

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Е.В. Сульдина, Н.А. Феоктистова, П.С. Майоров,  
А.В. Мاستиленко, И.И. Богданов

# БАКТЕРИОФАГИ ДЛЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ДЕЗИНФЕКЦИИ

МОНОГРАФИЯ



Ульяновск  
2023

УДК 578:579

Бактериофаги для биологической дезинфекции. Монография / Е.В. Сульдина, Н.А. Феоктистова, П.С. Майоров, А.В. Мاستиленко, И.И. Богданов – Ульяновск, 2023. – 240 с.

Научное издание

Рецензент: Викторов Денис Александрович, кандидат биологических наук, старший научный Научно-исследовательского технологического института им. С. П. Капицы ФГБОУ ВО Ульяновский государственный университет

В монографии представлены результаты научных исследований сотрудников кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, выполненных согласно тематическому плану-заданию Министерства сельского хозяйства Российской Федерации, регистрационный номер ЕГИСУ НИОКТР 1022040900033-0-1.6.2. Монография содержит краткий обзор литературных данных по проблеме исследования и отражает методологию и основные результаты по разработке биопрепарата на основе бактериофагов *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* для биологической дезинфекции.

Монография адресована биологам, ветеринарным врачам, аспирантам, магистрантам и студентам учебных заведений биологического и ветеринарного профиля, научным работникам и специалистам в области сельского хозяйства.

Печатается по решению научно-технического совета ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ  
Протокол № 2 от 11 октября 2023 года

ISBN 978-5-6051071-6-3

© Сульдина Е.В., Феоктистова Н.А., Майоров П.С., Мاستиленко А.В., Богданов И.И., 2023

© ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ, 2023

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ.....</b>	<b>6</b>
<b>1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>9</b>
1.1 Применение бактериофагов для биоконтроля фитопатогенных бактерий.....	9
1.1.1 Фитопатогенные бактерии вида <i>Pseudomonas syringae</i> .....	11
1.2 Применение бактериофагов для деконтаминации продуктов растительного происхождения.....	20
1.2.1 Положительные и отрицательные последствия использования фагов в плодоовощной промышленности.....	24
1.3 Основные стратегии борьбы с пищевыми патогенами.....	28
1.3.1 Патогены пищевого происхождения.....	32
1.4 Бактериофаги как ингибиторы образования биопленок.....	40
1.4.1 Бактериальные биопленки.....	41
1.4.2 Взаимодействие между фагами и бактериальными биопленками.....	44
1.4.3 Стратегии профилактики и борьбы с биопленками патогенных бактерий.....	47
1.5 Бактериофаги как средства дезинфекции.....	57
1.6 Критические факторы при разработке и применении средств на основе консорциума бактериофагов.....	61
1.7.1 Длительное хранение и транспортировка.....	61
1.7.2 Неблагоприятные условия окружающей среды.....	63
1.7.3 Время и стоимость разработки.....	65
1.7.4 Типы фагов, используемых в качестве агентов биоконтроля, и лежащие в их основе механизмы действия.....	65
<b>2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....</b>	<b>70</b>

2.1. Материалы и методы исследований.....	70
2.1.1. Материалы.....	70
2.1.2. Методы.....	74
2.2. Результаты собственных исследований.....	85
2.2.1. Выделение и изучение биологических свойств новых штаммов фитопатогенных бактерий <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Bacillus pumilus</i> и основных пищевых патогенов <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Bacillus cereus</i> .....	85
2.2.2.1 Выделение и изучение биологических свойств новых штаммов бактерий вида <i>Pseudomonas syringae</i> .....	85
2.2.2.2 Выделение и изучение биологических свойств новых штаммов бактерий вида <i>Bacillus pumilus</i> .....	96
2.2.2.3 Выделение и изучение биологических свойств новых штаммов бактерий вида <i>Listeria monocytogenes</i> .....	101
2.2.2.4 Выделение и изучение биологических свойств новых штаммов бактерий вида <i>Yersinia enterocolitica</i> .....	105
2.2.2.5 Выделение и изучение биологических свойств новых штаммов бактерий вида <i>Bacillus cereus</i> .....	108
2.2.2.6 Ареал и степень распространения изучаемых бактерий.....	114
2.2.2. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов, активных в отношении бактерий <i>Pseudomonas syringae</i> , <i>Bacillus pumilus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Bacillus cereus</i> .....	116
2.2.2.1 Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов активных в отношении <i>Pseudomonas syringae</i> .....	116
2.2.2.2 Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов активных в отношении <i>Bacillus pumilus</i> .....	122
2.2.2.3 Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов активных в отношении <i>Listeria monocytogenes</i> .....	126
2.2.2.4 Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов	

<i>активных в отношении Yersinia enterocolitica</i> .....	130
2.2.2.5 <i>Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов</i>	
<i>активных в отношении Bacillus cereus</i> .....	135
2.2.3. <i>Конструирование полифагового биопрепарата на основе</i>	
<i>отобранных фагов с заданными биологическими свойствами</i> .....	139
2.2.3.1 <i>Сохранение показателя литической активности отобранных</i>	
<i>бактериофагов при хранении</i> .....	139
2.2.3.2 <i>Поиск в геноме производственно-перспективных</i>	
<i>бактериофагов «локусов патогенности»</i> .....	140
2.2.4 <i>Подбор технологических параметров изготовления</i>	
<i>биопрепарата на основе бактериофагов</i> .....	165
2.2.4.1 <i>Разработка технологической схемы наработки</i>	
<i>экспериментальной партии биопрепарата</i> .....	172
2.2.5 <i>Изучение эффективности применения сконструированного</i>	
<i>полифагового биопрепарата в лабораторных условиях</i> .....	174
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....	<b>177</b>
<b>СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ...</b>	<b>180</b>
Приложение 1.....	238
Приложение 2.....	239

## ВВЕДЕНИЕ

Поиск и разработка дезинфицирующих средств является перспективной областью исследований во всем мире. Однако в настоящее время не существует международных правил, регулирующих тестирование и регистрацию бактерицидных агентов. Кроме того, возросло количество требований безопасности к дезинфицирующим средствам для сохранения здоровья человека, животных и окружающей среды. Болезни бактериальной этиологии наносят значительный вред человеку и животным, а многие пищевые продукты подвержены бактериальной порче. По мере расширения научных данных об устойчивости бактерий к антибиотикам и антимикробным препаратам все более актуальным становится использование антибактериальных препаратов избирательного действия, в том числе фагосодержащих препаратов. Существует целый ряд методов для дезинфекции продуктов питания, овощей и мест их хранения. Традиционно к таким методам относят - пастеризацию и обработку под высоким давлением – это повышает безопасность пищевых продуктов, но такой способ непригоден для мяса, овощей, фруктов и ягод, а также для холодильных камер. Лучевая обработка вызывает озабоченность у потребителей, поскольку может изменить органолептические свойства пищевых продуктов. Химическая дезинфекция пищевых продуктов и мест их хранения также становится все менее популярной, поскольку химические дезинфицирующие средства убивают полезную микрофлору пищеварительного тракта, способствуют развитию устойчивости у бактерий и наносят вред окружающей среде. Кроме того, вспышки инфекций пищевого происхождения регулярно происходят даже при использовании всех вышеперечисленных методов.

