

На правах рукописи

ЗУЛЬКАРНЕЕВ ЭЛЬДАР РИНАТОВИЧ

**РАЗРАБОТКА СРЕДСТВА ДЕКОНТАМИНАЦИИ И ПРОДЛЕНИЯ СРОКА
ГОДНОСТИ ОХЛАЖДЕННОЙ РЫБЫ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИОФАГОВ**

03.02.03 - микробиология

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Астрахань – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор Рубальский Олег Васильевич

доктор биологических наук Алешкин Андрей Владимирович

Официальные оппоненты:

Мирошников Константин Анатольевич – доктор химических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, лаборатория молекулярной биоинженерии, руководитель лаборатории

Пименов Николай Васильевич - доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина», кафедра биологии и патологии мелких домашних, лабораторных и экзотических животных, профессор кафедры

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Астраханский государственный технический университет»
Федерального агентства по рыболовству

Защита состоится «___» _____ 2017 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, д.10., <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор медицинских наук, доцент

Ольга Юрьевна Борисова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Применяемые в пищевой промышленности современные технологии деконтаминации и продления сроков годности продуктов питания, в том числе охлажденной рыбы, не являются надежными, как с точки зрения предохранения последних от микробной порчи, так и в качестве средств защиты потенциальных потребителей от патогенных агентов, о чем свидетельствует непрерывное увеличение числа регистрируемых случаев инфекций, передаваемых пищевым путем (Food-born infections – FBI), возбудителями которых являются *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli*, *Listeria* и др. (Акимкин В.Г., и др., 2002; Altekruze S. F., et al., 1997; DuPont H. L., 2007; Garcia P., 2008).

В связи с возможностью попадания микродоз антибиотиков с пищевыми продуктами в организм человека и стремительным формированием антибиотикорезистентных штаммов бактерий – возбудителей инфекций, передаваемых пищевым путем, производители продуктов питания, в том числе рыбоперерабатывающего сектора, с конца 1990-х годов ограничили применение химических антибактериальных агентов, используемых при переработке пищевых полуфабрикатов, что стало одним из ведущих факторов увеличения количества случаев рассматриваемой категории инфекционных заболеваний (Beutin L., 2006).

В качестве инновационных средств деконтаминации, используемых при переработке охлажденной рыбы, рядом авторов предложены природные антибактериальные агенты – бактериофаги (вирусы бактерий), характеризующиеся специфической способностью к инфицированию и последующему лизису бактериальных клеток (Алешкин А.В., и др., 2013; Sulakvelidze A., 2013). Бактериофаги могут применяться на каждом из этапов пищевого производственного континуума: от прижизненной санации гидробионтов до биопроцессинга полуфабрикатов с целью элиминации эпидемиологически значимых бактерий и увеличения сроков хранения продукции (O'Flynn G., et al., 2004; Sharma M., et al., 2009; Soni K.A., et al., 2010; Bigot B., et al., 2011; Spricigo D.A., et al., 2013; Endersen L., et al., 2014).

Степень разработанности темы исследования

С 2006 года, после регистрации и признания Управлением по продовольствию и медикаментам США (US FDA) фагосодержащего технологического вспомогательного средства – processing aid, на основе поливалентного листериозного коктейля бактериофагов ListShield (Intralytix, США), позволяющего производить обработку готового к употреблению мяса домашних животных, птиц, охлажденной рыбы и морепродуктов, «абсолютно безопасной» – Generally Recognised as Safe (GRAS), в Америке и странах западной Европы начали появляться биотехнологические компании (Intralytix Inc., Miceos Inc., OmniLytics Inc.), активно разрабатывающие эффективные технологические вспомогательные средства (ТВС) для деконтаминации пищевых продуктов от эпидемиологически значимых штаммов бактерий с целью снижения риска возникновения спорадических случаев и вспышек инфекций, передаваемых пищевым путем (Guenther S. and Loessner M., 2009; Soni K., 2010). В то время как в Российской Федерации до сегодняшнего дня нет ни одного зарегистрированного технологического вспомогательного средства на основе бактериофагов, используемого для деконтаминации и продления сроков годности пищевых полуфабрикатов, включая охлажденную рыбу.

Цель исследования:

Создание безопасного и эффективного средства деконтаминации на основе поливалентного коктейля бактериофагов, активного в отношении бактериальных патогенов, вызывающих как порчу охлажденной рыбы, так и кишечные инфекции у человека.

Задачи исследования:

1. Определить основные виды бактерий, являющиеся причиной порчи охлажденной рыбы, а также вызывающие острые кишечные и пищевые токсикоинфекции у человека.

2. Изолировать из объектов окружающей среды и отобрать, используя фенотипическую и молекулярно-генетическую оценку, производственно-перспективные штаммы бактериофагов, активные в отношении бактериальных патогенов, вызывающих порчу охлажденной рыбы.

3. Разработать рецептуру, пилотную технологию получения технологического вспомогательного средства на основе бактериофагов, а также алгоритм фаг-опосредованного биопроцессинга охлажденной рыбы в лабораторных условиях. Определить срок годности и условия хранения фагосодержащего средства.

4. Подтвердить безопасность использования средства биодеконтаминации охлажденной рыбы на лабораторных животных.

5. Оценить эффективность технологического вспомогательного средства на основе бактериофагов в соответствии с разработанным алгоритмом фаг-опосредованного биопроцессинга в условиях реального рыбоперерабатывающего предприятия.

Научная новизна исследования

Выявлены определенные закономерности, подтверждающие взаимосвязь нарастания количества бактерий видов *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas putida*, *Raoultella ornithinolytica*, *Citrobacter freundii*, *Listeria monocytogenes* и органолептических изменений, характеризующих порчу охлажденных гидробионтов.

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 *P. fluorescens*, *A. hydrophila*, *P. putida*, *R. ornithinolytica*, *C. freundii*, *L. monocytogenes*, вызывающих порчу охлажденной рыбы и инфекции, передаваемые пищевым путем у человека, сконструировано эффективное средство деконтаминации охлажденной рыбы.

Сформирована и адаптирована многоступенчатая схема контрольно-испытательных мероприятий новой категории биоконсервантов - технологических вспомогательных средств на основе бактериофагов.

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

На базе одного из ведущих предприятий рыбоперерабатывающей отрасли Российской Федерации создан алгоритм промышленного фаг-опосредованного биопроцессинга охлажденной рыбы, позволяющий продлевать срок годности данной категории полуфабрикатов и снижать риск заражения инфекциями, передаваемыми пищевым путем при их употреблении.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенные исследования, разработанный проект нормативно-технической документации и алгоритм промышленного фаг-опосредованного биопроцессинга позволили сформировать теоретические предпосылки для создания нового для Российской Федерации класса технологических вспомогательных средств на основе бактериофагов.

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

Разработан проект нормативно-технической документации на технологическое вспомогательное средство на основе коктейля бактериофагов, включающий: рецептуру, технические условия, технологическую инструкцию и проект этикетки.

Подана заявка на патент на изобретение РФ № 2016150928 от 23.12.2016 г. содержащая оптимальный фаговый состав, способ получения и метод применения технологического вспомогательного средства для обработки охлажденной рыбы.

Разработанное средство деконтаминации охлажденной рыбы на основе коктейля бактериофагов и успешно апробированный на крупном рыбоперерабатывающем предприятии метод фаг-опосредованного биопроцессинга позволит увеличить на 5 суток срок годности данной категории полуфабрикатов и снизит риск развития sporadic случаев и вспышек инфекций, передающихся пищевым путем.

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы спланирована в соответствии со структурой и задачами исследования. Предметом исследования стала разработка технологического вспомогательного средства деконтаминации охлажденной рыбы на основе коктейля бактериофагов. Объектами исследования выступали штаммы патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также бактериофаги, изолированные нами из объектов окружающей среды. Научная литература, посвященная исследованиям бактериофагов, была проанализирована формально-логическими методами. В работе использованы микробиологические, иммунохимические, молекулярно-генетические, масс-спектрометрические, электронно-микроскопические и статистические методы исследования.

Образцы охлажденной рыбы

Образцы охлажденной рыбы (сибас, радужная форель) были приобретены в торговых сетях города Москвы. Для лабораторных экспериментов по фаг-опосредованной деконтаминации использовали искусственно и естественно контаминированные куски рыбы (мышечные волокна с чешуей) массой от 1 до 10 г и площадью обрабатываемой поверхности не более 5×5 см. В процессе моделирования микробиологического загрязнения штаммами-мишенями, образцы предварительно подвергали деконтаминации в 70°C спирте, а затем отмывали от последнего 0,9% раствором натрия хлорида.

Для фаг-опосредованного биопроцессинга на рыбоперерабатывающем предприятии использовали 48 тушек потрошённой на конвейере радужной форели массой 600-700 г.

Штаммы микроорганизмов

В работе были использованы культуры *A. hydrophila*, *P. fluorescens*, *C. freundii*, *L. monocytogenes*, *R. ornithinolytica* и *P. putida* в количестве 197 штаммов, выделенных с поверхности рыб, приобретенных в сетях гг. Москвы, Ульяновска, Астрахани, а также тушек конвейерно потрошенной рыбы и элементов технологического оборудования одного из рыбоперерабатывающих заводов Республики Карелия.

В ходе работы, из образцов сточных вод Московской области и других объектов окружающей среды, были выделены 15 бактериофагов-кандидатов, активных в отношении бактерий-мишеней, представленных выше.

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 ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора в соответствии с СП № 2.2.1. 3218-14.

