

МИКРОБИОЛОГИЯ



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

https://elibrary.ru/wynmed

Зубкова Е.С.¹, Киселева И.А.¹, Пасивкина М.А.¹, Воробьева А.А.¹, Ефимова О.Г.¹,
Морозова Е.В.¹, Воробьев А.М.¹, Шастин П.Н.², Лаишевцев А.И.^{1,2}, Зулькарнеев Э.Р.³,
Алешкин А.В.⁴

ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ВСПОМОГАТЕЛЬНОЕ СРЕДСТВО НА ОСНОВЕ КОКТЕЙЛЯ ЛИСТЕРИОЗНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ДЛЯ БИОДЕКОНТАМИНАЦИИ МЯСНЫХ ПОЛУФАБРИКАТОВ

¹ ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, 125212, Москва, Россия;

² ФГБНУ «Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко» Российской академии наук, 109428, Москва, Россия;

³ Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К. И. Скрябина, 109472, Москва, Россия;

⁴ ООО «Орфан-Био», 354340, Краснодарский край, Сириус, Россия

Введение. Одной из ведущих проблем в мясной перерабатывающей промышленности является контаминация мясных полуфабрикатов патогенными листериями, которая происходит, в частности, из-за нарушений технологического процесса. Перспективным направлением для селективной деконтаминации мясных полуфабрикатов является применение вирулентных бактериофагов, специфически лизирующих *Listeria spp.* Исходя из этого, разработка состава и технологии производства технологического вспомогательного средства (ТВС) на основе коктейля листериозных бактериофагов и оценка его эффективности в ходе проведения испытаний на промышленном производстве является актуальной задачей.

Материалы и методы. На опытном производстве из образцов мясного фарша выделили и идентифицировали при помощи времяпролетной масс-спектрометрии MALDI-ToF MS изоляты *Listeria monocytogenes* и другие виды *Listeria spp.*, относящиеся к пяти видам: *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*. Подтверждена чувствительность выделенных изолятов листерий 2-х этапным методом (спот-тест, метод Грация) к двум кандидатным вирулентным бактериофагам *Listeria phage*: BF-1362 и BF-1426, обладающих высокой литической активностью. Бактериофаги и бактерии, используемые как штаммы-хозяева для культивирования и определения активности фаголизатов, используемые в работе, депонированы в Государственной коллекции вакцинных и патогенных штаммов ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. Отработана технология глубинного культивирования и очистки бактериофагов. Деконтаминацию опытных серий фарша выполняли на разных этапах технологического процесса. В ходе испытаний осуществлялась обработка свиного фарша коктейлем бактериофагов с разной концентрацией фаговых частиц с последующим осуществлением микробиологического мониторинга мясного полуфабриката.

Результаты. К выделенным на опытном мясоперерабатывающем производстве *Listeria monocytogenes* подобраны бактериофаги, специфически лизирующие выделенные изоляты. Разработана рецептура ТВС и отработана технология получения фаголизата на основе коктейля листериозных бактериофагов. Подобрана оптимальная доза ТВС, необходимая для селективной деконтаминации свиного фарша от *Listeria monocytogenes*.

Выводы. ТВС, разработанное на основе листериозных бактериофагов с учетом подбора индивидуального штаммового состава, для конкретного предприятия может быть рекомендовано в качестве основного противолистерийного агента для селективной деконтаминации пищевой продукции и оборудования.

Ключевые слова: бактериофаги; мясоперерабатывающее предприятие; технологическое вспомогательное средство; деконтаминация мясных полуфабрикатов; *Listeria monocytogenes*

Для цитирования. Зубкова Е.С., Киселева И.А., Пасивкина М.А., Воробьева А.А., Ефимова О.Г., Морозова Е.В., Воробьев А.М., Шастин П.Н., Лаишевцев А.И., Зулькарнеев Э.Р., Алешкин А.В. Технологическое вспомогательное средство на основе коктейля листериозных бактериофагов для биодеконтаминации мясных полуфабрикатов. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2025; 30; 2: 115–122.

DOI: https://doi.org/10.51620/3034-1981-2025-30-2-115-122

EDN: WYNMED

Для корреспонденции. Зубкова Екатерина Сергеевна, научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; e-mail: zubkova@gabrich.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.02.2025

Принята к печати 03.05.2025

Zubkova E.S.¹, Kiseleva I.A.¹, Pasivkina M.A.¹, Vorobyova A.A.¹, Yefimova O.G.¹, Morozova E.B.¹, Vorobyov A.M.¹, Shastin P.N.², Laishetsev A.I.^{1,2}, Zulkarnееv Э.Р.³, Aleshkin A.B.⁴

TECHNOLOGICAL PROCESSING AID BASED ON A COCKTAIL OF LISTERIOSIS BACTERIOPHAGES FOR BIODECONTAMINATION OF SEMI-FINISHED MEAT PRODUCTS

¹ Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after G.N. Gabrichevsky, Rospotrebnadzor, 125212,

Moscow, Russia;

² Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (FSC VIEV), 109428, Moscow, Russia;

³ K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA, 109472, Moscow, Russia;

⁴ Orfan-Bio LLC, 354340, Krasnodar Territory, Sirius, Russia

Introduction. One of the leading problems in the meat processing industry is the contamination of meat semi-finished products with pathogenic *Listeria*, which occurs, in particular, due to technological process violations. A promising direction for the selective decontamination of semi-finished meat products is the use of virulent bacteriophages specifically lysing *Listeria* spp. In this regard, the development of the composition and production technology of a technological auxiliary agent (PAB) based on a cocktail of listeriosis bacteriophages and the evaluation of its efficacy under industrial conditions is a relevant task.

