Феоктистова, А. В. Мاستиленко, Э. Р. Зулъкарнеев,
И. А. Киселёва, А. Г. Шестаков, Е. В. Сульдина

**РАЗРАБОТКА БАКТЕРИОФАГОВЫХ БИОПРЕПАРАТОВ
ДЛЯ ДЕКОНТАМИНАЦИИ МИКРОФЛОРЫ,
ВЫЗЫВАЮЩЕЙ ПОРЧУ МЯСНОГО, РЫБНОГО СЫРЬЯ
И ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ
(БИОПРОЦЕССИНГ)**

НАУЧНАЯ МОНОГРАФИЯ

Печатается в авторской редакции.

Тираж 300 экз.

Отпечатано в типографии ООО «Колор-Принт».
г. Ульяновск, ул. Ленина, д. 75.
Тел.: (8422) 42-28-45, т/ф: 41-82-23.
www.color73.ru

ИЗДАННЫЕ НАУЧНЫЕ МОНОГРАФИИ И ЛЕКЦИИ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ИННОВАЦИОННОГО ЦЕНТРА МИКРОБИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ



БАКТЕРИОФАГИ ЗООАНТРОПОНОЗНЫХ И ФИТОПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Научное издание.

В монографии представлены результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновского государственного аграрного университета имени П. А. Столыпина и НИИЦМиБ по бактериофагам, проведенным за период с 2000 по 2017 года. Освещены вопросы по выделению, селекции и изучению биологических свойств бактериофагов микроорганизмов, представляющих определенный интерес как для практических ветеринарных и медицинских работников, микробиологов и биотехнологов, так и для научных сотрудников, аспирантов и студентов этих направлений. Также описаны схемы и параметры практического применения выделенных и селекционированных штаммов бактериофагов, разработанные авторами для целей индикации микроорганизмов в пат материале и объектах окружающей среды



А. Г. Шестаков, Д. А. Васильев, А. С. Терешкин,
Н. И. Молофеева, А. И. Калдыркаев.

КОМПСТИРОВАНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ОТХОДОВ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Научная монография

В результате проведенных исследований подобрана композиция на основе бактериальных штаммов и ферментного комплекса. Научно обоснованы и оптимизированы параметры иммобилизации полученного жидкого биопрепарата с целью продления сроков годности и консервации бактериальных клеток, а так же проведены промышленные испытания. Итогом работы описанной в монографии являются предложения по компостированию органических отходов перерабатывающим и сельскохозяйственным предприятиям.



Д. Р. Шапилова, Е. В. Макарова, Л. Ю. Данилова, Ю. Б. Васильева, Е. Н. Фролова, П. М. Седова, С. М. Шапилова

АНИМАЛОТЕРАПИЯ

Учебно-методическое пособие.

Данное учебно-методическое пособие предназначено для освоения учебного плана 36.05.01 Ветеринария (специалитет) и 36.02.01 Ветеринария (СПО). В пособии рассматриваются основные направления терапевтического воздействия животных на детей, описана история возникновения, методы реабилитации, профилактики и лечения, взаимодействия ребенка с кошками, собаками, лошадьми, кроликами и другими животными.

Изложенный материал по основным видам анималотерапии входит в проект «Детский реабилитационный центр КРЕПЫШ».

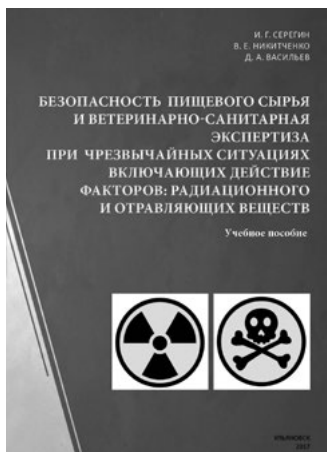


Д. А. Васильев, И. Г. Швиденко, С. Н. Золотухин

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ПО МЕТОДАМ ОБЩЕЙ БАКТЕРИОЛОГИИ

Предназначено для студентов и аспирантов обучающихся на кафедре микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ, факультета ветеринарной медицины и биотехнологии.

Предлагаемое учебно-методическое пособие не может заменить практическую работу в лаборатории кафедры, и это не лабораторный практикум в его классическом понимании, но оно позволит студентам лучше подготовиться к экзаменам как по первому модулю, так и по всему курсу микробиологии, а аспирантам быстрее вникнуть в работу с микроорганизмами. Данное учебно-методическое пособие подготовлено применительно к вузовскому курсу для студентов факультета ветеринарной медицины и биотехнологии.