Бактериологические методы

Выделение и идентификацию микроорганизмов проводили по общепринятым методикам (Хоулт Дж., Криг Н., Снит П., 1997; Приложение №1 к приказу Министерства здравоохранения СССР от 22 апреля 1985 г. №535). Родовую принадлежность культур устанавливали на средах Эндо (ФГУП «НПО Микроген»), желточно-солевом, кровяном и хромогенном агаре уриселект 4 (Bio-Rad, США). Бактерии *Listeria monocytogenes* выявляли по ГОСТ 32031-2012 с использованием бульона Фразера (Himedia, India) с последующим пересевом на Chromocult Listeria Selective Agar Base асс. OTTAVIANI and AGOSTI (Merck KGaA, Germany) из последовательных разведений образцов (1:10).

Масс-спектрометрический метод

Подтверждение родовой и видовой принадлежности штаммов микроорганизмов проводили масс-спектрометрическим методом на приборе VITEK MS («bioMérieux», Франция) согласно инструкции производителя оборудования.

Испытания на животных

При разработке процедур оценки безопасности отдельных производственно-перспективных штаммов фагов и коктейля фаголизатов на лабораторных животных использовали методы оценки токсичности из «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Хабриев Р.У., 2005) и «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Иммунобиологические лекарственные средства) (Миронов А.Н., 2013).

Методы изолирования и изучения биологических свойств бактериофагов

Выделение бактериофагов и изучение их биологических свойств проводили методами, предложенными М. Adams (1959) и Д.М. Гольдфарбом (1961). Для определения титра фаговых частиц и морфологии негативных колоний использовали метод Грациа (1936) и метод Аппельмана (1961).

Метод аффинной хроматографии использовали для удаления эндотоксинов в полученных фаголизатах. Очистку проводили на хроматографической колонке Endo Trap ND (Hyglos GmbH, Германия) с использованием буферных растворов фирмы производителя.

Электронно-микроскопическое исследование бактериофагов, контрастированных уранилацетатом, проводили на микроскопе JEM-100CX (JEOL, Япония) при конечном увеличении 80000х.

Молекулярно-генетические методы

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-Сорб (ООО «НПФ Синтол», Россия) согласно протоколу производителя.

Подготовка к секвенированию и непосредственно секвенирование.

Определение полных нуклеотидных последовательностей проводили при помощи полупроводникового секвенирования второго поколения на платформе Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, США).

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 эквимолярно 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 секвенированных геномов проведен с использованием пакета программного обеспечения NEWBLER (Roche Diagnostics), UGENE (Унипро, Россия), BLAST Ring Image Generator (BRIG), PHACTS (San Diego State University, США) и интернет-ресурса BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Оценка параметров микробиологической безопасности охлажденной рыбы

КМАФАнМ определяли согласно ГОСТ 10444.15-94. Результаты подсчета количества колоний пересчитывали на 1 г или см² продукта по ГОСТ 26670-91.

Статистические методы обработки данных

Статистическую обработку результатов (вычисление средних арифметических значений и стандартного отклонения) проводили с использованием статистических ресурсов программы Microsoft Excel 2016.

Личное участие автора в получении результатов

Автором составлен план исследования, проведен аналитический обзор литературы, определены ведущие патогены, вызывающие порчу охлажденной рыбы, изолированы из объектов окружающей среды бактериофаги-кандидаты, литически активные в отношении идентифицированного спектра бактерий, выполнен весь объем микробиологических исследований бактериофагов и

бактериальных штаммов-мишеней, отработана технология получения готового технологического вспомогательного средства, проведены его доклинические испытания, а также оценка эффективности в лабораторных и производственных условиях на базе полномасштабного рыбоперерабатывающего предприятия.

Полногеномное секвенирование и анализ сиквенса проведен совместно с младшим научным сотрудником лаборатории прикладной иммунохимии ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского Роспотребнадзора Е.О. Рубальским. Электронная микроскопия проводилась на базе Института микробиологии РАН им. С. Н. Виноградского, при участии старшего научного сотрудника к.б.н. Е.Е. Куликова. Метод MALDI-TOF проводился на базе ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России совместно с профессором кафедры микробиологии и вирусологии д.м.н., профессором Ефимовым Б.А. и руководителем лаборатории диагностики дифтерийной и коклюшной инфекции ФБУН МНИИЭМ им Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора д.м.н., доцентом Борисовой О.Ю.

Положения выносимые на защиту:

1. Разработанный коктейль оригинальных вирулентных производственно-перспективных бактериофагов (*Aeromonas hydrophila* Ah 1, *Pseudomonas fluorescens* Pf 1, *Citrobacter freundii* Cf 1, *Listeria monocytogenes* Lm 1, *Raoultella ornithinolytica* Ro 1, *Pseudomonas putida* Psp6) безопасен в качестве действующего вещества технологического вспомогательного средства.

2. Технологическое вспомогательное средство на основе коктейля бактериофагов эффективно деконтаминирует охлажденную рыбу, пролонгируя срок годности данной категории полуфабрикатов и снижая риск возникновения инфекций, передающихся пищевым путем.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

О достоверности полученных результатов работы свидетельствует достаточный объем выборки анализируемых образцов (300 образцов почв, сточных вод, рыбных полуфабрикатов, экскрементов крупного рогатого скота, 224 патогенных и условно-патогенных штамма и изолята бактерий, 15 штаммов-кандидатов бактериофагов), использование сертифицированных бактериологических, биохимических и молекулярно-генетических методов и процедур доклинических испытаний, характеризующихся высокой специфичностью и чувствительностью. Комплексное бактериологическое, биохимическое и молекулярно-генетическое исследование бактериальных штаммов-мишеней и бактериофагов, а также доклинические испытания и оценка эффективности технологического вспомогательного средства позволило получить данные, сопоставимые с данными научной литературы, что также свидетельствует о достоверности полученных результатов.

Диссертация апробирована 01.12.2016 г. на расширенном межкафедральном заседании Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (протокол от 01.12.2016 г).

Материалы и результаты исследований представлены и обсуждены на Российских и международных конференциях и конгрессах: II научно-практическая конференция с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой

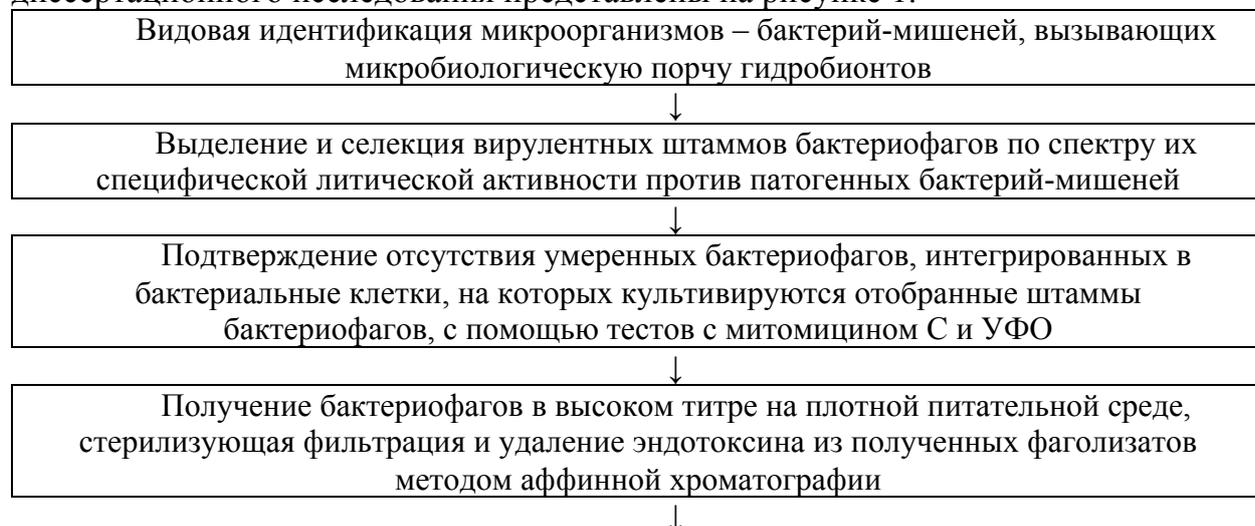
промышленности» (Санкт-Петербург, 2014 г.); V международная конференция ФизтехБИО (Долгопрудный, 2015 г.); XI научно-практическая конференция «Биомедицина и биомоделирование» (Светлые горы – Московская область, 2015 г.); Международная научно-практическая конференция «Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней» (Москва, 2015 г.); Международная научно-практическая конференция «Общие угрозы-совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней» (Москва, 2015 г.); VIII Ежегодный всероссийский конгресс по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2016 г.); III научно-практическая конференция с международным участием «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности» (Москва, 2016 г.); VIII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Москва, 2016 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 печатных работ, в том числе 4 - в рецензируемых изданиях, 9 – в сборниках материалов конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 152 страницах и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, результатов собственных исследований и их обсуждений, заключения, выводов, списка использованных литературных источников, приложений. Диссертация иллюстрирована 35 таблицами и 26 рисунками. Список литературы содержит 188 работ, в том числе 31 – отечественных и 157 – зарубежных публикаций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Отсутствие в Российской Федерации прецедентов по разработке, регистрации и применению новых категорий фагосодержащих средств, лимитировало «дорожную карту» наших исследований схемой, разработанной в лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, успешно зарекомендовавшей себя при работе с новыми категориями нелекарственной продукции. Этапы создания технологического вспомогательного средства в рамках настоящего диссертационного исследования представлены на рисунке 1.