В последние годы фаги считаются перспективным методом дезинфекции в пищевой промышленности.

По данным Hendrix, R. W. с соавторами вирусы бактерий являются самой многочисленной формой жизни на Земле [1-2]. Бактериофаги десятикратно превышают количество существующих бактериальных клеток, при этом глобально виросфера содержит порядка  $10^{31}$  вирусоподобных частиц [3].

Постоянное взаимодействие фагов и бактерий в процессе эволюции привело к высокому разнообразию среди вирусов бактерий в природе [4]. Исследования фагов за последние десять лет пережили рессургенцию после нескольких десятилетий спада и в настоящее время интерес ученых сосредоточен на исследованиях генома и эволюции, системной биологии и горизонтальном переносе генов. На практике же все больше биопрепаратов на основе бактериофагов предлагаются для профилактического применения [5-6], дезинфекции и контроля бактериальных патогенов при производстве пищевых продуктов и их хранении [7-8], что связано с тем, что фаги не наносят ущерба популяциям полезных бактерий [9].

Использование литических бактериофагов в качестве потенциальных кандидатов в противомикробные препараты является интересной профилактической альтернативой или дополнением к традиционной терапии и профилактике во времена повышения устойчивости бактерий к антибиотикам [10-11]. Потенциальные области применения бактериофагов, включают борьбу с патогенами пищевого происхождения, использование в качестве консервантов в пищевых / органических продуктах, уменьшение бактериальных популяций на различных поверхностях, жидкостях или аэрозолях, уменьшение/элиминацию бактериальных биопленок [12].

Применение фагового биоконтроля является естественной «зеленой» технологией, которая обладает избирательным действием. Кроме того, бактериофаги являются естественными агентами, безопасными для окружающей среды. Сегодня все фаги, входящие в состав продуктов для биоконтроля, являются вирулентными. Большинство фаговых препаратов не содержат химических веществ, только водный раствор фагов и низкую

концентрацию солей. По данным испытаний бактериофаги не изменяют органолептических свойств пищевых продуктов, не разрушают материалы и не обладают коррозионным воздействием, а стоимость использования фаговых препаратов для применения в пищевой промышленности относительно невелика.

Анализ источников информации показал, что на мировом рынке производство бактериофагосодержащих продуктов для применения их в качестве дезинфектантов является перспективным и даже необходимым для увеличения сроков хранения продуктов готовых к употреблению и снижения риска инфекций пищевого происхождения.

Таким образом, проведенное исследование было направлено на разработку нового экологичного дезинфицирующего средства избирательного действия для биологической дезинфекции и разработку методов его применения.



# 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

## 1.1 Применение бактериофагов против фитопатогенных бактерий

Чрезвычайно растущая популяция людей на планете Земля создает устрашающие угрозы для цепочки поставок продовольствия, что создает серьезные риски для продовольственной безопасности. Для удовлетворения растущего спроса, возможно, потребуется разработать устойчивую систему производства продуктов питания за счет снижения воздействия болезней на сельскохозяйственные культуры. Возникающие болезни сельскохозяйственных культур, вызываемые основными фитопатогенами, включая вирусы, бактерии, грибы, нематоды и оомицеты, провоцируют серьезные вызовы, усугубляя глобальную систему продовольственной безопасности в настоящее время [13-24]. Среди фитопатогенов насчитывается более 200 видов фитобактерий, которые ответственны за значительные потери урожая во время подготовки к уборке, хранения и транспортировки [25]. Наиболее значимыми являются представители родов *Agrobacterium*, *Burkholderia*, *Dickeya*, *Erwinia*, *Ralstonia*, *Pectobacteria*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* и *Xylella*, которые преимущественно развивались, препятствуя защите растений и различным стратегиям борьбы с ними [26-31].

Что касается антибиотиков патосистемной направленности, то устойчивость фитопатогенов стала проблематичной, когда в 1940-х годах, после открытия пенициллина Александром Фламिंगом в 1928 году, началось широкое их применение [32]. Это, возможно, привело к развитию устойчивости к антибиотикам у различных патогенов растений посредством приобретения детерминант устойчивости, опосредованных горизонтальным переносом генов. Например, сообщается, что гены устойчивости к антибиотикам (*strAB*) встречаются у *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* и *Erwinia amylovora*, вызывающие устойчивость к стрептомицину, и считается, что эти гены были приобретены у эпифитных бактерий,

совместно расположенных на растениях-хозяевах при применении антибиотиков [31-36].

Широкое использование противомикробных препаратов на основе меди может привести к ее накоплению в окружающей среде и продовольственных культурах, что связано с опасностями для здоровья человека, токсическим воздействием на растения и эволюцией устойчивых к меди вариантов фитопатогенов [37-42]. Токсичность, вызванная медью, в первую очередь связана с рядом проблем у людей и животных, включая репродуктивные, печеночные, желудочно-кишечные и нейродегенеративные расстройства [43-46]. Кроме того, сообщалось также, что опосредованная медью интоксикация увеличивает смертность и заболеваемость *Drosophila melanogaster* и *Apis mellifera* [47-49]. Чрезмерное применение пестицидов меди и наночастиц оксида меди на различных сельскохозяйственных культурах, таких как *Brassica chinensis*, *B. alboglabra*, *Chrysanthemum coronarium* и *Hordeum sativum distichum*, может привести к окислительному стрессу, нарушению роста, ухудшению фотосинтетического пигмента и прекращению прорастания [50-53]. Однако фитопатогены эволюционировали и выработали устойчивость к вышеупомянутому широкому применению пестицидов, что стало серьезной проблемой текущего сценария в системе сельскохозяйственного производства [54]. Патогенные для растений бактерии, входящие в состав родов *Stenotrophomonas*, *Xanthomonas* и *Pseudomonas*, устойчивы к противомикробным пестицидам на основе меди и это несет существенную угрозу в стратегии борьбы с ними [55-58]. Аналогично, *X. citri* subsp. *citri*, *X. alfalfae* subsp. *citrumelonis*, *X. euvesicatoria*, *X. perforans* и *P. syringae* pv. *phaseolicola* проявляли устойчивость к меди и вызывали тяжелые заболевания культур цитрусовых и томатов [59]. Поскольку применение меди рассматривается как основной подход к борьбе с фитопатогенами, это вызывает серьезную озабоченность при лечении микробных заболеваний. Недавно в нескольких странах были запрещены или

ограничены составы для защиты растений на основе меди, и были разработаны инновационные стратегии борьбы, включая использование бактериофагов в качестве потенциальных устойчивых противомикробных средств [60- 64].