Materials and methods. Isolates of *Listeria monocytogenes* and other species of *Listeria* spp. belonging to 5 species: *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri* were isolated and identified from minced meat samples using MALDI-ToF MS time-of-flight mass spectrometry. The sensitivity of these isolates to two candidate virulent bacteriophages (*Listeria* phages BF-1362 and BF-1426) was confirmed via a two-step testing method (spot test and Grazia method), demonstrating high lytic activity. The bacteriophages and bacteria used as host strains for cultivation and determination of phagolysate activity used in the work are deposited in the State Collection of Vaccine and Pathogenic Strains Federal State Budget Scientific Institution "Federal Scientific Centre VIEV" (FSC VIEV).

The technology of deep cultivation and purification of bacteriophages has been developed. Decontamination of the experimental series of minced meat was carried out at different stages of the technological process. During the tests, minced pork was processed with a cocktail of bacteriophages at different phage particle concentrations, followed by microbiological monitoring of the meat semi-finished product.

Results. Bacteriophages specifically lysing isolated isolates were selected for those isolated at the experimental meat processing plant *Listeria monocytogenes*. A formulation has been developed and a technology for producing phage lysate based on a cocktail of listeriosis bacteriophages has been developed. The optimal dose of PAB necessary for the selective decontamination of minced pork from *Listeria monocytogenes* has been selected.

Conclusions. The developed PAB on *Listeria* bacteriophages, with customization of the phage strain composition for a specific enterprise, can be recommended as the main anti-listeriosis agent for the selective decontamination of food products and equipment.

Key words: bacteriophages; meat processing facility; processing aid; decontamination of semi-finished meat products; *Listeria monocytogenes*

For citation. Zubkova E.S., Kiseleva I.A., Pasivkina M.A., Vorobyova A.A., Yefimova O.G., Morozova E.B., Vorobyov A.M., Shastin P.H., Laishchev A.I., Zulkarneev Э.П., Aleshkin A.B. Technological auxiliary agent based on a cocktail of listeriosis bacteriophages for biodecontamination of semi-finished meat products. *Epidemiologiya i Infektsionnye bolezni (Epidemiology and infectious diseases)*. 2025; 30; 2: 115–122.

DOI: <https://doi.org/10.51620/3034-1981-2025-30-2-115-122>

EDN: WYNMED

For correspondence. Ekaterina S. Zubkova, Researcher at the Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages G. N. Gabricheskii Moscow Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, e-mail: zubkova@gabrich.ru

Funding. The study was not supported by sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare the absence of conflict of interest.

Information about authors:

Zubkova E.S., <https://orcid.org/0009-0007-1843-4754>;

Kiseleva I.A., <https://orcid.org/0000-0001-7206-4220>;

Pasivkina M.A., <https://orcid.org/0000-0001-6223-1347>;

Vorobyova A.A., <https://orcid.org/0009-0007-7680-766X>;

Yefimova O.G., <https://orcid.org/0000-0002-0288-2188>;

Morozova E.B., <https://orcid.org/0009-0006-5482-0399>;

Vorobyov A.M., <https://orcid.org/0000-0003-4724-2464>;

Shastin P.H., <https://orcid.org/0000-0001-7360-927X>;

Laishchev A.I., <https://orcid.org/0000-0002-5050-2274>;

Zulkarneev Э.П., <https://orcid.org/0000-0002-5920-8098>;

Aleshkin A.B., <https://orcid.org/0000-0002-0532-1378>.

Conflict of interest. The authors declare that there is no information that could be interpreted as a conflict of interest.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 11.02.2025

Accepted 18.05.2025

Введение. Одним из основных аспектов контроля качества и безопасности пищевых продуктов является их микробиологическая безопасность. В частности, по данным ВОЗ, заболеваемость листериозом, вызываемым патогенными штаммами *Listeria monocytogenes*, составляет до 10 случаев на миллион. В Российской Федерации это заболевание также остается актуальной проблемой

из-за постоянного увеличения зарегистрированных случаев, главным образом среди взрослого населения [1].

Контаминация пищевого сырья и готовой продукции патогенными листериями, длительно сохраняющими жизнеспособность в окружающей среде и способными вызывать инфекционный процесс у человека, возникает из-за различных нарушений на стадиях тех-

нологического процесса [2, 3, 4]. Одним из приоритетных направлений пищевой промышленности является обеспечение населения качественной и безопасной продукцией. Современные требования к качеству мяса и мясной продукции определяются техническими регламентами ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», ТР ТС 034/2013 «О безопасности мяса и мясной продукции», в которых указано, что *Listeria monocytogenes* не должна выделяться из 25 г мясной продукции [5]. Контроль качества и хранение мяса требуют более технических подходов по причине его скоропортящейся природы, которая создает благоприятную среду для размножения микроорганизмов. Исходя из этого, по мере развития мясоперерабатывающей промышленности ведется постоянное внедрение передовых эффективных методов, в первую очередь, для сохранения качества и органолептических свойств мяса, что помогает поддерживать и расширять рынок.