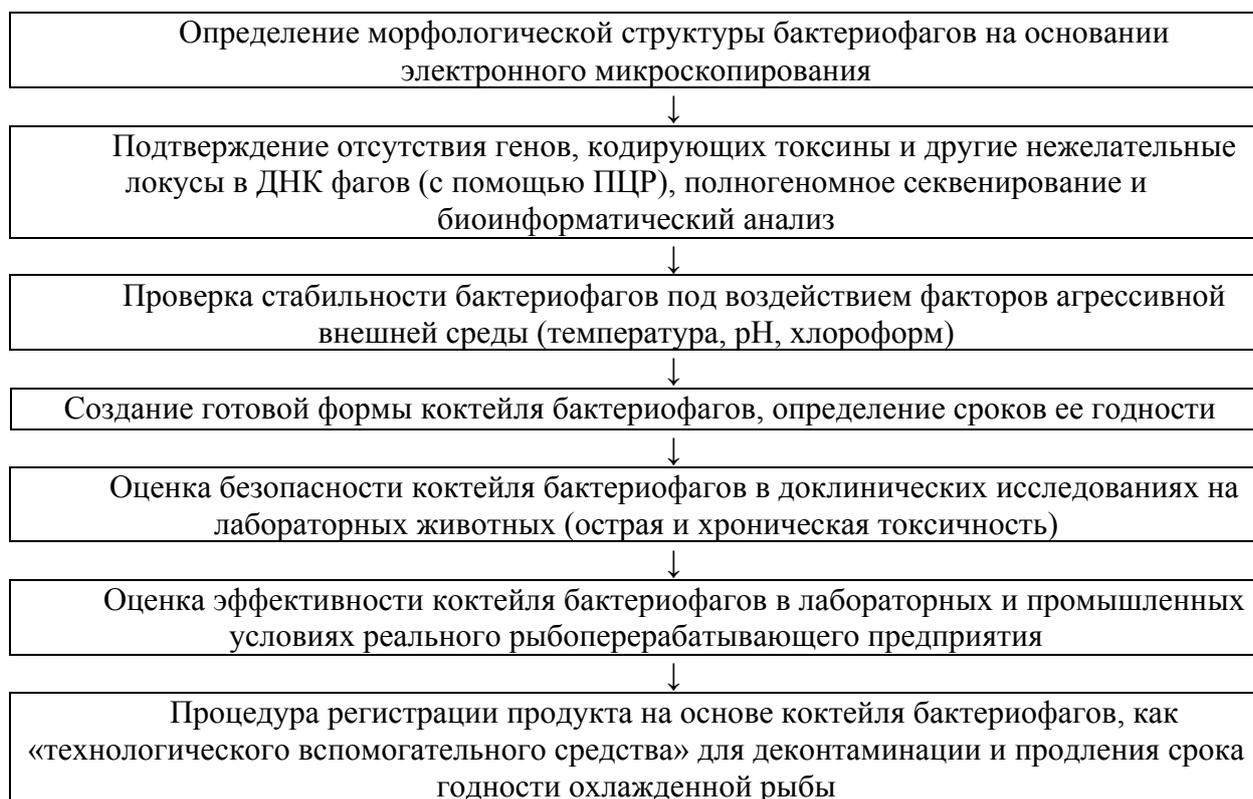


Рисунок 1 – Алгоритм создания технологического вспомогательного средства на основе бактериофагов

Разработка коктейля бактериофагов

Одной из первоочередных задач диссертационной работы было определение видов бактерий отвечающих за порчу гидробионтов, способных, при определенных условиях, вызывать инфекции, передающиеся пищевым путем, у людей. В ходе работы было идентифицировано 32 штамма *Ps. fluorescens*; 32 штамма *A. hydrophila*, 38 штаммов *Ps. putida*, 28 штаммов *C. freundii*, 24 штамма *R. ornithinolytica*, 43 штамма *L. monocytogenes*, 7 штаммов *Serratia liquefaciens*, 5 штаммов *Acinetobacter baumannii*, 3 штамма *Acinetobacter johnsonii*, 8 штаммов *A. salmonicida*, 4 штамма *A. veronii*, персистирующих на чешуе гидробионтов, выловленных в одном из форелеводческих хозяйств Республики Карелия, а также на поверхностях охлажденной рыбы, приобретенной в торговых сетях городов Москвы, Ульяновска и Астрахани. Нарастание титра штаммов, относящихся к *Ps. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Ps. putida*, *R. ornithinolytica*, *C. freundii*, *L. monocytogenes*, при холодильном хранении полуфабрикатов происходило значительно быстрее, чем остальных представителей микрофлоры гидробионтов. При увеличении их количества до 10^4 КОЕ/г и выше начинал изменяться цвет и запах продукции. Пожелтение мяса и появление запаха окислившегося жира соответствовало количеству данных бактерий, превышающих пороговое значение в ТР ТС 021/2011 (10^5 КОЕ/г), что позволило отнести данные микроорганизмы к бактериям вызывающим порчу.

Бактериальные штаммы из сформированного банка использовали для выделения и последующего определения спектра литической активности бактериофагов. Культуры, на которых удавалось достичь высоких значений титра бактериофагов, отбирали как штаммы-хозяева для получения одноименного бактериофага, лиофилизировали и закладывали на хранение. Для штаммов, используемых в качестве посевного материала при культивировании бактериофагов,

дополнительно подтверждали отсутствие в них лизогенных факторов с помощью метода химической индукции митомицином С и УФО.

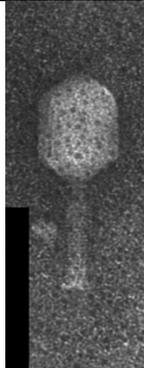
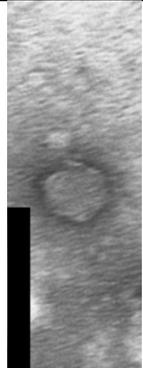
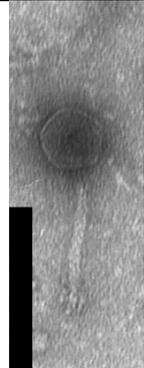
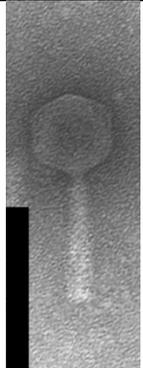
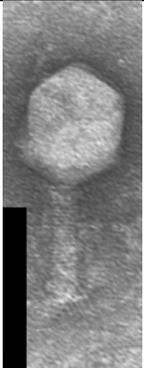
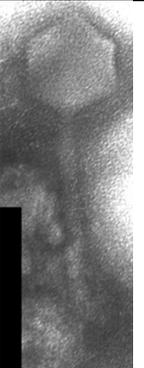
Таблица 1 – Мониторинг количества мезофильных аэробных и факультативно - анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) на поверхности охлажденной рыбы

Виды бактерий	Количество бактерий (КОЕ/см ²) на:		
	1 сутки	5 сутки	7 сутки
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	140±52,9	3,1×10 ⁴ ±0,5	3,1×10 ⁵ ±0,6
<i>Serratia liquefaciens</i>	54,3±23,7	67,6±14,3	59,6±5,6
<i>Acinetobacter baumannii</i>	18,6±4,0	43,2±6,5	33,6±2,5
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	17±1,7	54±3,8	47,6±12,1
<i>Aeromonas salmonicida</i>	26±5,2	143,1±14,7	128,3±19,5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	93,3±6,5	1,5×10 ³ ±0,3	7,2×10 ³ ±0,7
<i>Pseudomonas putida</i>	186±5,5	5,3×10 ⁴ ±0,7	1,2×10 ⁵ ±0,5
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	157±9,3	4,1×10 ² ±0,2	3,2×10 ⁴ ±1,4
<i>Aeromonas veronii</i>	35,5±3,4	83,3±2,5	67,2±6,3
<i>Citrobacter freundii</i>	63±7,6	6,5×10 ³ ±0,4	2,8×10 ⁴ ±1,1
<i>Listeria monocytogenes</i>	24,7±2,3	2,3×10 ³ ±0,5	4,3×10 ⁴ ±1,7
Органолептические свойства	Запах и внешний вид свежей рыбы в норме, жабры ярко-красного цвета, глаза выпуклые и прозрачные	Запах свежей рыбы, появилось изменение цвета, и плотность мышечных волокон снизилась. Жабры начали темнеть	Запах окислившегося жира, пожелтение мяса. Жабры серо-зеленого цвета, ввалившиеся потемневшие глаза

В ходе исследований нами были отобраны 6 производственно-перспективных штаммов бактериофагов, активных в отношении бактерий, приводящих к скорой порче продукции и способных вызывать инфекции, передаваемые пищевым путем, которые составили основу ТВС. Вирулентные штаммы бактериофагов отбирались на основании их фенотипической и молекулярно-генетической характеристики (заявка на патент на изобретение РФ № 2016150928). Основными биологическими свойствами, которые служили критериями отбора, были спектр литической активности, высокая урожайность на штамме-хозяине и устойчивость к негативным физическим и химическим факторам внешней среды (таблица 2).