### ***1.1.1 Фитопатогенные бактерии вида *Pseudomonas syringae****

*Pseudomonas syringae* - вид фитопатогенных бактерий, относящийся к классу гаммапротеобактерий и вызывающий во всем мире заболевания однодольных, травянистых и древесно-двудольных видов растений. К настоящему времени у этого вида бактерий было идентифицировано более 60 патоваров, каждый из которых поражает определенные растения-хозяева. Штаммы большинства патоваров обычно демонстрируют узкий диапазон хозяев, за исключением патовара *syringae*, диапазон хозяев которого насчитывает более 80 видов растений, включая косточковые, семечковые, культурные растения и злаки [65-67].

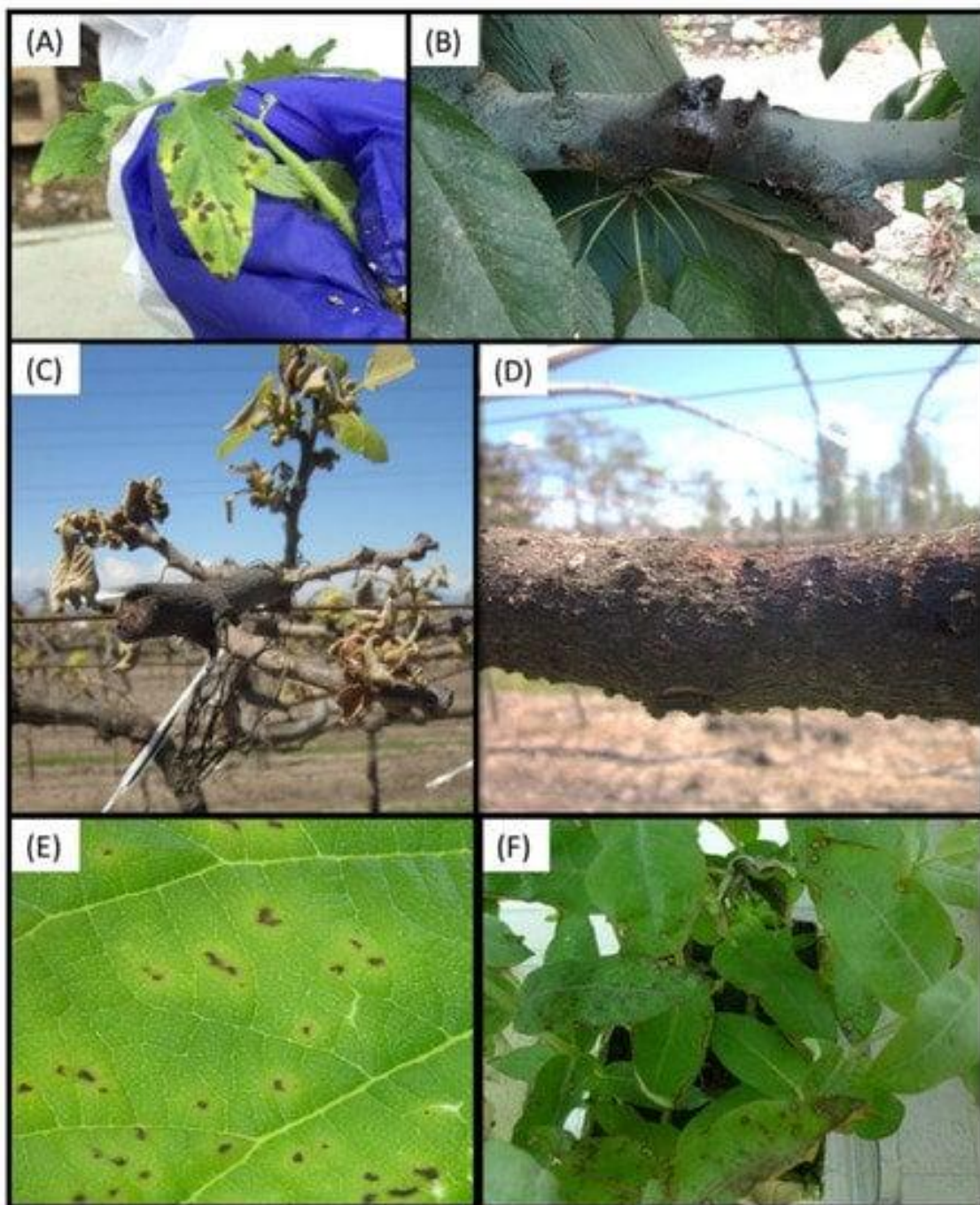
Во время заражения у *P. syringae* есть две основные взаимосвязанные фазы роста: эпифитная фаза, когда бактерии обитают на поверхности тканей растений, обычно надземных частей, таких как листья, стебли, цветы и плоды; и эндофитная фаза, когда бактерии проникают в ткани растений и колонизируют межклеточное пространство апопласта. Симптоматика появляется только после того, как бактерии попадают в растение и размножаются в апопласте во время эндофитной фазы [68]. Несколько исследований показали способность *P. syringae* выживать в окружающей среде вне растений-хозяев. Таким образом, несколько патогенов *P. syringae* были выделены как из больных растений, так и из несельскохозяйственных местообитаний, таких как реки и даже снег [69-70]. Было высказано предположение, что эта способность расти в окружающей среде является одним из факторов, которые могли бы объяснить эволюцию *P. syringae* и появление новых крайне разрушительных штаммов этого растительного патогена [69, 71]. В окружающей среде

эпифитные популяции, латентная инфекция, места зимовки инфицированных хозяев, садовые почвопокровные растения, сорняки и отдельные части растений являются резервуарами инокулята для *P. syringae* [71]. Бактерии разносятся ветром, дождем, насекомыми, зараженными почками и подвоями из питомников [72-73].

С патогенной инфекцией *P. syringae* связано множество симптомов. Среди наиболее часто наблюдаемых - увядание цветков, отмершие спящие почки, некротические пятна на листьях, обесцвеченные и / или почерневшие жилки листьев и черешки, пятна и пузыри на плодах, отмирание верхушек побегов и язвы на стебле [72]. Симптоматика, однако, может варьироваться в зависимости от хозяина, штамма *P. syringae*, и условий окружающей среды. Например, у древесных растений инфекция ткани и образование язв могут в конечном итоге опоясать и убить ветви, что приводит к потере плодоносящей поверхности и даже гибели дерева [65,72]. Даже если дерево не погибнет, последствия вспышек болезни могут продолжаться в течение нескольких лет из-за времени, необходимого зараженным деревьям для замены утраченной поверхности [65].