Для сохранения и потребления мяса необходимы надлежащие методы обработки, обеспечивающие безопасность с точки зрения микробиологии и сохраняющие качество при длительном хранении. В условиях растущей конкуренции и сокращения прибыли мясная промышленность стремится искать новые инновационные способы обработки мяса, сохраняя при этом его качество и безопасность. Традиционные методы обработки и хранения мяса и мясных продуктов являются трудоемкими, отнимают много времени, требуют больших затрат и сложной подготовки образцов.

Перспективным направлением снижения распространения патогенных штаммов листерий в мясной продукции является применение биологически активных агентов – вирулентных бактериофагов, специфически лизирующих *L. monocytogenes* и обладающих выраженной антибактериальной активностью [6, 7].

Технологическое вспомогательное средство на основе индивидуально подобранных бактериофагов подразумевает процесс быстрого скрининга против циркулирующих в данный момент патогенных штаммов листерий на конкретном предприятии и стратегии периодической переоценки и корректировки штаммового состава фагового коктейля.

Более того, технологическое вспомогательное средство на основе индивидуально подобранных бактериофагов обладает потенциалом не только для селективного лизиса планктонных форм *Listeria monocytogenes*, но и для разрушения бактериальных биопленок, формирующихся на поверхностях пищевого оборудования. Эффективность бактериофагов в отношении биопленок подтверждена рядом исследований. Например, фаг P100 снижал численность *L. monocytogenes* в биопленках на нержавеющей стали на 10^5 КОЕ [8]; коктейль из трех фагов (LMPC01–03) эффективно разрушал как молодые, так и зрелые биопленки на полиэтилене и полипропилене [9]; а фаг СКА15 снижал бактериальную нагрузку в биопленках, имитирующих условия молочного производства [10].

В связи с вышесказанным, целью настоящей работы явилась разработка состава и технологии производства эффективного технологического вспомогательного средства (ТВС) на основе коктейля листериозных бактериофагов, не влияющего на органолептические свойства продукции, для селективной деконтаминации

мясных полуфабрикатов и оборудования перерабатывающих предприятий.

Однако ввиду высокой специфичности бактериофагов, необходимо провести ряд опытных исследований на мясоперерабатывающем предприятии для подтверждения их эффективности.

Материалы и методы. На опытном производстве из образцов полуфабрикатов, отобранных согласно ГОСТ 31904-2012 «Методы отбора проб для микробиологических испытаний», выделили по ГОСТ 32031-2022 «Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* и других видов *Listeria* (*Listeria* spp.)» и идентифицировали при помощи времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS) на приборе BactoSCREEN (ООО «НПФ «Литех», Россия) изоляты *Listeria monocytogenes* и другие виды *Listeria* spp.

Процедуру подбора бактериофагов проводили в два этапа – spot-test и методом эффективного посева, *in vitro* доказывающим, что бактериофаги способны реплицироваться на выделенных изолятах листерий. Бактериофаги и бактерии, используемые как штаммы-хозяева для культивирования и определения активности фаголизатов, используемые в работе, депонированы в Государственной коллекции вакцинных и патогенных штаммов ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН. С помощью полногеномного секвенирования установлено таксономическое положение бактериофагов и подтверждено отсутствие нежелательных генов. Геномные карты размещены в базе федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

Отработку режимов глубинного культивирования штамма-хозяина и бактериофагов (состав питательного бульона, количество посевного материала штамма-хозяина и маточного бактериофага, pH, температуру, оптическую плотность, уровень аэрации) проводили в биореакторе Biostat A-MO (Sartorius).

Очистку полученного фаголизата проводили методом двухэтапной мембранной фильтрации с подбором материала фильтрующей поверхности, снижающей сорбцию фаговых частиц, с последующим определением микробной чистоты, остаточного белка и ДНК штамма-хозяина.

В полученном ТВС определяли концентрацию фаговых частиц методом Грациа (двойных агаровых слоев) на патогенном штамме *Listeria monocytogenes* ECDE.

Деконтаминацию опытных серий свиного фарша ТВС осуществляли на разных этапах технологического процесса. В таблице 1 представлен дизайн эксперимента.

Микробиологический мониторинг образцов фарша осуществляли в течение 13 суток.

Результаты исследования и их обсуждение

С целью выделения представителей рода *Listeria* на опытном производстве на разных этапах технологического процесса отбирались образцы продукции и проводилось их микробиологическое исследование согласно соответствующим нормативным документам.

В образцах свиного фарша идентифицировали видовой состав выделяемых листерий. В трех образцах свиного фарша были выделены *Listeria* spp., в том числе *Listeria monocytogenes* – 47,9 % от общего числа выделенных листерий. На рисунке 1 представлен видовой состав выделяемых листерий.