Таблица 2 – Характеристика производственно-перспективных штаммов бактериофагов

Фаг	Ah1	Pfl	Psp6	Ro1	Cfl	Lml
Бактерия хозяин	<i>A. hydrophila</i> «ГКПМ-Оболensk» В-7964	<i>Ps. fluorescens</i> «ГКПМ-Оболensk» В-7967	<i>Ps. putida</i> «ГКПМ-Оболensk» В-7965	<i>R. ornithinolytica</i> «ГКПМ-Оболensk» В-7963	<i>C. freundii</i> «ГКПМ-Оболensk» В-7966	<i>L. monocytogenes</i> «ГКПМ-Оболensk» В-6643
Источник и место выделения	Сточные воды, Московская область	Сточные воды, Московская область	р. Волга, Ленинский район города Ульяновска	Сточные воды, Московская область	Сточные воды, Московская область	Экскременты овец, Астраханская область
Спектр литической активности	81,25%	81,3%	86%	66,5%	64%	100%
Отношение к хлороформу	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив
Температурная устойчивость	60	70	60	65	65	75

Продолжение таблицы 2						
Устойчивость к рН среды	5,2 – 9,6	3,6 – 9,6	3,6 – 9,6	5,2 – 9,6	8,0 – 9,6	8,0 – 9,6
Урожайность (титр), БОЕ/мл	10 ¹²	10 ¹²	10 ¹¹	10 ¹²	10 ¹²	10 ¹¹
Нуклеиновая кислота (размер генома)	Линейная дцДНК (221 т.п.н.)	Линейная дцДНК (39 т.п.н.)	Линейная дцДНК (42 т.п.н.)	Линейная дцДНК (145 т.п.н.)	Линейная дцДНК (171 т.п.н.)	Линейная дцДНК (131 т.п.н.)
Систематическое положение	Порядок <i>Caudovirales</i> Семейство <i>Myoviridae</i> Подсемейство <i>Tevenvirinae</i>	Порядок <i>Caudovirales</i> Семейство <i>Podoviridae</i> Род <i>T7likevirus</i>	Порядок <i>Caudovirales</i> Семейство <i>Siphoviridae</i>	Порядок <i>Caudovirales</i> Семейство <i>Myoviridae</i>	Порядок <i>Caudovirales</i> Семейство <i>Myoviridae</i>	Порядок <i>Caudovirales</i> Семейство <i>Myoviridae</i>
Наличие гомологов и % гомологии с известными штаммами бактериофагов	Bacteriophage Aeh1 – 76,56%	<i>Pseudomonas</i> phage phiPSA2 – 95,06%, <i>Pseudomonas</i> phage gh-1 – 86,24%	Отсутствуют	<i>Erwinia amylovora</i> phage phiEa104 – 98,0%, <i>Erwinia</i> phage vB_EamM-M7 – 87,12%	<i>Citrobacter</i> phage Moon – 89,28%, <i>Citrobacter</i> phage Merlin – 85,54%	<i>Listeria</i> phage P100 – 95 %
Электронные микрофотографии						

В ходе работы с бактериофагами были определены параметры инфекционного процесса в системе фаг-бактерия-хозяин, позволяющие оценить выход фаговых частиц из одной бактериальной клетки, время адсорбции бактериофага на клетках хозяина, а также частоту формирования фагорезистентных штаммов бактерий. Так у большинства бактериофагов около 70% фаговых частиц адсорбируется на клетке хозяине за 5 минут, после чего процесс замедляется и заканчивается к 15-25 минутам от начала литического цикла (рисунок 2).

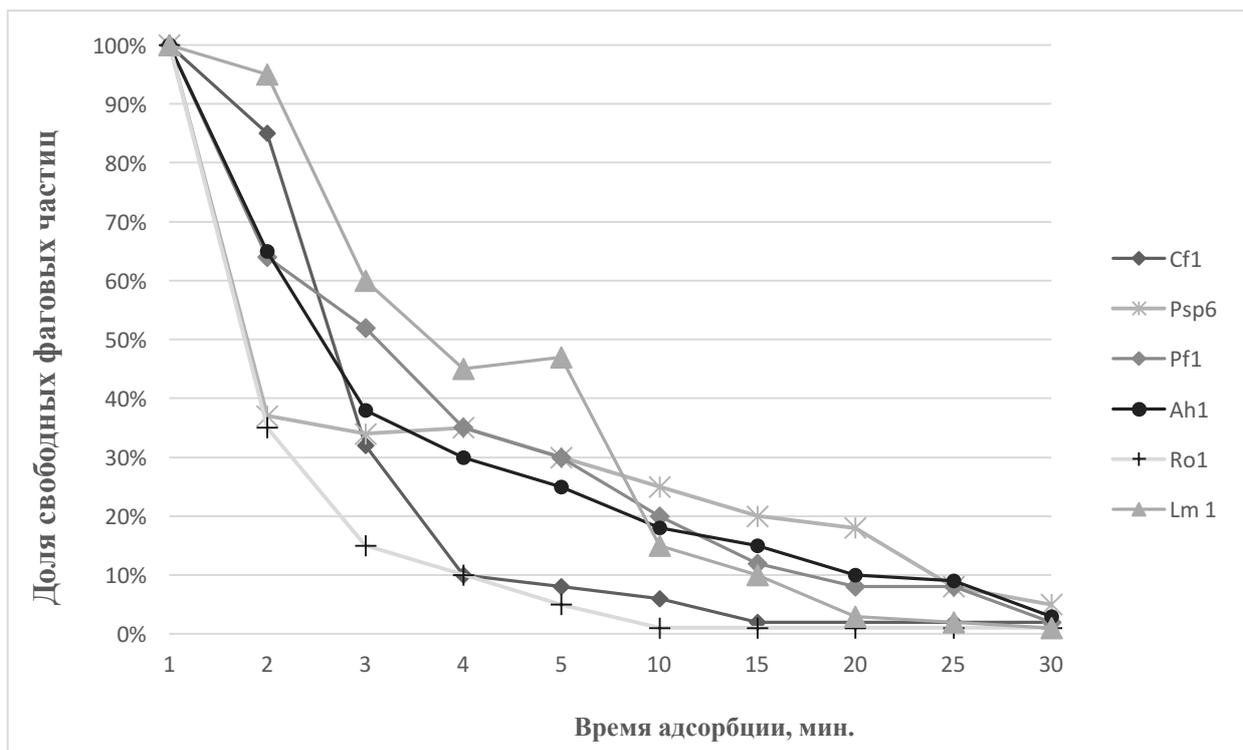


Рисунок 2 – Адсорбция бактериофагов на клетках-хозяевах

Латентный период и выход фаговых частиц из одной бактериальной клетки определяли при анализе кривых одиночного цикла развития бактериофагов (рисунок 3). Продолжительность латентного периода варьировала у разных штаммов бактериофагов от 10 до 35 минут, а количество высвободившихся вирионов из клетки было от 22 до 182 фаговых частиц у бактериофагов Lm1 и Cf1 соответственно.

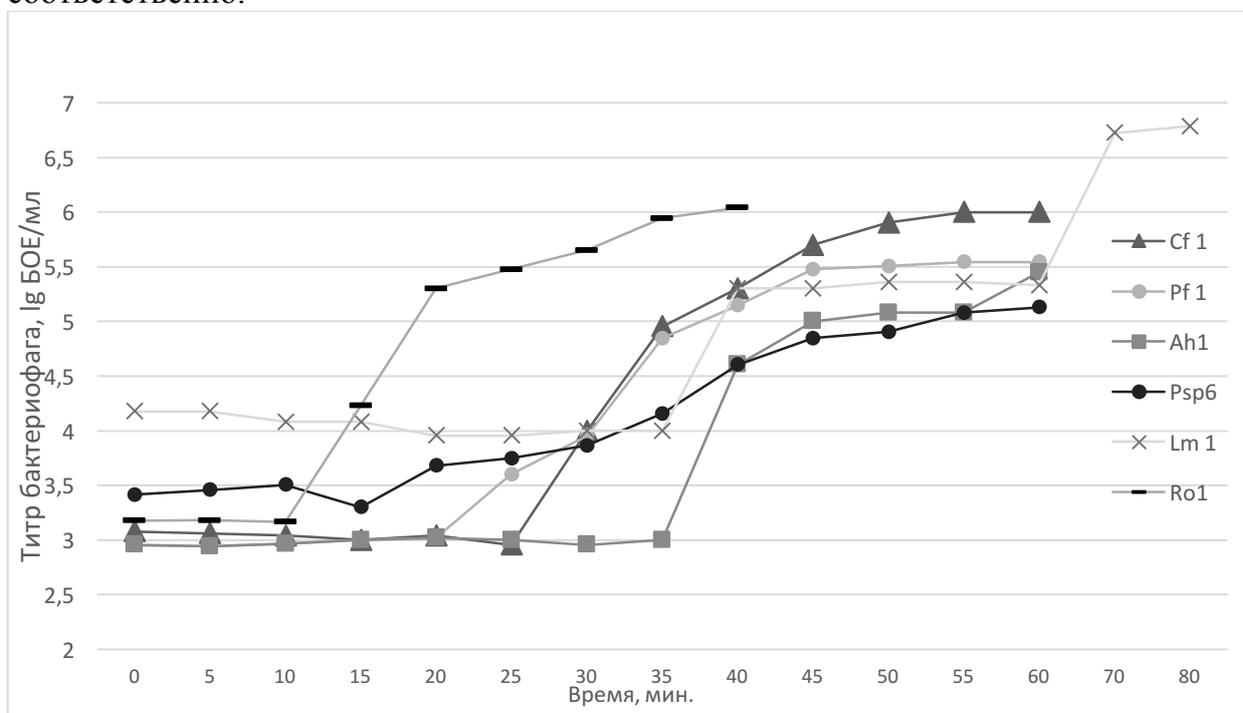


Рисунок 3 – Латентный период и выход фаговых частиц бактериофагов

Частоту формирования фагорезистентных мутантов (bacteriophage insensitive mutants – BIM) при MOI = 10:1 определяли для бактериальных штаммов, которые использовали для наработки бактериофагов, входящих в состав технологического вспомогательного средства. Показано, что для большинства штаммов, используемых для наработки фагов, входящих в состав ТВС, BIM не превышает 10^{-5} (таблица 3).