Повторяющиеся вспышки патогенов *P. syringae* по всему миру стимулировали разработку новых стратегий по сдерживанию этого патогена, который в настоящее время считается пандемией, оказывающей серьезное воздействие на сельскохозяйственную отрасль. Текущий контроль фитопатогенов *P. syringae* состоит в основном из химического и биологического контроля, но варианты биологического контроля и применение различных стратегий борьбы одновременно также признаны важными в контексте глобальных усилий по борьбе с болезнью [75]. В случае химических средств борьбы используются соединения меди (такие как бордоская смесь и гидроксид меди), антибиотики (стрептомицин и другие), применение которых показало различную степень успеха [76]. Основной проблемой перечисленных выше веществ является быстрое развитие

устойчивости бактерий, что ограничивает их применение по крайней мере на пару десятилетий.



Основные симптомы, связанные с инфекцией *Pseudomonas syringae*. (A) хлоротические ореолы на листьях томатов, (B) экссудат на ветке вишни, (C) увядающие цветы и листья на киви, (D) язвы с экссудатом на ветке киви, (E) листья киви с некротическими пятнами, окруженными хлоротическим ореолом, (F) некротические пятна на листьях и ветке увядание вегетативных верхушек у саженцев эвкалипта [74]

Многие питомники чередуют опрыскивания медью и стрептомицином или комбинируют их, чтобы уменьшить накопление устойчивых штаммов и избежать фитотоксичности меди [75], но этого оказалось недостаточно из-за сохранения штаммов бактерий с множественной устойчивостью [77-78]. Распространенность бактерий, устойчивых к агрохимикатам, вызывает опасения из-за накопления этих соединений в окружающей среде, фитотоксичности и нехватки новых антибиотиков при разработке лекарственных препаратов, наряду с растущим спросом на органические продукты или продукты, не содержащие агрохимикатов. Эти проблемы способствовали появлению новых стратегий борьбы с фитопатогенными бактериями [79]. В нескольких исследованиях предложено разработать устойчивый и экологичный метод контроля или профилактики патогенных бактерий *P. syringae*, уделяя основное внимание биологическому контролю.

Согласно Эйленбергу и др., (2001) [80], биологический контроль определяется как «использование живых организмов (включая вирусы) для подавления плотности популяции или воздействия конкретного организма-вредителя, делая его менее многочисленным или менее вредным, чем это было бы». В сельском хозяйстве биологический контроль в основном заключается в нанесении непатогенных микроорганизмов на листовые или корневые ткани растений, что приводит к подавлению заболевания [81]. В связи с этим был разработан ряд средств биоконтроля как бактерий, так и грибов, а также коммерчески доступны несколько антагонистов для фитопатогенов *P. syringae*. Например, в случае с *P. syringae* pv. *tomato* (*Pst*) коммерчески доступны продукты, основанные на использовании штаммов бактерий *Bacillus spp.* и *Brevibacillus* (baciforte® [82], Nacillus pro® [83] и serenade® max [84]). Однако эффективность этих биопрепаратов ограничена из-за их несовместимости с антибиотиками и средствами на основе меди. В этом плане бактериофаги, вирусы бактерий, вызывают повышенный интерес из-за их преимуществ перед другими методами борьбы, в том числе теми,

которые считаются экологически чистыми. Бактерициды на основе бактериофагов могут быть адаптированы для воздействия на конкретные болезнетворные бактерии [66,85], такие как бактериальная язва, вызываемая *P. syringae*. В нескольких исследованиях сообщалось о выделении и характеристике фагов против *P. syringae*, демонстрирующих их бактерицидные свойства и потенциал в качестве агентов биоконтроля [85-91].

#### *Идентификация и классификация Pseudomonas syringae*

Бактерии вида *Pseudomonas syringae* впервые были зарегистрированы в 1902 году как патогенный вид сирени. С тех пор *P. syringae* был признан частью филогенетического комплекса (видовой комплекс *P. syringae*, Pssc) повсеместных микроорганизмов, обитающих в различных субстратах, за пределами сельскохозяйственных культур, представляющих экономический интерес [92]. Еще несколько лет назад комплекс включал штаммы с несколькими патогенами таксономически близкородственных видов *P. cichorii* [93], *P. viridiflava* [94], *P. caricapapayae* [95], *P. amygdali* [96], *P. meliae* [97], *P. savastanoi* [98], *P. ficuserectae* [98], *P. avellanae* [99], *P. cannabina* [99], *P. tremae* [100], *P. congelans* [101], *P. asturiensis* [102], *P. cerasi* [103], *P. caspiana* [104] и официально не признанный *P. coronafaciens* [105]. Исторически идентификация и классификация этих штаммов основывались на фенотипических характеристиках, таких как экология, физиология и патогенность, что приводило к усилению таксономической путаницы из-за подвидовых названий патогенов. Благодаря ДНК–ДНК гибридизации и мультилокусному анализу последовательностей установлено, что генотипические характеристики этих штаммов позволяют проводить более детальную классификацию на основе филогенетики [106]. В настоящее время у вида *P. syringae* установлено 62 патовара с учетом их патогенных особенностей [107]. С другой стороны, 13 филогенетических групп были определены в Pssc методом мультилокусного типирования (MLST) четырех генов: *cts* (кодирующий

цитратсинтазу), *gapA* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу А), *rpoD* (фактор РНК-полимеразы sigma70) и *gyrB* (гираза В) [108]. На основе сравнения 139 геномов Gomila et al. (2017) проанализировали таксономию PSSC и выделили 19 филогеномных видов, распределенных в шести филогеномных ветвях [106]. Таким образом, PSSC включает 11 признанных видов: *P. amygdali* (группа, обозначенная более поздними синонимами *P. ficuserectae*, *P. meliae* и *P. savastanoi*), *P. asturiensis*, *P. avellanae*, *P. cannabina*, *P. caricaparayae*, *P. caspiana*, *P. cerasi*, *P. cichorii*, *P. congelans*, *P. syringae*, *P. viridiflava*, наряду с поддерживаемыми новыми видами *P. coronafaciens* и представителями, по меньшей мере, 7 предполагаемых новых видов. Хотя Gomila et al. (2017) включили 27 штаммов *P. syringae*, отнесенных к 15 различным патогенам (*aceris*, *actinidiae*, *aptata*, *alisalensis*, *avellanae*, *coriandricola*, *coryli*, *helianthi*, *japonica*, *panici*, *pisi*, *syringae*, *tagetis*, *tomato*, *theae*), результаты показали, что штаммы определенного патогена могут быть объединены в один филогеномный вид, могут быть объединены со штаммами других видов в один филогеномный вид или могут быть связаны с разными филогеномными видами. В исследовании подчеркивается необходимость реклассификации неправильно классифицированных штаммов и установления правильной таксономии для PSSC, которая может быть принята научным сообществом. Эти выводы подтверждаются Morris et al. , которые предполагают, что названия патогенов не соответствуют основной биологии *P. syringae* и вводят в заблуждение. Для идентификации штаммов Pssc Guilbaud et al. разработали надежный метод на основе ПЦР, названный *Pseudomonas syringae*-специфическая полимеразная цепная реакция (Psy-PCR), который можно использовать непосредственно с чистыми культурами. С помощью метода предложенного Berge et al. [108] было идентифицировано 13 филогрупп с 97% точностью и чувствительностью. Выполнить классификацию на уровне филогрупп, кажется достаточной для точного прогнозирования филогенетической принадлежности, и потенциальные неопределенности можно устранить