Таблица 1

Дизайн эксперимента по обработке мясного фарша ТВС на основе коктейля из листериозных бактериофагов

№ испытания	Наименование и количество серий	Раствор для обработки	Дозировка раствора	Объект обработки
1	3 опытные серии	<i>L. monocytogenes</i> phage BF-1362, <i>L. monocytogenes</i> phage BF-1426	0,13 мл 10 ⁹ БОЕ/мл на 1 кг мяса	Обработка оборудования и фарша
	3 контрольные серии	Стерильный физраствор	0,13 мл на 1 кг мяса	
2	3 опытные серии	<i>L. monocytogenes</i> phage BF-1362, <i>L. monocytogenes</i> phage BF-1426	1,0 мл 10 ⁹ БОЕ/мл на 1 кг мяса	Обработка фарша
	1 контрольная серия	Стерильный физраствор	1,0 мл на 1 кг мяса	

С помощью двухэтапного метода, при котором на первом этапе используется метод «spot-test», а на втором – подтверждается возможность репликации выбранных бактериофагов на изолятах микроорганизмов с помощью метода Грациа [11], были индивидуально подобраны два листериозных бактериофага: *Listeria phage* BF-1362 и *Listeria phage* BF-1426, активных в отношении выделенных на мясоперерабатывающем

предприятии изолятов *Listeria monocytogenes*. Данный метод позволяет исключить ложно-положительные результаты и отобрать штаммы бактериофагов, способные к репликации на выделенном полевом изоляте, поскольку от правильного учета результатов *in vitro* исследований во многом зависит эффективность проводимой в дальнейшем фаг-опосредованной дезинфекции.

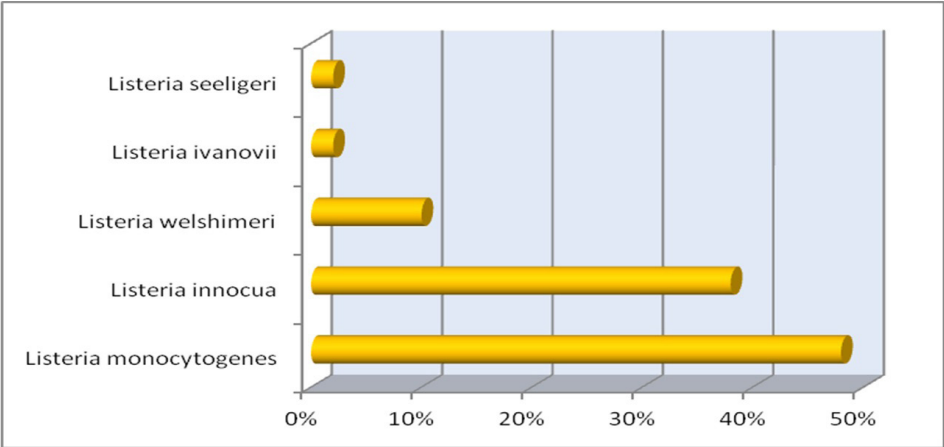


Рис. 1. Видовой состав *Listeria* spp., выделенных из трех проб мясных полуфабрикатов на опытном мясоперерабатывающем предприятии.

Согласно результатам эксперимента, была доказана 100 % чувствительность выделенных и идентифицированных изолятов бактерий рода *Listeria* к испытываемым бактериофагам *Listeria phage* BF-1362 и BF-1426 *in vitro*. При этом можно сделать вывод, что исследуемые бактериофаги при оптимальных условиях применения могут приводить к элиминации не только патогенных *Listeria monocytogenes*, но и других видов бактерий этого рода, которые часто рассматриваются как индикаторы санитарного неблагополучия на пищевых предприятиях.

Обработку режимов глубинного культивирования штамма-хозяина *Listeria innocua* В-1319 и по отдельности бактериофагов BF-1362 и BF-1426 *in vitro* проводили в биореакторе системы Biostat A-MO (Sartorius, Германия) (Рис 2), контрольно-измерительная составляющая которого позволяет выполнять измерения температуры, кислотности и концентрации растворенного кислорода в режиме реального времени, которые необходимо контролировать при культивировании микроорганизмов.

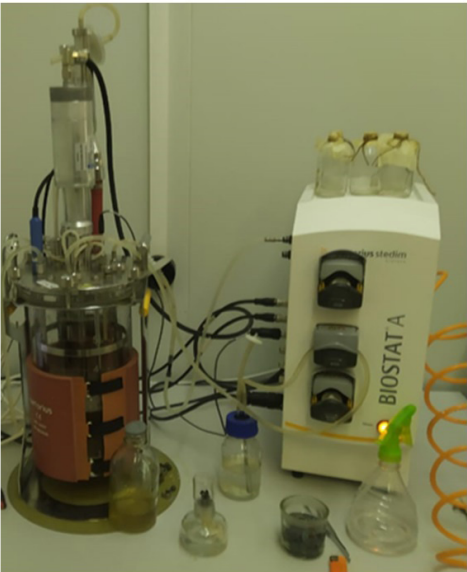


Рис. 2. Биореактор системы Biostat A-MO (Sartorius, Германия).

На первом этапе работы из шести различных жидких питательных сред был отобран бульон с сердечно-мозговым экстрактом (HiMedia), так как на нем в процессе культивирования титр биомассы был самым высоким и достигал $4,5 \times 10^9$ КОЕ/мл. Подобрано процентное соотношение посевного материала, при котором скорость роста и накопление биомассы штамма-хозяина *Listeria innocua* В-1319 были оптимальными (Табл. 2).