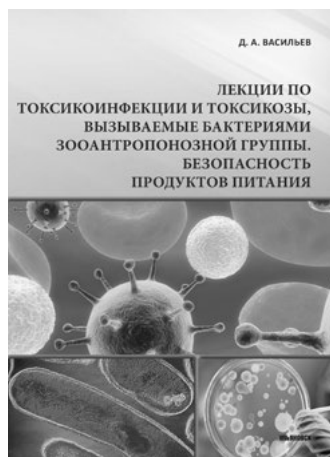


И. Г. Серегин, В. Е. Никитченко, Д. А. Васильев

БЕЗОПАСНОСТЬ ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ И ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ЭКСПЕРТИЗА ПРИ ЧРЕЗВЫЧАЙНЫХ СИТУАЦИЯХ ВКЛЮЧАЮЩИХ ДЕЙСТВИЕ ФАКТОРОВ РАДИАЦИОННОГО И ОТРАВЛЯЮЩИХ ВЕЩЕСТВ.

Учебное пособие.

Авторы - И. Г. Серегин, В. Е. Никитченко - профессора Университета дружбы народов г. Москва и Д. А. Васильев - профессор зав. кафедрой МВЭ и ВСЭ УлГАУ стремились в доступной форме ознакомить студентов с особенностями ветеринарно-санитарной экспертизы и оценки безопасности продуктов убоя в условиях чрезвычайной ситуации обусловленной радиационными факторами или отравляющими веществами, а также способами обезвреживания мяса и мерах личной безопасности в выше указанных ситуациях. Раздел по ЧС, на наш взгляд, недостаточно показан в учебнике и данные лекции могут быть дополнением к учебным материалам по специальностям «Ветеринария» и «Ветеринарно-санитарная экспертиза». Предлагаемое учебное пособие так же может являться дополнительным материалом к разделам учебных программ: «Технология продукции и организация общественного питания», «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции», «Зоотехния», которые связаны с производством пищевого сырья и продуктов питания.

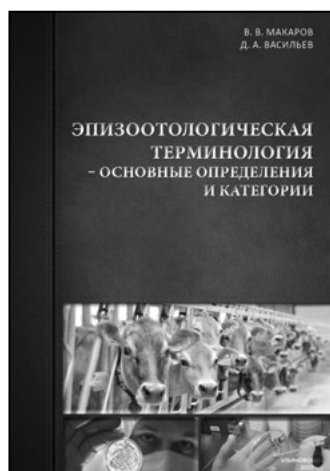


Д. А. Васильев

ЛЕКЦИИ ПО «ТОКСИКОИНФЕКЦИИ И ТОКСИКОЗЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ БАКТЕРИЯМИ ЗООАНТРОПОЗНОЙ ГРУППЫ. БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ»

Учебное пособие для студентов обучающихся: на специалитете, бакалавриате, магистратуре и аспирантуре на факультете ветеринарной медицины и биотехнологии УлГСХА.

Предлагаемое учебное пособие издается кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы согласно ее плану (протокол заседания кафедры № 6 от 02.02.94 г.), целью которого является оперативный выпуск отдельных изданий. Это позволяет дать студенту либо новую научную или инструктивную информацию, либо более подробно разъяснить ключевые положения разделов учебных дисциплин, преподаваемых на кафедре.



В. В. Макаров, Д. А. Васильев

ЭПИЗОТОЛОГИЧЕСКАЯ ТЕРМИНОЛОГИЯ – ОСНОВНЫЕ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И КАТЕГОРИИ

В данном учебном пособии освещены наиболее употребляемые определения и категории, составляющие основу понятийного аппарата общей эпизоотологии и инфектологии. Приводимые трактовки базируются на современных представлениях и достижениях отечественной и зарубежной науки.

Учебное пособие подготовлено кафедрой ветеринарной патологии РУДН и кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ УГСХА на основе читаемого для студентов специальности *ветеринария* курса *эпизоотология и инфекционные болезни*.



Д. А. Васильев, Н. А. Феоктистова

БИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИВЕРСИЯ И РОЛЬ ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТОВ В ЕЁ РАСПРОСТРАНЕНИИ

Учебное пособие

В учебном пособии приводится обзор литературы по биологической диверсии и роль пищевых продуктов в её распространении, написанный на материалах научных публикаций.