путем сравнения дополнительных генов. Всегда демонстрируется соответствие между филогруппами Berge et al. e и филогеномными видами, предложенными Gomila et al. [106]. Таким образом, в то время как геномные инструменты предоставляют огромное количество информации, которая позволяет нам углубленно исследовать молекулярные характеристики различных изолятов Pss с точки зрения филогенетической классификации, данных, полученных путем сравнения одного или нескольких генов, достаточно в качестве отправной точки для классификации изолятов Pss.

#### *Pseudomonas syringae*: угроза мировому сельскому хозяйству

Вспышки болезней, вызванные новыми изолятами *P. syringae*, продолжают угрожать мировому растениеводству. Некоторые патогенные микроорганизмы *P. syringae* выделяются из-за их периодического появления в нескольких регионах мира. Например, по состоянию на 2023 год *P. syringae* наблюдался на пяти континентах [109], с недавними вспышками в Китае, Танзании, Италии, Сербии, Испании, США, Иране, Турции, Австралии, Болгарии, Литве, Нидерландах и Великобритании, поражающими различные сельскохозяйственные культуры и наносящими значительный экономический ущерб [110-111]. Бактериальная язва черешни, абрикоса, сливы, персика и урюка, вызываемая *P. syringae* pv *syringae* и *P. syringae* pv *morsprunorum*, вызывает озабоченность и наносит экономический ущерб во всем мире. Для вишневой отрасли бактериальная язва является ежегодной проблемой, особенно разрушительной в молодых садах, где она может привести к гибели до 75% деревьев [65, 112-113]. Среди других вызывающих беспокойство заболеваний, вызываемых патогеном *P. syringae* pv *syringae*, - бластома и черная яма, поражающие цитрусовые роши, такие как апельсиновые (*Citrus sinensis*) и мандариновые (*Citrus reticulata*). Это заболевание встречалось в нескольких регионах, со вспышкой в Черногории весной 2013 и 2014 годов [114]. Вызываемый *P. syringae* апикальный некроз манго (*Mangifera indica*), одной из самых значительных плодовых культур в мире, был отмечен вспышкой в 2010-2014 годах в районах выращивания

манго на Сицилии (южная Италия) [115-116]. *P. syringae* pv *actinidiae* (Psa), с 2008 года, вызывает серьезные эпидемии киви в районах выращивания в Азии, Европе, Океании и Южной Америке, что делает всю отрасль производства киви уязвимой к этой болезни. В результате вспышек Psa многие страны с развитой промышленностью по выращиванию киви, такие как Новая Зеландия, Италия, Франция, Испания, Португалия, Турция, Чили, Франция, Швейцария, Япония, Китай и Южная Корея, понесли серьезные экономические потери [117-121]. В случае Новой Зеландии потери урожая, вызванные этим заболеванием, в 2012 году оценивались в 21%. Заболевание, вызываемое Psa, в то время считалось пандемией, и Psa была включена в список карантина растений A2 Европейской и Средиземноморской организацией по защите растений [122]. Еще одним примером является изолят *P. syringae* pv. *aesculin*, который вызывает язву конских каштанов, поражающую сотни тысяч деревьев по всей Северо-Западной Европе. Обследование деревьев конского каштана по всей Великобритании, проведенное в 2007 году, показало, что более 70% обследованных деревьев имели симптомы язвы [123]. У однолетних растений урожайность может снижаться из-за снижения фотосинтетической способности зараженной листвы, дефолиации, прерывания цветения и поражения плодов, тем самым снижая их рыночную стоимость. Например, *P. syringae* pv. *tomato*, возбудитель бактериальной пятнистости на растениях томата, является одним из самых разрушительных патогенов этой культуры. Вспышка может привести к потере до 25% проростков [124], являясь одним из наиболее разрушительных аспектов заболевания, а возникающие в результате повреждения на поверхности плодов делают их непригодными для продажи [125-126].

*P. syringae* pv. *maculicola* (Psm) становится важным патогеном для производителей крестоцветных культур во всем мире. С тех пор, как Psm был описан в 1911 году, многие сообщали о его разнообразных фенотипических, генетических и патогенных характеристиках [127]. В случае бахчевых

культур недавняя вспышка, вызванная *P. syringae* pv. *lachrymans*, была зарегистрирована в Бангладеш. На растениях появились симптомы пятнистости листьев, и заболевание привело к сокращению производства огурцов на 37-40% и сделало плоды непригодными для продажи [128]. Болезнь также может поражать некоторые другие культурные и дикорастущие бахчевые культуры по всему миру, такие как арбузы и тыквенные культуры, как сообщалось во время недавней вспышки от юга Джорджии до юга Флориды (США) [129]. Другим проблемным патогеном является *P. syringae* pv. *pisi* (Ppi) (карантинный вредитель EPPO A2), вызывающий бактериальную гибель гороха (*Pisum sativum*), потенциально разрушительное заболевание, которое было описано во всех странах-производителях гороха. Этот патоген особенно агрессивен на полях с озимыми посевами в нескольких европейских странах и Австралии, что приводит к серьезному снижению урожайности (до 71%) и снижению качества семян [130]. В целом, у однолетних растений заболеваемость, вызываемая *P. syringae* может варьировать в пределах 50-100%, а ущерб, выраженный в потерях урожая, может превышать 25%. Список вызывающих беспокойство заболеваний, вызываемых патоварами *P. syringae*, очень обширен, что позволяет считать эти бактерии одними из наиболее изученных в сельскохозяйственном производстве. Таким образом, механизмы их вирулентности, жизненный цикл и симптомы были подробно описаны [131-132]. Несмотря на это, в настоящее время *P. syringae* фитопатогенные микроорганизмы в целом продолжают поражать почти все экономически важные виды сельскохозяйственных культур по всему миру.

## 1.2 Применение бактериофагов для деконтаминации продуктов растительного происхождения

Улучшение пищевых привычек потребителей и поиск новых продуктов, способствующих укреплению здоровья, вызвали повышенный интерес к пище с минимальной обработкой (MPF) [133-135]. Эти продукты консервируются с использованием нетермических технологий, что приводит к ограниченным изменениям текстуры пищи [136-137]. Этот подход также позволяет сохранить биологически активные пищевые ингредиенты, такие как витамины, провитамины и фитонутриенты, которые естественным образом содержатся в больших количествах в пищевых продуктах растительного происхождения с минимальной обработкой [138-141].