Затем была построена кривая роста (Рис. 3) для определения начала экспоненциальной стадии роста культуры, в которой бактериофагом заражают растущую в жидкой среде культуру бактерий для достижения максимального урожая выхода фага. При достижении культурой оптической плотности при длине волны $\lambda 565 \pm 15$ нм 2,8 титр клеток соответствовал 1×10^9 КОЕ/мл.

Таблица 2

Изменение оптической плотности и титра клеток (КОЕ/мл) при культивировании биомассы *Listeria innocua* В-1319 в различных питательных бульонах

Наименование бульона	OD ₅₆₅	КОЕ/мл
МПБ (Оболенск)	3,2	$5,6 \times 10^8$
СПБ (Махачкала)	1,5	$7,8 \times 10^7$
Питательный бульон (HiMedia)	2,3	$4,2 \times 10^8$
ГМ-Ф (НИЦФ)	4,4	$1,2 \times 10^9$
ГМ-Ф (Оболенск)	1,8	$1,3 \times 10^8$
Бульон с сердечно-мозговым экстрактом (HiMedia)	4,4	$4,5 \times 10^9$

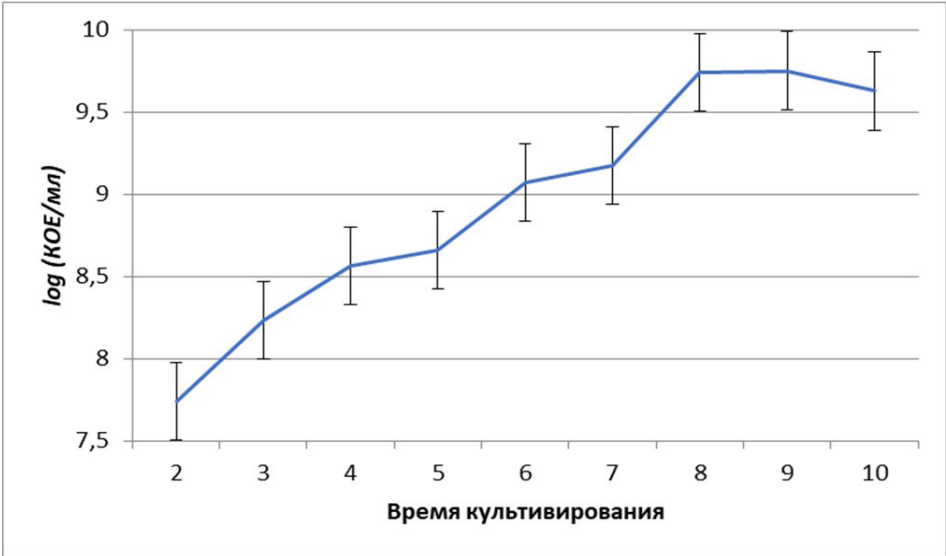


Рис. 3. Кривая роста *Listeria innocua* В-1319 в биореакторе.

На следующем этапе отработки технологического процесса культивирования бактериофагов было определено, что лучший выход активных фаговых частиц выявлен при множественности инфицирования культивируемого бактериофага к штамму хозяина 0,005. Процесс культивирования бактериофага проходил при оптимальной температуре 25°С до достижения ОП – 0,55, при этом ОП стерильного питательного бульона была 0,52, уровень pH поддерживали в пределах 7,2–7,6, уровень аэрации составил 200–500 куб. см³/мин. При отработке технологии двухступенчатой очистки полученных фаголизатов были подобраны фильтры с мембраны из полиэфирсульфона с диаметром пор 0,22 мкм, при прохождении через которые степень сорбции фаговых частиц оказалась наименьшей. В результате очистки фаголизата удалось снизить содержание остаточного белка в 2,3 раза и остаточной ДНК бактерий-хозяев – в 1,8 раза. В полученном фаголизате определяли концентрацию вирусных частиц методом Грация на патогенном штамме *Listeria monocytogenes*

ЕСДЕ. Она составила 8×10^9 БОЕ/мл. Затем бактериофаги смешали так, чтобы получить содержание вирусных частиц в технологическом вспомогательном средстве 1×10^9 БОЕ/мл каждого бактериофага. Биодеконтаминацию опытных серий свиного фарша при помощи полученного ТВС осуществляли на разных этапах технологического процесса. В первой серии опытов – на стадиях измельчения с помощью блокорезки и волчка, а также на конечном этапе смешивания фарша с посолочными ингредиентами и специями, в рамках второй серии опытов – исключительно на этапе смешивания фарша. Опытные серии обрабатывались ТВС, контрольные серии – плацебо (физиологический раствор) в объеме, аналогичном фаговому коктейлю. На микробиологический мониторинг, который осуществляли в течение 13 суток, направлялись образцы мясного фарша от каждой опытной и контрольной серии, расфасованные в индивидуальные упаковки массой по 500 гр. При производстве первой серии опытов изготовле-

но и передано в микробиологическую лабораторию 78 опытных и контрольных образцов свиного фарша. Из поступивших проб в течение 13 дней было выделено 442 изолята различных видов микроорганизмов. Среди них идентифицировано 75 изолятов бактерий рода *Listeria*, относящихся к пяти видам: *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria welshimeri*.