Пособие включает две лекции: первая лекция «Генетическое (биологическое) оружие» и вторая – «Правда о нашем хлебе».



Д. А. Васильев, Н. А. Феокистова
ЯДОВИТЫЕ РАСТЕНИЯ УЛЬЯНОВСКОЙ ОБЛАСТИ
 Учебное пособие.

Учебное пособие предназначено для освоения учебного плана 36.03.01 – Ветеринарно-санитарная экспертиза (бакалавриат), 19.03.04 – Технология продукции и организация общественного питания (бакалавриат), 36.04.01 – Ветеринарно-санитарная экспертиза (магистерская программа), 36.04.02 – Зоотехния (магистерская программа).



Д. А. Васильев
ЛЕКЦИИ ПО ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ МОЛОКА И МОЛОКОПРОДУКТОВ. БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ (ТОВАРОВЕДЕНИЕ).

Для бакалавров, магистров, аспирантов по направлениям и профилям – ветеринарный врач, ветеринарно-санитарная экспертиза, товароведение, технология производства и переработки продукции сельского хозяйства, технология продукции и организация общественного питания.

Предлагаемое учебное пособие издается кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы согласно ее плану (протокол заседания кафедры № 6 от 02.02.94 г.), целью которого является оперативный выпуск отдельных изданий. Это позволяет дать студенту либо новую научную или инструктивную информацию, либо более подробно разъяснить ключевые положения разделов учебных дисциплин, преподаваемых на кафедре.



Д. А. Васильев, Н. А. Феокистова, А. А. Нафеев,
 Е. И. Климушкин, С. Н. Золотухин, Н. И. Пелевина
СОЗДАНИЕ КАДАСТРА СИБИРЕЯЗВЕННЫХ ОЧАГОВ НА ТЕРРИТОРИИ УЛЬЯНОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Учебное пособие предназначено освоения для учебного плана 36.04.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза, 06.04.01 Биология, 36.04.02 Зоотехния (магистерские программы) и 03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии), 03.02.03 Микробиология, 06.02.02 Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология (аспирантура).



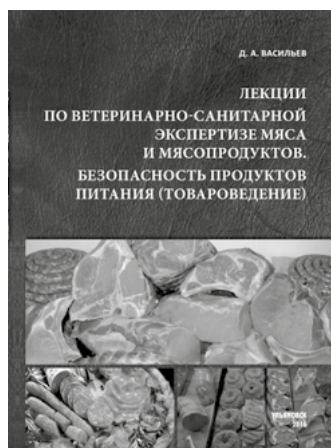
Д. А. Васильев

ЛЕКЦИИ ПО ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ

ПРИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЯХ С/Х ЖИВОТНЫХ. БЕЗОПАСНОСТЬ ПОЛУЧАЕМОГО ПИЩЕВОГО СЫРЬЯ

Для бакалавров, магистров, аспирантов по направлениям и профилям – ветеринарный врач, ветеринарно-санитарная экспертиза, товароведение, технология производства и переработки продукции сельского хозяйства

Предлагаемое учебное пособие издается кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы согласно ее плану (протокол заседания кафедры № 6 от 02.02.94 г.), целью которого является оперативный выпуск отдельных изданий. Это позволяет дать студенту либо новую научную или инструктивную информацию, либо более подробно разъяснить ключевые положения разделов учебных дисциплин, преподаваемых на кафедре.



Д. А. Васильев

ЛЕКЦИИ ПО ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНОЙ ЭКСПЕРТИЗЕ МЯСА И МЯСОПРОДУКТОВ.

БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ (ТОВАРОВЕДЕНИЕ).

Для студентов, бакалавров, магистров, аспирантов факультета ветеринарной медицины и биотехнологии.

Предлагаемое учебное пособие издается кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы согласно ее плану (протокол заседания кафедры № 6 от 02.02.94 г.), целью которого является оперативный выпуск отдельных изданий. Это позволяет дать студенту либо новую научную или инструктивную информацию, либо более подробно разъяснить ключевые положения разделов учебных дисциплин, преподаваемых на кафедре.