Таблица 3 – Частота возникновения фагорезистентных бактериальных мутантов

Бактериофаг	Штамм	BIM
Ah 1	<i>Aeromonas hydrophila</i> B-7964	$1,2 \cdot 10^{-5} \pm 0,2$
Pf 1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> B-7967	$1,2 \cdot 10^{-7} \pm 0,9$
Psp6	<i>Pseudomonas putida</i> B-7965	$1,5 \cdot 10^{-5} \pm 0,2$
Ro 1	<i>Raoultella ornithinolytica</i> B-7963	$1,8 \cdot 10^{-4} \pm 0,1$
Cf 1	<i>Citrobacter freundii</i> B-7966	$3,8 \cdot 10^{-6} \pm 0,3$
Lm1	<i>L. monocytogenes</i> B-6643	$4,1 \cdot 10^{-5} \pm 0,4$

Оригинальность и вирулентную природу производственно-перспективных штаммов бактериофагов подтверждали в процессе молекулярно-генетических методов исследования. Проведенное секвенирование дцДНК бактериофагов показало, что размеры геномов варьируют от 39 (Pf1) до 221 (Ah1) т.п.н. (рисунок 5). Вирулентность была подтверждена отсутствием генов, кодирующих известные интегразы, репрессоры транскрипции или их гомологи при помощи алгоритма blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Таким же образом подтверждено отсутствие других нежелательных генов, в том числе локусов патогенности и антибиотикорезистентности бактерий. Процент идентичности ДНК бактериофагов, отобранных для ТВС, с близкородственными штаммами, депонированными в GenBank, не превышал 95 %, что свидетельствует об оригинальности отобранных бактериофагов.

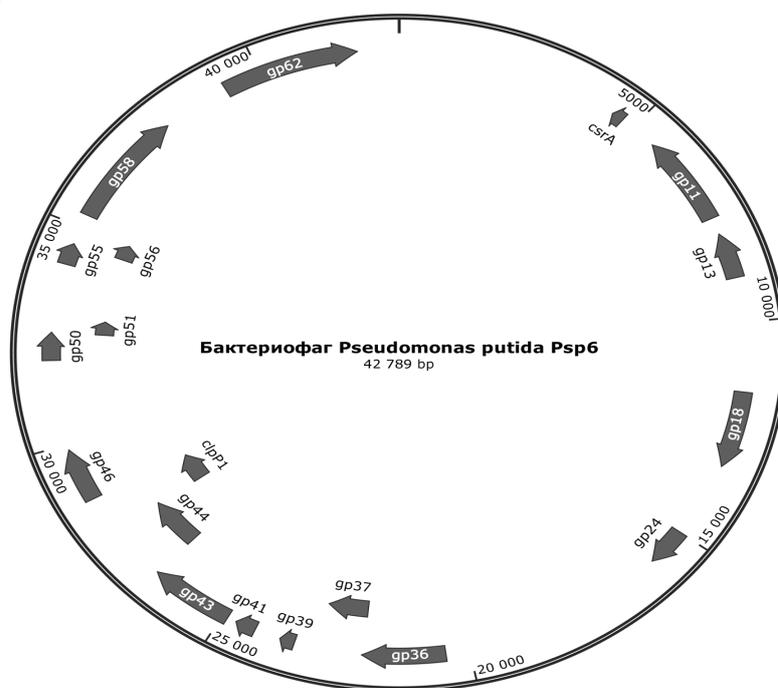


Рисунок 4 – Карта генома бактериофага *Pseudomonas putida* Psp6

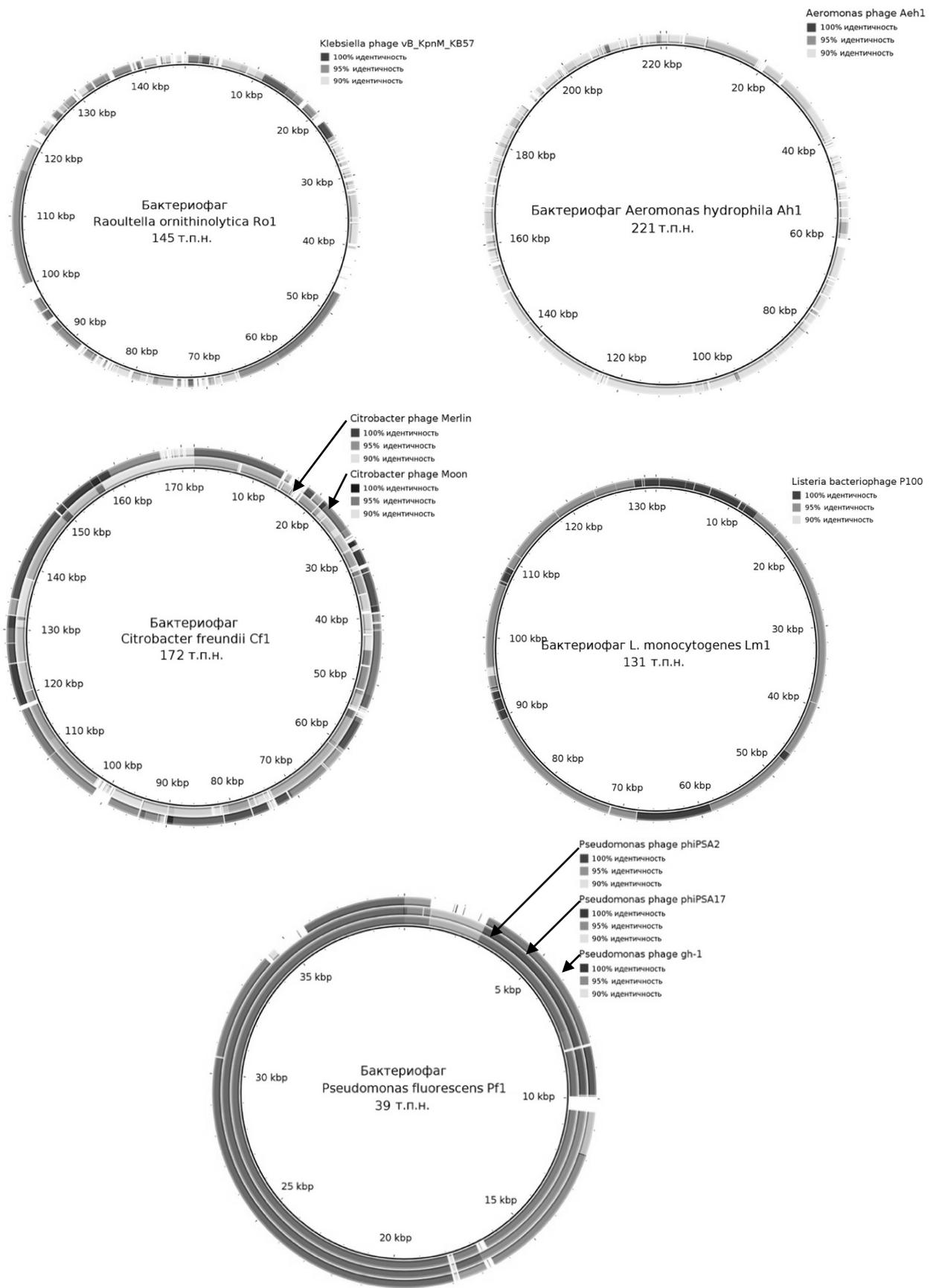


Рисунок 5 – Сравнение геномов бактериофагов с известными гомологами

Создание готовой формы коктейля бактериофагов.

Фаголизаты бактериофагов получали на основании модернизированного способа, приведенного в патенте на изобретение РФ №2525141. 18-часовую бактериальную культуру (10^9 КОЕ/мл) засеивали в матрац, культивировали в течение 3–3,5 ч, затем на полученный газон культуры наносили маточный бактериофаг (10^6 – 10^7 БОЕ/мл). Культивирование бактериофагов, благодаря внесенному нами усовершенствованию, сократили до 4–5 ч, после чего полученный фаголизат суспендировали с поверхности плотной питательной среды буферным раствором в количестве 9–10 мл и шуттелировали 30 мин с хлороформом, добавленным из расчета 1:10, затем фаголизат центрифугировали 30 мин при 5000 об/мин. В полученном супернатанте проверяли титр бактериофага по Грациа, после чего отдельные фаголизаты сводили в коктейль для проведения стерилизующей фильтрации и очистки от эндотоксина методом аффинной хроматографии. Внесенная модификация позволила нам на сутки сократить производственный цикл получения коктейля бактериофагов. Перед розливом готовой формы по флаконам смесь фаголизатов с титром каждого фага не ниже 10^{11} БОЕ/мл доводили буферным раствором (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,1 mM CaCl₂, pH 7.5) в асептических условиях до 100 мл.

Для определения срока годности готовой формы образцы, отобранные из 6 производственно-экспериментальных партий ТВС, хранили в течение 9 мес (6 мес + 50%) при температуре $4 \pm 2^\circ\text{C}$, периодически отбирая для контроля (таблица 4).

Таблица 4 – Стабильность специфической литической активности бактериофагов (по Грациа) при нормативном хранении ТВС

Бактериофаг	Титр бактериофагов БОЕ/мл			
	1 мес.	3 мес.	6 мес.	9 мес.
Ah1	$3 \times 10^{12} \pm 2,0$	$3,1 \times 10^{12} \pm 1,9$	$2,7 \times 10^{12} \pm 1,5$	$1,3 \times 10^{12} \pm 0,5$
Pf1	$5,2 \times 10^{12} \pm 3,0$	$4,8 \times 10^{12} \pm 2,5$	$4,6 \times 10^{12} \pm 2,6$	$4 \times 10^{12} \pm 2,4$
Ro1	$3,6 \times 10^{12} \pm 2,0$	$2,8 \times 10^{12} \pm 1,4$	$1,6 \times 10^{12} \pm 0,4$	$1,2 \times 10^{12} \pm 0,2$
Cf1	$2,3 \times 10^{12} \pm 0,1$	$1,9 \times 10^{12} \pm 0,4$	$1,8 \times 10^{12} \pm 0,4$	$1,4 \times 10^{12} \pm 0,4$
Lm1	$6,8 \times 10^{11} \pm 2,0$	$6,1 \times 10^{11} \pm 1,8$	$5,8 \times 10^{11} \pm 1,3$	$4,1 \times 10^{11} \pm 3,0$
Psp6	$4,1 \times 10^{12} \pm 0,2$	$4,0 \times 10^{12} \pm 0,7$	$3,7 \times 10^{12} \pm 1,0$	$3,4 \times 10^{12} \pm 0,5$

Регламентированный титр вирусных частиц (не менее 10^{11} БОЕ/мл) сохранился в процессе всего срока гарантийного хранения ТВС.