Стоит отметить, что одновременно из одного и то-

го же образца фарша выделялось несколько различных видов *Listeria*.

Согласно данным, отраженным в таблице 3, установлено, что 27 культур относятся к виду *Listeria monocytogenes*, а оставшиеся 48 изолятов относятся к другим видам *Listeria*, не контролируемым по 21 Техническому регламенту Таможенного союза «О безопасности пищевой продукции» или другими регулирующими стандартами.

Таблица 3

Видовой состав листерий, полученных из образцов мясного фарша в первой опытной серии

Вид микроорганизма	Количество	% в структуре
<i>Listeria innocua</i>	37	49,33
<i>Listeria monocytogenes</i>	27	36,00
<i>Listeria welshimeri</i>	5	6,67
<i>Listeria ivanovii</i>	4	5,33
<i>Listeria seeligeri</i>	2	2,67

При проведении первого испытания в опытных сериях при обработке ТВС на основе бактериофагов *L. monocytogenes* phage BF-1362 и *L. monocytogenes* phage BF-1426 в дозировке 0,13 мл 10⁹ БОЕ/мл на 1 кг мяса при обработке оборудования и добавлении ТВС непосредственно в свиной фарш наблюдалось снижение

количества выделяемых *L. monocytogenes*: в 1-ой – на 28,6 %, во 2-ой – на 85,7 %, в 3-ей – на 100% – полная элиминация патогенного возбудителя (по сравнению с контролем) (рис. 4). Это свидетельствует о частичной эффективности ТВС для предотвращения контаминации свиного фарша патогенными бактериями.

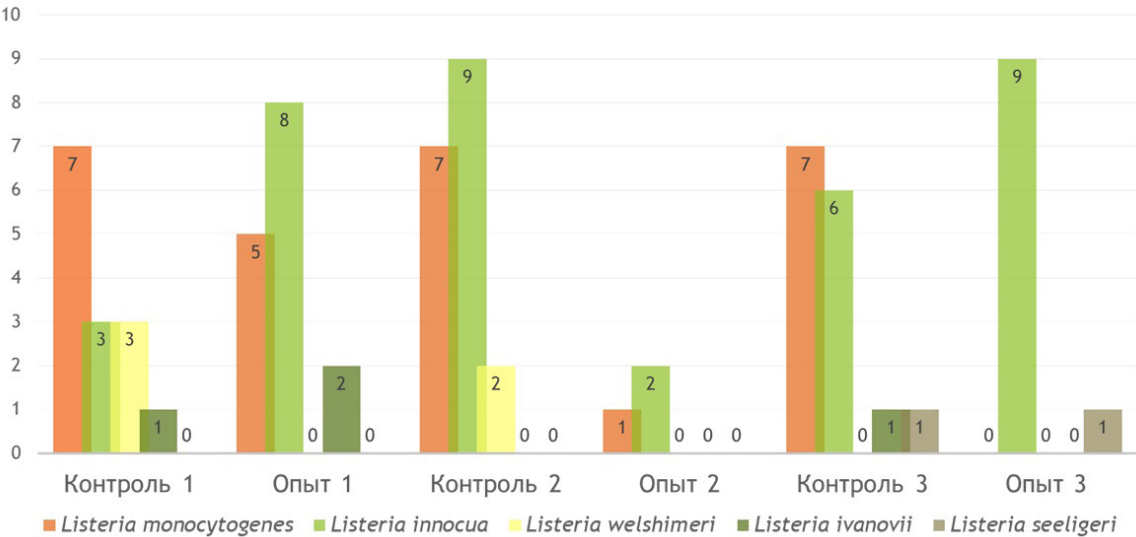


Рис. 4 Высеv листерий в опытных и контрольных группах в первой серии опытов

Также после проведения микробиологического исследования выявлено, что при обработке композицией литических бактериофагов выделение других видов листерий не снижается так, как у патогенного *L. monocytogenes*. Частичная эрадикация может быть ассоциирована с недостаточным количеством фаговых частиц по отношению к количеству бактерий. Для решения данной проблемы во второй серии опытов была скорректирована множественность инфицирования в ТВС на единицу продукции.

При проведении второго цикла испытаний исключили обработку технологического оборудования, но увеличили концентрацию бактериофагов в ТВС до 1 мл на 1 кг мяса с концентрацией бактериофагов 1 x 10⁹

БОЕ/мл.

Для микробиологического мониторинга было отобрано и исследовано 52 образца свиного фарша. В опытных сериях фарша к 13 дню листерии не обнаружены (рис. 5), тогда как в контрольных сериях по-прежнему выделялись различные виды листерий, в том числе патогенные для человека *Listeria monocytogenes*. Следует обратить внимание, что на 1 сутки во втором испытании во 2-й серии опыта был высеян и подтвержден изолят патогенной листерии, а в дальнейшем эти микроорганизмы не высевались, в связи с чем выдвинуто предположение об отсроченном действии ТВС на основе бактериофагов, связанном с природой взаимодействия фаг – бактерия-мишень.