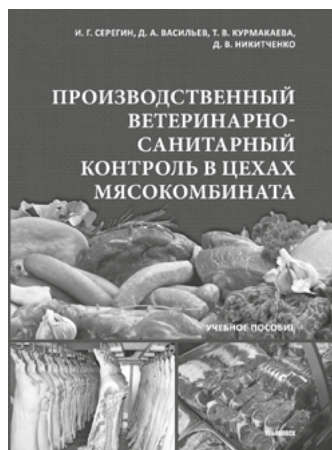


А. В. Алешкин

ЛЕКЦИИ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ И ПРИМЕНЕНИЮ БАКТЕРИОФАГОВ

Для студентов и аспирантов факультета ветеринарной медицины и биотехнологии Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии.

Предлагаемое учебное пособие издается кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы согласно ее плану (протокол заседания кафедры № 6 от 02.02.94 г.), целью которого является оперативный выпуск отдельных изданий. Это позволяет дать студенту либо новую научную или инструктивную информацию, либо более подробно разъяснить ключевые положения разделов учебных дисциплин, преподаваемых на кафедре.



И. Г. Серегин, Д. А. Васильев, Т. В. Курмакаева, Д. В. Никитченко.
**ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНЫЙ
 КОНТРОЛЬ В ЦЕХАХ МЯСОКОМБИНАТА**
 Учебное пособие.

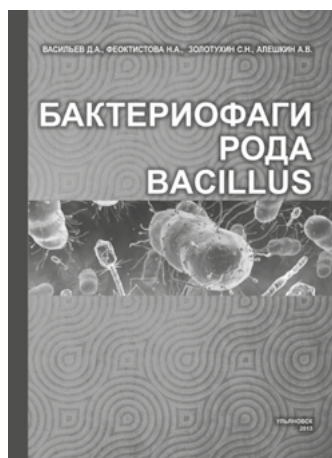
Данное учебное пособие предназначено для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности 36.05.01 — Ветеринария (квалификация «ветеринарный врач»), и по направлению подготовки 36.03.01 — Ветеринарно-санитарная экспертиза (квалификация (степень) — «бакалавр», а также слушателей курса повышения квалификации практических ветеринарных врачей.



БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОДОВОЛЬСТВЕННОГО СЫРЬЯ И ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ

Для студентов, бакалавров, магистров, аспирантов факультета ветеринарной медицины и биотехнологии.

Предлагаемое учебное пособие издается кафедрой микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы согласно ее плану (протокол заседания кафедры № 6 от 02.02.94 г.), целью которого является оперативный выпуск отдельных изданий. Это позволяет дать студенту либо новую научную или конструктивную информацию, либо более подробно разъяснить ключевые положения разделов учебных дисциплин, преподаваемых на кафедре.



Д. А. Васильев, Н. А. Феокистова, С. Н. Золотухин, А. В. Алешкин
БАКТЕРИОФАГИ РОДА *BACILLUS*
 Научное издание.

В книге приводится анализ литературы по бактериофагам рода *Bacillus*, включая фаги *Bacillus anthracis*, написанный на материалах научных публикаций в полувековом разрезе. Описана морфология и ультраструктура бациллярных вирусов, дана характеристика наиболее изученным бактериофагам, приведены данные по распространению и применению фагов *Bacillus*.

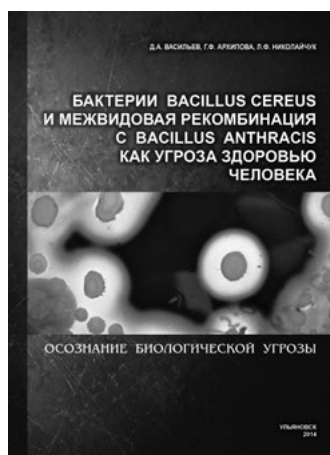
Книга рассчитана на вирусологов, микробиологов, биологов, биофизиков, биохимиков, работающих с бактериальными вирусами, а также на студентов и аспирантов, биологических и медицинских специальностей.



Д. А. Васильев, Е. Н. Ковалева, С. Н. Золотухин
ЛИСТЕРИОЗНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ
 Научное издание.

В книге приводится обзор отечественных и иностранных публикаций по тематике бактериофагов бактерий рода *Listeria*. Описаны методики выделения и изучения основных биологических свойств листерийных бактериофагов, дана характеристика изученным фагам, приведены данные по практическому применению фагов рода *Listeria*.