Оценка безопасности ТВС на лабораторных животных

На следующем этапе диссертационного исследования нами была проведена оценка безопасности ТВС в опытах по изучению острой и хронической (подострой) токсичности на лабораторных животных. В результате проведенных экспериментов было показано, что при различных способах однократного введения максимальной дозы (1,0 мл – внутривенно, 1,0 мл – подкожно и 0,5 мл per os мышам) исследуемого продукта, признаков интоксикации у мышей не наблюдали. Поведенческие реакции, внешний вид и привес мышей в экспериментальной и контрольной группах при длительном пероральном приеме ТВС также достоверно не отличались. Для исключения вероятности возникновения побочных эффектов под влиянием 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. Компоненты разработанной рецептуры не влияли на нормальную микрофлору кишечника мышей.

Оценка эффективности литического действия бактериофагов на поверхности охлажденной рыбы в лабораторных условиях

В ходе подбора оптимальных параметров для деконтаминации охлажденной рыбы в лабораторных условиях, мы сравнивали между собой следующие способы: 1) с погружением контаминированных образцов в фаголизат; 2) с капельным нанесением фаголизата на контаминированную поверхность, по типу оценки эффективности дезинфекционных средств.

Примеры деконтаминации по способу 1.

При погружении в стерильный фильтрат гомологичных фаголизатов (Lm1, Pf1) в титре 10^9 БОЕ/мл кусочков охлажденной рыбы, по отдельности предварительно контаминированных суспензиями бактерий с титром 10^6 КОЕ/мл: *L. monocytogenes* в течение 1 часа, *P. fluorescens* в течение 15 минут, через сутки после деконтаминации наблюдалось снижение бактериальной обсемененности образцов более чем на 99%, в то время как количество бактериальных клеток в контрольных образцах превышало $0,3 \times 10^4$ КОЕ/г. Элиминация 99% микроорганизмов с поверхности образцов подтверждалась при условии множественности инфицирования (МОИ) фаг–бактерия-хозяин не менее 100:1 (100 фаговых частиц на 1 бактерию или, например, *L. monocytogenes* 10^6 КОЕ/мл – бактериофаг Lm 1 10^9 БОЕ/мл) и времени деконтаминации не менее 2 ч, при этом температурный режим хранения обработанных фагом кусков рыбы в серии экспериментов варьировали от 2 до 25 °С.

Примеры деконтаминации по способу 2.

Стерилизованные кусочки 5×5 см охлажденной рыбы были искусственно капельно контаминированы 0,5 мл бактериальной суспензии, содержащей не менее 2×10^9 КОЕ/мл: 1 образец - *L. monocytogenes*, 2 образец - *C. freundii*, 3 образец - *R. ornithinolytica*, 4 образец - *P. fluorescens*, 5 образец - *P. putida*, 6 образец - *A. hydrophila*. 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 - Cf 1, 3 образец - Ro 1, 4 образец - Pf 1, 5 образец - Psp 6 и 6 образец - Ah 1. На следующие сутки уровень бактерий снижался на 99% относительно контрольных, составляя в среднем не более 30 КОЕ/г, что соответствовало категории эффективных дезинфицирующих средств в соответствии с «Методами лабораторных исследований и испытаний медико-профилактических дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности, Руководство 4.2.2643—10, 2010 г», в то время как количество бактериальных клеток в контрольных образцах превышало 10^5 КОЕ/см².

В следующем лабораторном эксперименте мы оценивали эффективность фагопосредованного биопроцессинга и стабильность титра бактериофагов, входящих в ТВС, на поверхности охлажденной рыбы после ее деконтаминации. Потрошеную радужную форель (18 образцов, средний вес 600 ± 50 г из расчета по 3 рыбы на каждые сутки эксперимента) искусственно контаминировали в суспензии, содержащей следующие виды бактерий: *L. monocytogenes*, *C. freundii*, *R. ornithinolytica*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *A. hydrophila* в титре не менее 2×10^9 КОЕ/мл каждого 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, Cf 1, Ro 1, Pf 1, Psp 6 и Ah 1 с титром каждого фага не ниже 1×10^8 БОЕ/мл (MOI = 1:10). 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) (рисунок 6).

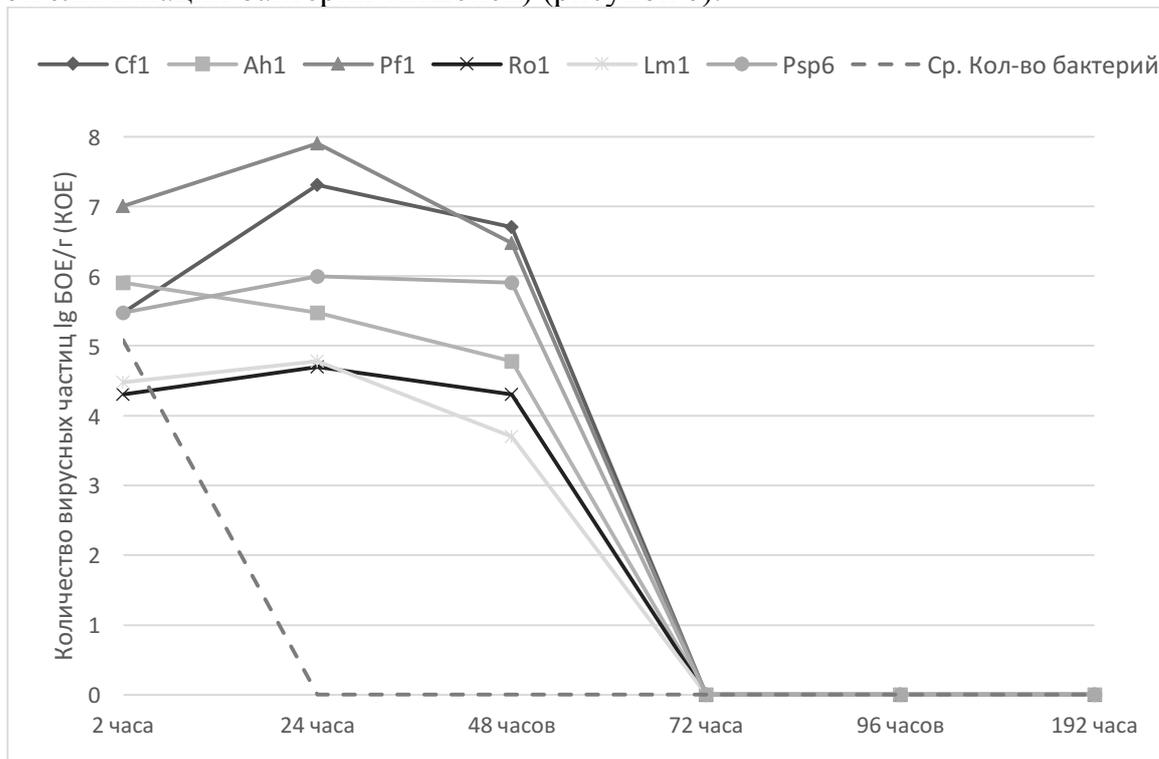


Рисунок 6 – Динамика количества вирусных частиц и бактериальных клеток на поверхности охлажденной рыбы после 30-секундной обработки коктейлем бактериофагов.

Отработка метода промышленного фаг-опосредованного биопроцессинга на базе форелеводческого хозяйства

В условиях производственной базы были отобраны 9 образцов только что потрошенных тушек радужной форели (вес рыбы 600 ± 50 г). Рыбу разделили на 3 группы для проведения деконтаминации двумя видами бактериофагов – Ah 1, Pf 1, активных в отношении бактерий *Aeromonas hydrophila* и *Pseudomonas fluorescens*, персистирующих на поверхности потрошенной рыбы в данном рыбоводческом хозяйстве (таблица 5):

1 группа - деконтаминация путем аэрозольной обработки коктейлем бактериофагов внешней и внутренней поверхности потрошенной рыбы с использованием пульверизатора, титр фагов 10^8 БОЕ/мл;

2 группа - деконтаминация путем полного погружения тушки в коктейль бактериофагов на 1 мин, титр фагов не менее 10^8 БОЕ/мл;

3 группа – контроль (контрольные образцы подвергались обычной производственной обработке).

Микробиологическую чистоту образцов оценивали через 18 часов при температуре 22⁰С (для ускорения процессов порчи). Исходное соотношение МОИ оценивали как не менее 100:1.

Таблица 5 – Результаты микробиологических исследований образцов потрошенной рыбы через 18 часов

Номер группы	КМАФАнМ/г
1	$4,8 \times 10^6 \pm 4,1^*$
2	$3,4 \times 10^6 \pm 0,4^{**}$
3	$5,7 \times 10^8 \pm 5,2$

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольными значениями; ** - $p < 0,01$ по сравнению с контрольными значениями

Из эксперимента можно сделать вывод, что деконтаминация методом погружения в коктейль фаголизатов более эффективна, чем аэрозольная обработка бактериофагами потрошенных тушек рыбы.

В следующем опыте было проведена оценка возможности продления срока годности охлажденных гидробионтов с помощью фагов Ah 1 и Pf 1. В условиях производственной базы были отобраны 6 образцов потрошенных тушек радужной форели. Рыбу разделили на 2 группы:

1 группа - деконтаминация путем полного погружения тушки рыбы в коктейль фаголизатов (титр фагов 10^8 БОЕ/мл) на 1 мин;

2 группа - контроль (деконтаминация осуществлялась путем погружения рыбы в 0,9% раствор натрия хлорида).