Технология минимальной обработки использует несколько физических методов консервирования пищевых продуктов, которые включают высокое гидростатическое давление, облучение, применение ультразвука и импульсного электрического поля. Также используются технологии упаковки в сушеном виде и cook-chill, защитные пищевые покрытия, упаковка и хранение в модифицированной атмосфере [142-144]. Использование вышеуказанных методов консервирования пищевых продуктов может негативно повлиять либо на вкусовые характеристики, либо на пищевую ценность продуктов. Более того, не все методы эффективно снижают микробную обсемененность консервируемых продуктов. Высокое гидростатическое давление оказывает бактерицидное действие на вегетативные клетки, но споры не инактивируются полностью без использования дополнительных методов (например, термической обработки), что может быть важно в случае заражения соков [145-148] и других пищевых продуктов бактериями рода *Bacillus* [149-150]. Ионизирующее излучение эффективно снижает рост патогенных бактерий, но даже небольшие дозы (0,5 кГр) снижают качество листовых овощей. Хотя Управление по контролю за продуктами питания и лекарствами (FDA) рекомендует высокие дозы радиации для эффективного сохранения салата айсберг, это может привести к

утечке клеточного сока [151]. Ультразвук также нельзя использовать для сохранения минимально обработанных пищевых продуктов растительного происхождения, поскольку, подобно высоким дозам ионизирующего излучения, оно вызывает утечку содержимого клеток в окружающую среду. Выделение клеточных соков в упаковку является хорошей средой для роста и развития сапрофитных микроорганизмов, естественным образом присутствующих на поверхности продуктов [152-153]. Интенсификация роста сапрофитных бактерий снижает качество продукции (изменение вкуса, запаха, цвета) [152-154]. Импульсное электрическое поле позволяет инактивировать микроорганизмы и одновременно защищает желаемые сенсорные и физические характеристики пищевых продуктов. Однако такое воздействие индуцирует конформационные изменения в белках и, таким образом, может влиять на активность нативных ферментов [155-157]. Качество продуктов растительного происхождения зависит от атмосферы хранения [158]. Исследования подтверждают положительное влияние упаковки в контролируемой атмосфере (СА) на сенсорные качества пищевых продуктов, особенно в контексте появления пятен и потемнения краев листьев [159-160]. Таким образом, использование физических методов обработки в пищевой промышленности не всегда гарантирует получение пищевого продукта с удовлетворительными сенсорными свойствами и микробиологическими параметрами.

Биологическим методам, которые могут быть альтернативой физико-химическим методам, уделяется все больше внимания в связи с сохранением минимально обработанных пищевых продуктов с самым высоким микробиологическим риском, таких как свежавыжатые соки, проростки или салатные смеси [135,161-163]. Концепция использования защитных микроорганизмов уже хорошо известна [161-162], но другим подходом могло бы быть использование естественных «врагов» бактерий, т.е. бактериофагов. Использование бактериофагов может оправдать ожидания потребителей в отношении пищевых продуктов с минимальной обработкой

за счет увеличения срока их хранения без ущерба для их физических свойств [163]. Бактериофаги являются высокоспецифичными бактериальными вирусами и обычно могут поражать только один вид или штамм бактерий и, в отличие от антибиотиков, не разрушают естественную симменсальную микробиоту пищеварительного тракта человека. Исследования показывают, что фаги нечувствительны ко многим стрессовым условиям при обработке пищевых продуктов (стабильность в широком диапазоне температур и рН) [164]. Их стабильность рН повышается при более низких температурах. Фаги используются в трех секторах пищевой промышленности: первичном производстве (в основном используются для предотвращения образования биопленок на поверхности оборудования), биодезинфекции (в основном используются на производственных предприятиях) и биоконсервации (используются для продления срока годности продуктов путем борьбы с патогенными бактериями, портящими пищу).

Успех использования фагов в пищевых системах зависит от преодоления нескольких барьеров. Количество фагов представляет собой важный фактор, влияющий на эффективность применения. Как правило, чем выше концентрация фага, тем значительнее сокращение числа бактерий-мишеней [165]. Еще одним препятствием является используемая пищевая матрица, которая может повлиять на эффективность фага. Жидкие матрицы обеспечивают лучшую диффузию фагов; однако свойства матрицы остаются определяющими. В исследовании Zinno et al. [166] нанесение фагов на жидкие яйца приводило к снижению активности и титра фагов, что объяснялось высокой вязкостью матрицы, которая ограничивала диффузию и равномерное распределение частиц фага. Выбор метода нанесения фагов также может быть сложной задачей. Фаговые коктейли использовались в по принципу погружения и распыления. Фаги вводили в пищу в виде микрокапсул, которые защищали их от неблагоприятных факторов окружающей среды, таких как экстремальные значения рН и температуры [165]. Существует множество проблем, связанных с использованием фагов,

но их можно преодолеть путем тщательного отбора фагов, входящих в состав биопрепаратов. Одной из проблем является появление устойчивых к фагам бактерий; поэтому производство коктейлей, состоящих из нескольких различных фагов с максимально широким спектром антибактериальной активности, представляется актуальным подходом [161]. Фаги могут нести гены вирулентности или гены устойчивости к антибиотикам, но этих проблем можно избежать, используя исключительно литические фаги. Существуют также опасения по поводу иммуногенности и цитотоксичности фагов, которые могут возникнуть в результате лизиса бактерий-мишеней [165].

Препараты на основе бактериофагов все еще не одобрены в Европейском союзе для использования при непосредственном контакте с пищевыми продуктами [167-169]. Многие страны, не входящие в ЕС, включая США, Бразилию, Нидерланды, Израиль, Канаду, Швейцарию, Австралию и Новую Зеландию, разрешили использование фагов в пищевой промышленности, и многочисленные компании предлагают коммерческие фаговые биопрепараты, предназначенные для пищевой промышленности [169-170]. Многие препараты были одобрены FDA, такие как PhageGuard (например, Listex™ P100, Secure Shield E1, EcoShield™, ListShield™, ShigaShield™, SalmoFresh™) и Министерством сельского хозяйства США (USDA; PhageGuard, Finalyse®) [170-172]. Десяти коммерческим фаговым препаратам был присвоен предварительный статус GRAS [173]. В 2016 году EFSA опубликовало отчет, в котором безопасность и результативность в борьбе с *Listeria monocytogenes* для Listex™ P100 от Microcos Food Safety были подтверждены [174], основываясь на результатах многочисленных научных исследований [175-178].