Книга рассчитана на вирусологов, микробиологов, биологов, биофизиков, биохимиков, работающих с бактериальными вирусами, а также студентов и аспирантов, биологических и медицинских специальностей.



Д. А. Васильев, Г. Ф. Архипова, Л. Ф. Николайчук
БАКТЕРИИ BACILLUS CEREUS И МЕЖВИДОВАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ С BACILLUS ANTHRACIS КАК УГРОЗА ЗДОРОВЬЮ ЧЕЛОВЕКА
 Научное издание.

В течение нескольких лет на кафедре Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии проводятся исследования по выяснению возможной степени опасности для животных и человека бактерий вида *Bacillus cereus*, как инфекционного агента, способного вызывать отравление бактериальным токсином, схожим по патогенезу действия с сибиреязвенным. Эта тема НИР является продолжением исследований проводимых в НИИ ВВиМ. В монографии представлены материалы по распространению *Bacillus cereus* в пищевых продуктах, а также результаты получения межвидовых рекомбинантных штаммов рода *Bacillus*, в частности *Bacillus cereus* и *Bacillus anthracis*, что в естественных условиях может привести к возникновению бактерий-«химер» и создавать трудности при установлении диагноза. Наличие механизма рекомбинации у бактерий создаёт предпосылки для передачи некоторых биологических свойств от сибиреязвенного микроорганизма к бациллам других видов, в частности, *Bacillus cereus*, что может значительно усложнять диагностику и лечение заболеваний (пищевых отравлений) у человека.



БАКТЕРИОФАГИ МИКРООРГАНИЗМОВ ЗНАЧИМЫХ, ДЛЯ ЖИВОТНЫХ, РАСТЕНИЙ И ЧЕЛОВЕКА
 Научное издание.

Результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П. А. Столыпина

В монографии представлены результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии им. П. А. Столыпина, по бактериофагам, проведенные за последние 15 лет. Освещены вопросы по выделению, селекции и изучению биологических свойств бактериофагов микроорганизмов, представляющих определенный интерес как для практических ветеринарных и медицинских работников, микробиологов и биотехнологов, так и для научных сотрудников, аспирантов и студентов этих направлений. Также описаны схемы и параметры практического применения выделенных и селекционированных штаммов бактериофагов, разработанные авторами.



Н. А. Феоктистова, Д. А. Васильев
**ЛЕКЦИИ ПО ТОВАРОВЕДЕНИЮ
 ПРОДОВОЛЬСТВЕННЫХ ТОВАРОВ**

Курс лекций предназначен для освоения программы по дисциплине «Товароведение продовольственных товаров» обучающимися по направлению подготовки 19.03.04 - Технология продукции и организация общественного питания.

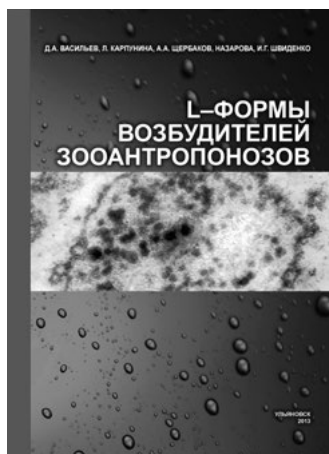


Д. А. Васильев, А. И. Калдыркаев, Н. А. Феоктистова,
 А. В. Алёшкин
**ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИЙ *BACILLUS CEREUS*
 НА ОСНОВЕ ИХ ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ
 ХАРАКТЕРИСТИКИ**

Научное издание.

Книга «Идентификация бактерий *Bacillus cereus* на основе их фенотипической характеристики» является иллюстративным источником бактериологических тестов используемых для идентификации бактерий *Bacillus cereus*, позволяющим внести ясность в схему таксономической систематики бактерий данного вида. Достоинства книги – подробное описание и иллюстративное сопровождение классических бактериологических тестов, воспроизводимых в условиях стандартной бактериологической лаборатории.

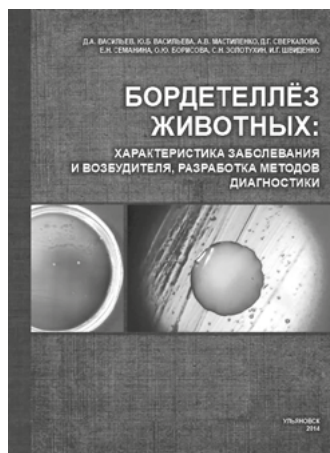
Книга может служить практическим справочным пособием для специалистов-бактериологов, работающих в области биологии, медицины, ветеринарии, биотехнологии, агрономии и пищевой промышленности.