Каждая тушка рыбы была упакована в пенопластовую коробку с чешуйчатым льдом и находилась в холодильной камере при температуре +8 °С в коробках с хладагентами в течение 12 сут. Микробиологическую обсемененность и органолептические свойства оценивали на 7-е и 10-е сутки хранения (таблица 6). Исходное соотношение МОИ оценивали как не менее 100:1.

Таблица 6 – Результаты посева рыбы на 7 и 10 сутки эксперимента

Номер группы	КМАФАнМ (или общее микробное число)	Органолептические свойства
Результаты посева рыбы на 7 сутки		
1	$1,6 \times 10^4 \pm 0,3^*$ КОЕ/мл	Запах свежей рыбы
2	$4 \times 10^5 \pm 3,0$ КОЕ/мл	Запах свежей рыбы
Результаты посева рыбы на 10 сутки		
1	$7 \times 10^6 \pm 3,0^{**}$ КОЕ/мл	Запах свежей рыбы
2	$1,2 \times 10^9 \pm 0,8$ КОЕ/мл	Запах тухлой рыбы

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контрольными значениями; ** - $p < 0,001$ по сравнению с контрольными значениями

Количество бактериальной флоры, высеянной с рыб из контрольной группы было до двух порядков выше в сравнении с опытной группой, образцы которой деконтаминировались путем погружения в коктейль бактериофагов.

Оценка эффективности разработанного метода фаг-опосредованного биопроектирования в условиях конвейерной переработки производственной партии радужной форели

На базе одного из рыбоводческих хозяйств Республики Карелия в процессе переработки потрошенных тушек свежельвленной радужной форели (24 рыбы, средний вес 700 ± 50 г, общий вес деконтаминированной партии 15 кг), нами было

использовано технологическое вспомогательное средство, объемом 100 мл, содержащее 6 штаммов бактериофагов (Ah1, Pf1, Ro1, Cf1, Psp6, Lm1) в титре не менее 10^{11} БОЕ/мл каждого, активных в отношении бактерий, персистирующих на поверхности охлажденной рыбы и технологического оборудования данного рыбоперерабатывающего предприятия. Средство объемом 100 мл разводили в прямоугольной стерильной емкости, содержащей 9900 мл дистиллированной воды, для получения рабочей концентрации бактериофагов не ниже 10^8 БОЕ/мл. Исходное соотношение МОИ оценивали как не менее 100:1. Для равномерного распределения фаговых частиц, полученный раствор перемешивали в течение 5 минут. Фаг-опосредованный биопроцессинг проводили в течение 30 секунд путем полного погружения потрошенной радужной форели в раствор с бактериофагами. Затем образцы обработанной рыбы укладывали в пенопластовые коробки с чешуйчатым льдом и закладывали на хранение во фриго при температуре от -1 до +5 °С. Контрольные образцы погружали на 30 секунд в стерильную емкость с 10 л дистиллированной воды и закладывали на хранения при тех же условиях. На рисунке 7 отражено изменение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) опытных и контрольных образцов охлажденной рыбы, с учетом порогового значения, установленного для данного вида продукции в ТР ТС 021/2011 (КМАФАнМ не выше 10^5 КОЕ/г).

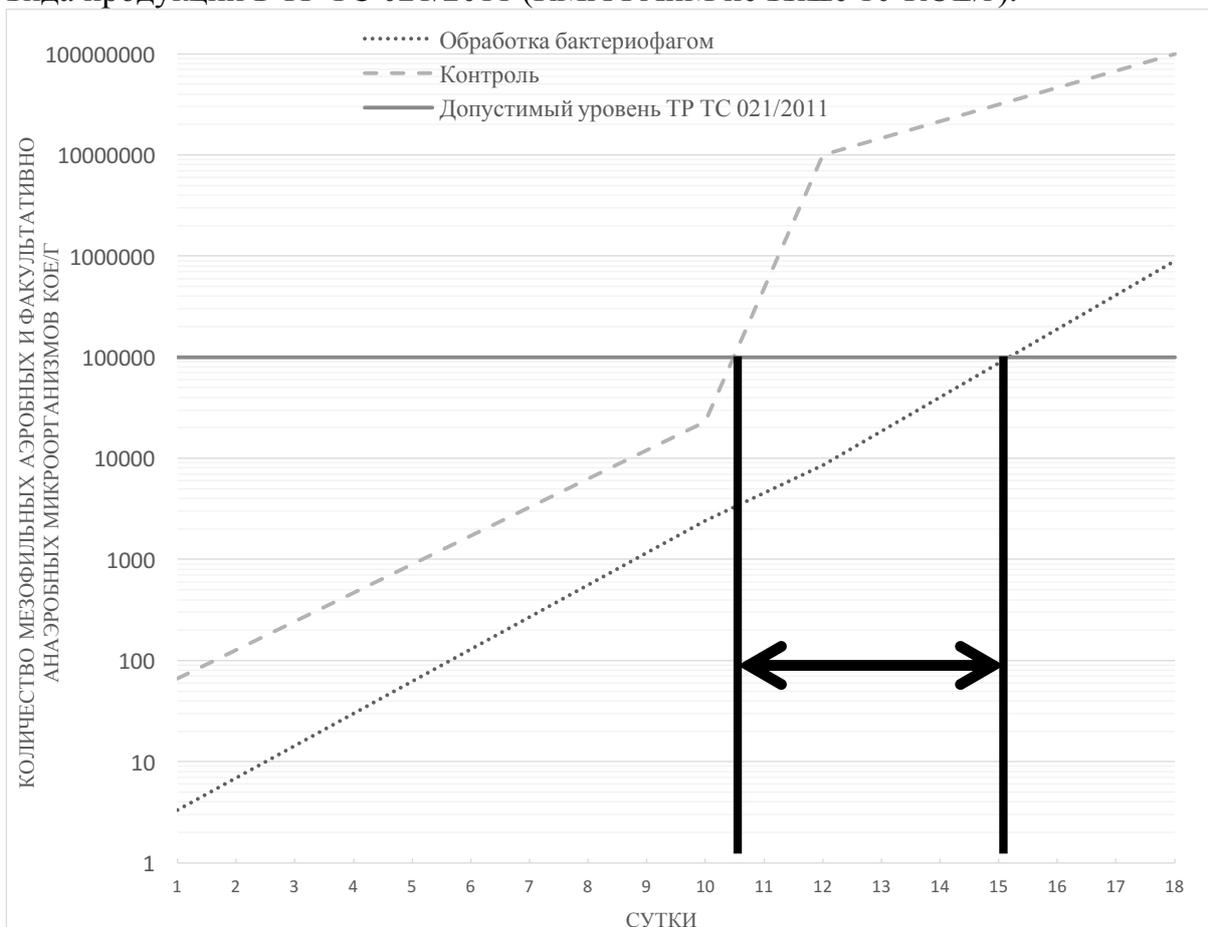


Рисунок 7 - Результаты микробиологических исследований опытных и контрольных образцов охлажденной рыбы при фаг-опосредованном биопроцессинге гидробионтов, в условиях конвейерной переработки производственной партии радужной форели, с учетом порогового значения ТР ТС 021/2011

Метод фаг-опосредованного биопроцессинга, апробированный нами в условиях конвейерной переработки промышленной партии радужной форели,

позволяет продлевать кондиционное состояние охлажденной рыбы на 5 суток относительно срока годности, установленного в ГОСТе 814-96 «Рыба охлажденная». Таким образом, выделенные фаги обладают широким спектром литической активности, безопасны с фено- и генотипической точки зрения, эффективны на сложной поверхности гидробионтов в отношении очерченного спектра бактериальных мишеней при использовании экспериментально подобранного титра не менее 10^8 БОЕ/мл (что соответствует публикациям ряда западных авторов) и могут быть использованы в качестве технологического вспомогательного средства для деконтаминации охлажденной рыбы на предприятиях рыбоперерабатывающей отрасли.

ВЫВОДЫ

1. Штаммы бактерий *Ps. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Ps. putida*, *R. ornithinolytica*, *C. freundii*, *L. monocytogenes*, прижизненно колонизирующие чешую, жабры и слизистую оболочку, размножаются на указанных поверхностях свежевывловленной охлажденной рыбы при температуре ее хранения (от -1 до +5⁰С), зачастую превышая пороговые значения ТР ТС 021/2011 (1×10^5 КОЕ/г), вызывая порчу данной категории полуфабрикатов до истечения срока годности и повышая у потребителей этой продукции риск возникновения инфекций, передаваемых пищевым путем.
2. Бактериофаги *Raoultella ornithinolytica* Ro 1 (Ph-128), *Aeromonas hydrophila* Ah 1 (Ph-129), *Pseudomonas putida* Psp 6 (Ph-130), *Citrobacter freundii* Cf 1 (Ph-131), *Pseudomonas fluorescens* Pf 1 (Ph-132), *Listeria monocytogenes* Lm 1 (Ph-133) обладают свойствами производственно-перспективных штаммов: широким спектром литической активности (от 64 до 100%) в отношении гомологичных бактериальных штаммов, высокой урожайностью (от 10^{11} до 10^{12} БОЕ/мл) на депонированных в «ГКПМ-Оболенск» нелизогенных штаммах-хозяевах и скоростью адсорбции (не менее $2,5 \times 10^{-8}$ см³/мин), устойчивостью к агрессивным факторам внешней среды, вирулентностью, оригинальностью и генетической безопасностью (ДНК фагов не содержат нежелательных генов). По своей морфологической структуре они относятся к *Myoviridae* – Lm 1, Cf 1, Ro 1, Ah 1, *Siphoviridae* – Psp6, *Podoviridae* – Pf 1.
3. Состав технологического вспомогательного средства на основе коктейля из 6 бактериофагов, депонированных в «ГКПМ-Оболенск» под номерами Ph-128, Ph-129, Ph-130, Ph-131, Ph-132, Ph-133, нарабатываемый по модифицированной технологии, позволяющей добиться содержания каждого фага в титре не менее 10^{11} БОЕ/мл, гарантированно хранится при температуре 2–8 °С в течение 6 мес.
4. Технологическое вспомогательное средство на основе коктейля бактериофагов безопасно, по результатам оценки острой и хронической (подострой) токсичности на белых беспородных мышах, и эффективно элиминирует штаммы бактерий *Ps. fluorescens*, *A. hydrophila*, *Ps. putida*, *R. ornithinolytica*, *C. freundii*, *L. monocytogenes* с поверхности искусственно и естественно контаминированных тушек охлажденной рыбы в лабораторных условиях при соблюдении следующих условий: множественность инфицирования фаг-бактерия по каждому образцу должна быть не ниже 100:1, время деконтаминации – не менее 2 ч при температуре от 2 до 25 °С.
5. Алгоритм промышленного конвейерного фаг-опосредованного биопроцессинга в условиях реального рыбоперерабатывающего предприятия, осуществляемый путем 30-секундного погружения свежевывловленных тушек гидробионта массой от 600 до