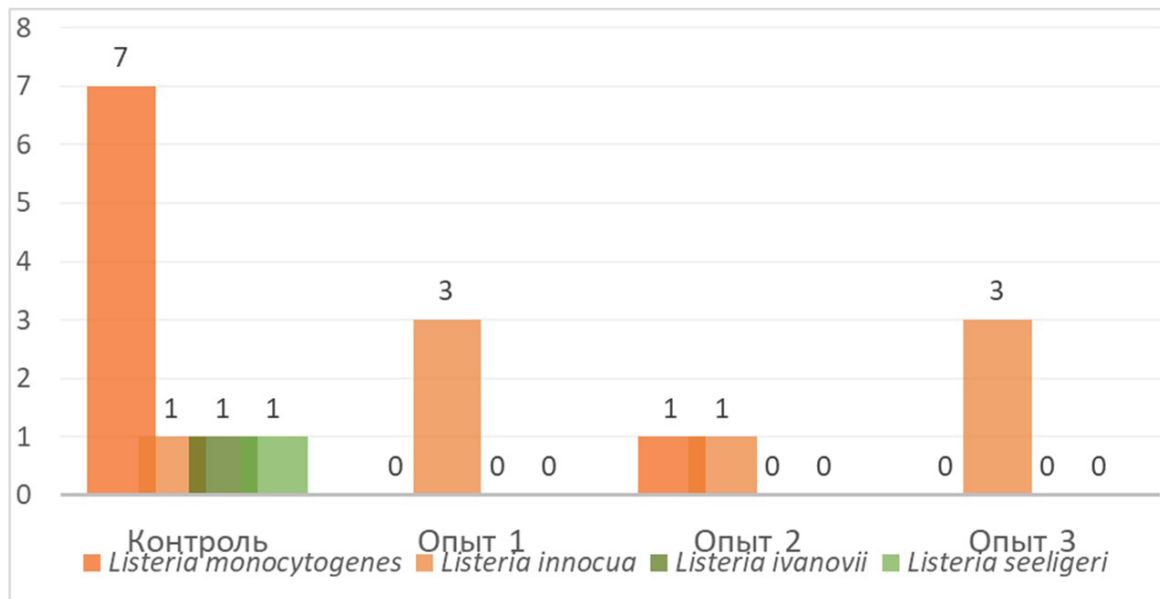


Рис. 5. Выделение листерий из образцов фарша при проведении второго цикла испытаний на промышленном мясоперерабатывающем производстве.

Бактериофаги обладают способностью к саморепликации на бактерии-мишени с их последующим лизисом и инфицированием соседних клеток возбудителя. Поэтому элиминация патогенных микроорганизмов из мясного фарша и с поверхности оборудования происходит спустя некоторое время после непосредственной обработки ТВС, что отличает их действие от стандартных применяемых химических средств, для которых свойственно одномоментное воздействие на патоген исключительно в зоне контакта с ТВС. Одним из потенциальных ограничений применения бактериофагов в составе технологических вспомогательных средств (ТВС) является возможность формирования резистентности у бактерий-мишеней, включая *Listeria monocytogenes*. Несмотря на то, что бактериофаги *Listeria phage* BF-1362 и BF-1426 демонстрировали выраженную литическую активность *in vitro* и *in situ*, существует риск снижения их эффективности при длительном использовании. Для минимизации вероятности развития устойчивости рекомендуется ротация или периодическая корректировка фагового коктейля с учетом изменений в циркулирующей микрофлоре на производстве, что уже заложено в стратегию применения ТВС.

Таким образом, подобран бактериофаговый состав ТВС и его оптимальная концентрация к единице фарша: 1 мл коктейля бактериофагов в титре 1×10^9 БОЕ/мл на 1 кг мясного фарша, достаточная для элиминации в опытных сериях фарша *Listeria monocytogenes* со 2-х до 13-х суток эксперимента. Встречаемость ранее выделяемых патогенных листерий в опытных сериях фарша не наблюдалась, в то время как в контрольных сериях в 54 % образцах были выделены штаммы *Listeria monocytogenes*. Состав ТВС показал сохранение активности в интервале температур от -80°C до $+25^\circ\text{C}$, что охватывает весь диапазон условий хранения и транспортировки, применимых в пищевой промышленности. Таким образом, при соблюдении стандартных производственных условий хранения (4°C или

ниже) риск потери активности фагов минимален, что подтверждает технологическую устойчивость разработанного средства.

Выводы. Недостаточная противомикробная обработка мясных полуфабрикатов может стать причиной распространения зоонозных инфекций с риском развития тяжелых заболеваний.

Листериоз – один из эпидемически значимых заболеваний, вспышки которого связаны с потреблением загрязненной мясной продукции. Циркулирующие на мясоперерабатывающих предприятиях *Listeria monocytogenes* способны к образованию биопленок на поверхностях технологического оборудования, из-за чего возникает устойчивость к физическим и химическим методам дезинфекции. Поэтому разработка ТВС на основе листериозных бактериофагов является актуальной задачей.

Путем экспериментального подбора разработана рецептура и отработана технология получения эффективного ТВС, с помощью которого была достигнута элиминация патогенных штаммов листерий в образцах свиного фарша: 1 мл коктейля бактериофагов в титре 10^9 БОЕ/мл на 1 кг мясных полуфабрикатов.