Д. А. Васильев, Л. Карпунина, А. А. Щербаков, Назарова,
 И. Г. Швиденко
Л-ФОРМЫ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ЗООАНТРОПОНОЗОВ
 Научное издание.

В предлагаемой монографии приводятся данные об L-форме микроорганизмов: их структура на светооптическом и электронномикроскопическом уровнях, условиях культивирования, методах диагностики. Подробно описываются L-формы микроорганизмов, играющих важную роль в патологии сельскохозяйственных животных и человека: бруцеллы, микобактерии туберкулеза, листерии, возбудитель рожи свиней, энтеробактерии, бацилл, чумной микроб.

Включены материалы, полученные с помощью новых методов: полимеразной цепной реакции, иммуноферментного и радиоиммунного анализа и др. Описываются так называемые некультивируемые микроорганизмы. В книге представлены и оригинальные результаты исследований в данном направлении.



Д. А. Васильев, Ю. Б. Васильева, А. В. Мاستиленко,
Д. Г. Сверкалова, Е. Н. Семанина, О. Ю. Борисова, С. Н. Золотухин,
И. Г. Швиденко

БОРДЕТЕЛЛЁЗ ЖИВОТНЫХ: ХАРАКТЕРИСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЯ И ВОЗБУДИТЕЛЯ, РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ

Научное издание.

Издание знакомит с эпизоотологией, диагностикой и профилактикой бордетеллёза. В работе приведены результаты исследований по изучению биологии бактерий *Bordetella bronchiseptica*, методам их индикации и идентификации полученные исследовательской группой по бордетеллёзу кафедры микробиологии.

Книга ориентирована на работников бактериологических лабораторий, ветеринарных специалистов, преподавателей, аспирантов, студентов ветеринарных факультетов, а также владельцев домашних животных.

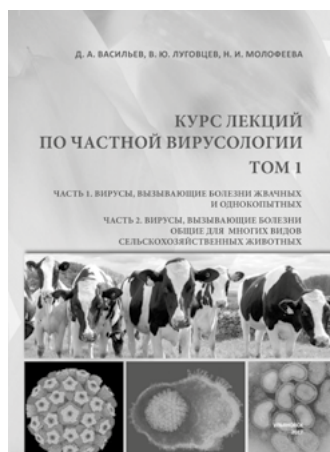


И. А. Бакулов, Д. А. Васильев, Е. Н. Ковалева, И. Ю. Егорова,
Ю. О. Селянинов

ЛИСТЕРИИ И ЛИСТЕРИОЗ

Монография.

В монографии представлены результаты исследований по листериозу более чем за полвека, полученные коллективом научной школы академика РАСХН И. А. Бакулова, а также материалы зарубежных исследователей.



Д. А. Васильев, В. Ю. Луговцев, Н. И. Молофеева.

КУРС ЛЕКЦИЙ ПО ЧАСТНОЙ ВИРУСОЛОГИИ.

В двух томах.

Часть 1. Вирусы, вызывающие болезни жвачных и однокопытных. Часть 2. Вирусы, вызывающие болезни общие для многих видов сельскохозяйственных животных

Учебное пособие.



**Кафедра микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы
Ульяновский ГАУ им. П. А. СТОЛЫПИНА**

В монографии представлены результаты научно-исследовательской работы, выполняемой высшим учебным заведением, подведомственным Министерству сельского хозяйства Российской Федерации, УлГАУ, за счет средств федерального бюджета по заказу Министерства сельского хозяйства Российской Федерации в 2017 году по теме: «Разработка бактериофаговых биопрепаратов для деконтаминации микрофлоры, вызывающей порчу мясного, рыбного сырья и готовой продукции (биопроессинг)». Проведенные исследования по выделению селекции и изучению биологических свойств бактериофагов, специфичных для бактерий *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Yersinia enterocolitica*, *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.*, и разработанный алгоритм промышленного фаг-опосредованного биопроессинга позволили сформировать теоретические предпосылки по созданию нового для Российской Федерации класса технологических вспомогательных средств на основе бактериофагов – продукта для деконтаминации пищевого сырья и продуктов питания.