Следует подчеркнуть, что коммерческие препараты бактериофагов в основном нацелены на патогенные бактерии, которые не преобладают в пищевой среде. В случае пищевых продуктов с минимальной обработкой существенной проблемой является снижение качества продукта из-за

развития сопутствующей сапрофитной микробиоты, которая вызывает, среди прочего, порчу продуктов в результате гниения, ухудшение цвета и вкуса. Сапрофитные бактерии, обнаруживаемые в пищевых продуктах, также могут быть резервуаром устойчивости к антибиотикам, которая может передаваться последующим поколениям бактерий, включая те, которые составляют микробиоту пищеварительного тракта потребителей [179-182].

### **1.2.1 Положительные и отрицательные последствия использования фагов в плодоовощной промышленности**

Фаги могут играть важную роль в сельском хозяйстве и пищевой промышленности, и их роль не ограничивается уничтожением патогенных штаммов бактерий. Преимуществом их использования является увеличение числа генетически хорошо охарактеризованных фагов. Это позволяет исследователям идентифицировать и элиминировать гены, ответственные за лизогенность или вирулентность бактерий (Frampton et al.). Было показано, что фаги могут быть ответственны за высокую вирулентность бактериальных фитопатогенов, поскольку они могут быть вовлечены в горизонтальный перенос генов, вызывающий обмен факторами вирулентности между бактериальными геномами. С другой стороны, текущие изменения в бактериальной систематике подразумевают необходимость выделения и полной характеристики новых фагов, высокоспецифичных к бактериальным патогенным штаммам (Jones et al.). Однако высокая специфичность является важным свойством, которое может быть использовано в полевых условиях. Фаги обычно не лизируют ризобии, бактерии, участвующие в биологической фиксации азота, неразрывно связанные с семейством *Fabaceae*, представленными важными сельскохозяйственными видами, такими как соя, фасоль, горох, нут и люцерна. Более того, в экспериментах Basita et al., специфическое фаговое покрытие семян соевых бобов увеличило клубенькование у штамма *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 с 48 до 82%. Также было исследовано вредное воздействие фагов на



ризобактерии. Свирцев с соавторами описывали эксперимент, в ходе которого большие популяции фагов, внесенных в ризосферу растений клевера, уменьшили популяцию *Rhizobium trifolii*.

Без всякого сомнения, способность фагов проникать в ткани растений и лизировать некоторые фитопатогены требует дальнейших исследований. Например, внеклеточные полисахариды, продуцируемые *R. solanacearum*, могут ингибировать адсорбцию фагов клетками-хозяевами на растениях (Fujiwara et al.). Неблагоприятные условия окружающей среды в ризо- и филлосфере (засуха, колебания pH, температура, ультрафиолетовое облучение) представляют собой проблему для исследователей, работающих над оптимальными составами фагов и изучающих взаимодействия фаг-хозяин (Kocharunchitt et al.). Хотя было обнаружено, что некоторые фаги могут быть чрезвычайно устойчивы к сухой среде и могут выживать при экстремальных температурах, по-видимому, такие условия делают заражение фагами и репликацию невозможными. Кроме того, фаги могут прочно связываться с частицами глины посредством электростатических взаимодействий, что приводит к потере их литической активности (Ye et al.). Все еще распространенная химическая обработка в полевых и тепличных условиях (например, ионная медь, поверхностно-активные вещества, хелаторы железа) дополнительно влияют на фаги (Bae et al.).

Возникновение устойчивости к фагам в бактериальных популяциях - еще одна проблема, которая может ограничить применение фагов в пищевой промышленности. Использование комбинации фагов не всегда снижало вероятность появления устойчивых мутантов (Ye et al.). Следует отметить, что фаги способны разрушать бактериальные клетки без проведения литического цикла в процессе, называемом лизис извне. Это свойство, вероятно, отвечает за снижение количества бактерий в свежих продуктах при температуре охлаждения, при которой литический цикл затруднен. Появление большого количества частиц фага, адсорбирующихся на клетке-хозяине, приводит к повреждению клеточной стенки. Количество

бактерий-хозяев не менее важно при обработке фагами. В природе при неблагоприятных условиях плотность бактериальной популяции, необходимая для репликации фага на высоком уровне, может быть слишком низкой.

С другой стороны, существуют опасения по поводу безопасности попадания фагов в окружающую среду, поскольку они могут нарушить естественное соотношение между фагами и бактериями и круговорот питательных веществ (Svircev et al.; Meaden and Koskella). Кроме того, некоторые фаги могут поражать штаммы, используемые для стимулирования роста растений и подавления грибковых заболеваний растений, (Keel et al.).

В некоторых источниках указывается, что профаги могут оказывать благоприятное воздействие на патогенные бактерии. Они способны ингибировать другие фаги в процессе, называемом «исключение суперинфекции», например, блокируя адсорбцию на поверхности клеток. Профаги также могут повышать приспособленность бактериальных клеток, поскольку они участвуют в контроле за споруляцией, индуцируя выработку экзополисахаридов и долгосрочную выживаемость *Bacillus* в почве. Новые методы индукции фагов *in situ* показали, что около 80% почвенных штаммов были лизогенными.

#### *Другие возможности применения фагов в овощеводстве*

Важность фагов во фруктовой и овощной промышленности не ограничивается биоконтролем патогенных штаммов бактерий. Фаги присутствуют в процессе ферментации овощей, хотя их роль остается неопределенной (Yoon et al.; Lu et al.). Однако также была описана возможная негативная роль фагов в промышленном брожении пищевых продуктов. Körpen et al. пришли к выводу, что фаги могут быть ответственны за воздействие на бактериальные закваски при ферментации овощей, такие как молочнокислые бактерии *Weissella cibaria*, участвующие в ферментации кимчи, традиционного корейского блюда, приготовленного из китайской капусты и редиса.

Фаги также могут быть вовлечены в обнаружение фитопатогенов и загрязнения пищевых продуктов фекалиями. Sheffield et al. описали рекомбинантные фаги, используемые в качестве диагностических инструментов для обнаружения фитопатогенов. Endley et al. исследовали применение колифагов в качестве индикатора фекального загрязнения свежей моркови и зелени. По-видимому, это важная особенность пищевой промышленности, поскольку большинство болезней пищевого происхождения можно предотвратить. Авторы отмечают, что фаги более полезны в качестве индикаторов фекального загрязнения, чем бактериальные индикаторы, поскольку они могут быть устойчивы к широко используемым мерам дезинфекции воды. Позже эта особенность была подтверждена Вебер-Дабровской с соавторами. Бактерия *E. coli* также была более восприимчива к дезинфицирующим средствам, таким как хлор, перекись водорода, пероксиуксусная кислота и бикарбонат натрия, чем колифаг MS2, во время экспериментов, проведенных на листовых овощах для салата (Allwood et al.).

Как упоминалось выше, важность фагов во фруктовой и овощной промышленности не ограничивается только биоконтролем патогенных штаммов бактерий. Как положительная, так и отрицательная роль фагов в окружающей среде дает яркую картину их важности для человечества. Популяризация этих знаний не менее важна, чем сосредоточение внимания на исследованиях, и должна осуществляться для более широкого общественного признания.