Следовательно, ТВС на основе индивидуально подобранных для конкретного мясоперерабатывающего предприятия листериозных бактериофагов является перспективным для применения на перерабатывающих предприятиях.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 3-4, 8-10 см. REFERENCES)

1. Честнова Т.В., Малютин Т.К., Гусакова Д.Р., Зайцева Е.Д. Динамика эпидемического процесса при листериозе в России и мире (обзор литературы). *Вестник новых медицинских технологий*. 2024; 18 (6): 101–110. DOI 10.24412/2075-4094-2024-6-2-1
2. Абдуллаева А.М., Блинкова Л.П., Уша Б.В., Валитова Р.К., Хокканен М.А. Микробиологический мониторинг контаминации птицепродуктов. *Российский журнал «Проблемы ветеринарной сани-*

- тарии, гигиены и экологии». 2020; 3 (35): 291–303. DOI 10.36871/vet.san.hyg.ecol.202003003
5. Татарина З.Г. Листерии (*L. monocytogenes*) как фактор загрязнения мясной продукции. *Вестник АГТУ*. 2021; 4 (4): 16–20.
 6. Алешкин А.В., Ларина Ю.В., Воложанцев Н.В., Зейгарник М.В., Киселева И.А., Верёвкин В.В. и др. Опыт деконтаминации пищевых полуфабрикатов с помощью бактериофагов. *Вопросы диетологии*. 2015; 5 (1): 24–30.
 7. Шастин П.Н., Якимова Э.А., Супова А.В., Савинов В.А., Ежова Е.Г., Хабарова А.В. и др. Антибиотикорезистентность и фагочувствительность листериозных патогенов. *Аграрная наука*. 2024; 3: 50–56. DOI 10.32634/0869-8155-2024-380-3-50-56
 11. Юшкевич Е.А., Калашников В.А., Шаповалов С.О., Лаишевцев А.И., Плешаков А.В., Киселева И.А. и др. Алгоритм подбора бактериофагов для эффективной эрадикации сальмонелл на животноводческих предприятиях. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2024; 29 (1): 43–57. DOI: <https://doi.org/10.51620/EID-2024-29-1-43-57>
-
- ## REFERENCES
1. Chestnova T.V., Malyutina T.K., Gusakova D.R., Zaitseva E.D. Dynamics of the epidemic process in listeriosis in Russia and the world (literature review). *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy. Elektronnoye izdaniye*. 2024; 18 (6): 101–110. (in Russ.). DOI: 10.24412/2075-4094-2024-6-2-1
 2. Abdullaeva A.M., Blinkova L.P., Usha B.V., Valitova R.K., Hokkanen M.A. Microbiological monitoring of contamination of poultry products. *Rossiyskiy zhurnal Problemy veterinarnoy sanitarii, gigiyeny i ekologii*. 2020; 3 (35): 291–303. (in Russ.). DOI: 10.36871/vet.san.hyg.ecol.202003003
 3. Swaminathan B., Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.* 2007; 9 (10): 1236–43. DOI: 10.1016/j.micinf.2007.05.011
 4. Weiler C., Ifland A., Naumann A., Kleta S., Noll M. Incorporation of *Listeria monocytogenes* strains in raw milk biofilms. *Int J Food Microbiol.* 2013; 1; 161 (2): 61–8. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.027
 5. Tatarina Z.G. *Listeria* (*L. monocytogenes*) as a factor of contamination of meat products. *Vestnik arkticheskogo gosudarstvennogo agrotekhnologicheskogo universiteta* 2021; 4 (4): 16–20. (in Russ.).
 6. Aleshkin A.V., Larina Yu.V., Volozhantsev N.V., Zeigarnik M.V., Kiseleva I.A., Verevkin V.V. et al. The experience of decontamination of semi-finished food products using bacteriophages. *Voprosy diyetologii*. 2015; 5 (1): 24–30.
 7. Shastin P.N., Yakimova E.A., Supova A.V., Savinov V.A., Egorova E.G., Khabarova A.V. et al. Antibiotic resistance and phage sensitivity of listeriosis pathogens. *Agrarnaya nauka*. 2024; 3: 50–56. (in Russ.). DOI: 10.32634/0869-8155-2024-380-3-50-56
 8. Soni K.A., Nannapaneni R. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. *Journal of Food Protection*. 2010; 73(8): 1519–1524. DOI: 10.4315/0362-028X-73.8.1519
 9. Lee D.Y., Lee S.H., Kim K.P., Kim Y.H. Inhibitory effects of bacteriophage cocktail against *Listeria monocytogenes* biofilms on food-contact surfaces at various temperatures. *Food Science and Biotechnology*. 2022; 31: 1401–1411. DOI: 10.1007/s10068-022-01145-3
 10. Teixeira P., Ferreira V., Rocha R., Silva J. Bacteriophage CKA15 reduces *Listeria monocytogenes* in biofilms formed under dairy processing conditions. *LWT – Food Science and Technology*. 2024; 193: 114142. DOI: 10.1016/j.lwt.2024.114142
 11. Yushkevich E.A., Kalashnikov V.A., Shapovalov S.A., Laishetvsev A.I., Pleshakov A.V., Kiseleva I.A. et al. An algorithm for the selection of bacteriophages for the effective eradication of *Salmonella* in livestock enterprises. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni* (Epidemiology and Infectious Diseases). 2024; 29 (1): 43–57 (in Russ.). DOI: 10.51620/EID-2024-29-1-43-57