800 г в емкость с технологическим вспомогательным средством на основе коктейля бактериофагов с титром рабочей суспензии по каждому фагу не ниже 10^8 БОЕ/мл, позволяет продлить срок годности охлажденной радужной форели на 5 сут относительно действующего на данный вид продукции ГОСТа № 814 – 96 «Рыба охлажденная».

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Разработанное технологическое вспомогательное средство на основе коктейля бактериофагов может быть рекомендовано рыбоперерабатывающим предприятиям, для фаг-опосредованного биопроцессинга гидробионтов, на этапе перед упаковыванием продукции в транспортные коробки, с целью продления сроков годности продукции и снижения риска возникновения инфекций, передаваемых пищевым путем.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Продолжить осуществление мониторинга за микрофлорой охлажденной рыбы для расширения банка бактерий-мишеней и бактериофагов-кандидатов с целью своевременного внесения изменений в штаммовый состав коктейля бактериофагов, обеспечивающий поддержания его эффективности.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Зулькарнеев, Э.Р.** ФАГ-опосредованный биопроцессинг гидробионтов / Э.Р. Зулькарнеев, И.А. Киселёва, О.Г. Ефимова, А.В. Алёшкин, С.С. Афанасьев, В.А. Алёшкин, Х.М. Галимзянов, О.В. Рубальский, М.В. Лозовская // Инфекция и иммунитет. - 2014. – Специальный выпуск. – С. 82.
2. **Зулькарнеев, Э.Р.** Бактериофаг-опосредованный биопроцессинг охлажденной рыбы / Э.Р. Зулькарнеев, И.А. Киселева, О.Г. Ефимова, А.В. Алешкин, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, Х.М. Галимзянов, О.В. Рубальский, М.В. Лозовская // Сб. тез. докл. V международной конференции «ФИЗТЕХБИО», 29-30 апреля 2015 г.– Москва, 2015. – С. 75.
3. **Алешкин, А.В.** Опыт фаг-опосредованного биопроцессинга пищевых полуфабрикатов / А.В. Алешкин, Е.О. Рубальский, Ю.В. Ларина, И.А. Киселева, С.С. Афанасьев, О.Г. Ефимова, **Э.Р. Зулькарнеев**, Ю.В. Гордеева // Сб. тез. докл. V международной конференции «ФИЗТЕХБИО», 29-30 апреля 2015 г.– Москва, 2015. – С. 58.
4. **Алешкин, А.В.** Опыт деконтаминации пищевых полуфабрикатов с помощью бактериофагов / А.В. Алешкин, Ю.В. Ларина, Н.В. Воложанцев, М.В. Зейгарник, И.А. Киселёва, В.В. Верёвкин, Э.А. Светоч, Э.Р. Зулькарнеев, Е.О. Рубальский, С.С. Афанасьев, О.Г. Ефимова, С.С. Бочкарёва // Вопросы диетологии. - 2015. – Т. 5. - № 1. - С. 24-30.
5. **Алешкин, А.В.** Биодеконтаминация и продление сроков годности мясных и рыбных полуфабрикатов с помощью бактериофагов / А.В. Алешкин, Э.Р. Зулькарнеев, Ю.В. Ларина, О.В. Рубальский, И.А. Киселева, Е.О. Рубальский, О.Г. Ефимова, С.С. Афанасьев, С.С. Бочкарева, К.Н. Смирнова, А.Д. Теплый // Астраханский медицинский журнал. - 2015. - Т. 10. - № 4. - С. 40-48.
6. **Алешкин, А.В.** Бактериофаги в инфекционной патологии. Часть I: история исследований до широкого применения антибиотиков /А.В. Алешкин, В.А.

Алешкин, С.С. Афанасьев, Х.М. Галимзянов, О.В. Рубальский, Д.Л. Теплый, А.Х. Ахминеева, И.А. Киселева, С.С. Бочкарева, Е.Е. Рубальская, Е.О. Рубальский, К.Н. Смирнова, Э.Р. Зулькарнеев, А.Д. Теплый // Астраханский медицинский журнал. - 2016. - Т. 11. - № 2. - С. 8-16.

7. Алешкин, А.В. ФАГ-опосредованная биоконсервация мясных и рыбных охлажденных полуфабрикатов / А.В. Алешкин, И.А. Киселева, Э.Р. Зулькарнеев, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, С.С. Бочкарева // Мат. международной науч.- практ. конф. «Перспективы сотрудничества государств – членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней», 25-26 мая 2015 г., – Москва, 2015. – С. 95-96.

8. Алешкин, А.В. Опыт деконтаминации полуфабрикатов с помощью бактериофагов / А.В. Алешкин, Ю.В. Ларина, Н.В. Воложанцев, И.А. Киселева, Э.А. Светоч, Э.Р. Зулькарнеев, С.С. Афанасьев, В.А. Алешкин, И.А. Дятлов. // Мат. международной науч.- практ. конф. «Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекционных болезней», 23-24 июня 2015 г., – Москва, 2015. – С. 25-28.

9. Зулькарнеев, Э.Р. Снижение риска возникновения острых кишечных инфекций и продление сроков годности пищевых полуфабрикатов как результат фаг-опосредованного биопроцессинга / Э.Р. Зулькарнеев, Ю.В. Ларина, А.В. Алешкин, И.А. Киселева, О.Г. Ефимова, Е.О. Рубальский // Материалы конференции «VIII Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием» 28-30 марта 2016 г., – Москва, 2016. – С.112.

10. Зулькарнеев, Э.Р. Характеристика коктейля бактериофагов, эффективно продлевающего срок годности охлажденной рыбы / Э.Р. Зулькарнеев, А.В. Алешкин, И.А. Киселева, О.Г. Ефимова, Е.О. Рубальский // Мат. международной науч.-практ. конф. «Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности», 13-15 октября 2016 г., - Москва, 2016. – С. 72.

11. Зулькарнеев, Э.Р. Деконтаминация пищевых полуфабрикатов и снижение риска возникновения инфекций, передаваемых пищевым путем, с помощью бактериофагов / Э.Р. Зулькарнеев, А.В. Алешкин, Ю.В. Ларина // Материалы науч.- практ. конф. «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» 1–3 ноября 2016 г., – Москва, 2016. – С. 92.

12. Алешкин, А.В. Бактериофаги в инфекционной патологии. Часть II: Современная история исследований фагопрофилактики и фаготерапии кишечных инфекций /А.В. Алешкин, В.А. Алешкин, С.С. Афанасьев, Х.М. Галимзянов, О.В. Рубальский, Д.Л. Теплый, А.Х. Ахминеева, И.А. Киселева, С.С. Бочкарева, Е.Е. Рубальская, Е.О. Рубальский, К.Н. Смирнова, Э.Р. Зулькарнеев, А.Д. Теплый, А.С. Вихрова // Астраханский медицинский журнал. - 2016. - Т. 11. - № 3. - С. 8-16.

13. Zul'karneev, E.R. Characterisation of bacteriophage cocktail effectively prolonging the shelf life of chilled fish/ E.R. Zul'karneev, A.V. Aleshkin, I.A. Kiseleva, O.G. Efimova, E.O. Rubalskii // Bacteriophages: Theoretical and Practical Aspects of Their Application in Medicine, Veterinary and Food. – M., 2016. - P. 52-53.

Список сокращений

- БОЕ – бляшкообразующие единицы
ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖСА – желточно-солевой агар
КМАФАНМ - количество мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов
КОЕ – колониеобразующие единицы
МПА – мясопептонный агар
МПБ – мясопептонный бульон
НТД – нормативно техническая документация
ПЖА – полужидкий агар
СЖ – сахарозо-желатиновая среда
ТВС – технологическое вспомогательное средство
ТУ – технические условия
ТП – технологический процесс
УГСХА - Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия им. П.А. Столыпина
ЕЭ – единица эндотоксина
ВІМ - Bacteriophage Insensitive Mutants – Бактериофаг устойчивые мутанты
CDC - Centers for Disease Control and Prevention USA - Центр по контролю и профилактике заболеваний США
D – диаметр
ЕАЕС (ЭАКП) – enteroaggregative E. coli (энтероагрегативная кишечная палочка)
EFSA - European Food Safety Authority (Европейская организация по безопасности продовольствия)
GRAS - Generally Recognised as Safe – в целом безопасный
MALDI-TOF MS - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometer -Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация – время пролетная масс-спектрометрия
МОІ - Multiplicity Of Infection – множественность инфицирования
NCBI – National Center for Biotechnology Information (национальный центр биотехнологической информации, США)
US FDA - United States Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов Министерства здравоохранения и социальных служб США)