### 1.3 Основные стратегии борьбы с пищевыми патогенами

В последние несколько лет пищевая промышленность развивалась быстрыми темпами, что делает обязательным обеспечение безопасности пищевых продуктов и их качества. Одной из основных проблем в пищевой цепочке является присутствие бактерий, которые вызывают огромные экономические потери (например, порчу пищевых продуктов и проблемы со здоровьем потребителей) [183-185]. Эту серьезную проблему необходимо контролировать и избегать ее возникновения, чтобы обеспечить безопасность и качество пищевых продуктов и гарантировать срок годности продуктов. Переработка пищевых продуктов является одним из важнейших этапов пищевой цепочки, где несколько этапов, таких как хранение, при нежелательной температуре, перекрестное загрязнение и неочищенное оборудование, являются причиной нежелательного бактериального загрязнения, приводящего к изменению текстуры, вкуса, цвета и питательной ценности продуктов [186-187]. Что касается бактериального заражения, то, в то время как бактерии, вызывающие порчу, вызывают ухудшение качества пищевых продуктов из-за своей метаболической активности, что приводит к развитию неприятного запаха, вкуса и внешнего вида пищевых продуктов [188], патогенные бактерии потенциально могут вызывать заболевания при попадании в организм через различные источники, такие как пища и вода [189].

Критерии микробиологической безопасности пищевых продуктов, а именно критерии, указанные в Постановлении Комиссии (ЕС) № 2073/2005, очень строгие и в большинстве случаев не допускают присутствия наиболее распространенных патогенных бактерий, связанных с заболеваниями пищевого происхождения (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Cryptosporidium* spp. и *Salmonella* spp.) [190-191]. Тем не менее, даже при наличии этого регламента и сертифицированных эталонных аналитических методов, таких как ISO 11290 и ISO 6579, которые существуют для обеспечения безопасности пищевых

продуктов, каждый год происходят серьезные вспышки, связанные с бактериальными загрязнителями в пищевых продуктах, которые приводят к бесчисленным заболеваниям пищевого происхождения, в результате чего миллионы людей заболевают и тысячи умирают [192].

Наиболее распространенными примерами пищевых продуктов, вызывающих вспышки, являются яйца, птица, сырое молоко и другие продукты животного происхождения, грибы, свежие фрукты и овощи. В 2021 году основные вспышки в Европе, о которых сообщило Европейское управление по безопасности пищевых продуктов (EFSA), были наиболее частыми в комбинированных пищевых продуктах и продуктах с большим количеством ингредиентов, а затем в мясных продуктах. *Salmonella* была наиболее распространенным патогеном, вовлеченным во вспышки, а *L. monocytogenes* была самой смертоносной [193]. В 2022 году в США произошедшие вспышки были в основном связаны с *Salmonella*, *E. coli* и *L. monocytogenes*, которые присутствовали в широком ассортименте пищевых продуктов, от молочных до овощей, фруктов, композитов и замороженных продуктов [194]. Болезни пищевого происхождения в 2018 году обошлись, по оценкам, в 11,2 миллиарда долларов в Великобритании и 17,6 миллиарда долларов в США, а в 2019 году - в 1,64 миллиарда долларов в Австралии [195-197].

Чтобы избежать и контролировать загрязнение пищевых продуктов из-за присутствия микроорганизмов, пищевая промышленность предлагает несколько стратегий, таких как: отбор проб для обеспечения безопасности пищевых продуктов; обработка пищевых продуктов (например, замораживание, приготовление, консерванты) для контроля роста микробов; хранение пищевых продуктов при надлежащей температуре, чтобы избежать роста микробов; очистка и санитарная обработка поверхностей, контактирующих с пищевыми продуктами, во избежание перекрестного загрязнения и распространения инфекции.

Методы борьбы с микробами делятся на физические (например, нагревание, высушивание), химические (например, дезинфицирующие средства), механические (например, фильтрация) и биологические (например, микробные культуры), хотя биологический контроль в пищевой промышленности используется в меньшей степени. Например, химические методы, такие как дезинфекция, позволяют уничтожать или удалять патогенные микроорганизмы (за исключением эндоспор) или проводить антисептику с использованием химикатов и наносить их на поверхности. Физические методы, такие как стерилизация, обеспечивают полное удаление микроорганизмов; пастеризация с использованием умеренного нагрева ниже 100 ° С устраняет микробы, вызывающие порчу; облучение источниками, такими как УФ, уменьшает количество микроорганизмов; а обработка под высоким давлением инактивирует патогенные микроорганизмы пищевого происхождения. Эти методы позволяют уничтожать или ингибировать патогенные микроорганизмы и могут использоваться при переработке пищевых продуктов или после упаковки [198-200]. Однако использование этих традиционных методов противомикробной терапии может негативно повлиять на органолептические свойства пищевых продуктов и убить полезные бактерии, которые присутствуют и необходимы в продуктах питания (например, сыре, йогурте) [201].

Среди биологических методов природные противомикробные препараты, такие как фаги, являются ценным альтернативным средством для обеззараживания из-за высокой специфичности фагов к бактериям-мишеням [202]. Использование фагов в качестве противомикробных препаратов привлекает внимание в связи с ростом антибиотикоустойчивых бактерий в последние годы, представляющих серьезную угрозу общественному здравоохранению, и фаги стали эффективным решением, способным в перспективе остановить этот кризис [203]. Еще одним важным фактом, повысившим интерес к натуральным противомикробным препаратам,

являются реальные потребители, которые отдали предпочтение натуральным, органическим продуктам и продуктам с «чистой этикеткой», и которые больше обеспокоены использованием синтетических консервантов и требуют более натуральных решений для сохранения пищевых продуктов [204-205]. Существует широкий спектр природных противомикробных препаратов, от эфирных масел до бактериоцинов, пептидов и фагов, которые могут использоваться в качестве альтернативы химическим противомикробным препаратам [206-208].

Противомикробные препараты, такие как фаги, могут использоваться в свободной форме; однако этот подход имеет некоторые недостатки, такие как быстрая потеря активности, неконтролируемое высвобождение и различное поведение в зависимости от конечной цели применения (например, твердые пищевые продукты, жидкие пищевые продукты, упаковка пищевых продуктов). Эти проблемы связаны с типом используемой матрицы, основными характеристиками противомикробных препаратов и различными взаимодействиями между матрицей, противомикробными препаратами и пищевыми продуктами [209-210]. Системы доставки являются одной из стратегий решения этих проблем за счет использования структур на биологической основе, таких как пленки, многослойные пленки, эмульсии, частицы, волокна и гидрогели, которые в соответствии с желаемой функциональностью (например, рецептура пищевых продуктов, поверхность пищевых продуктов, упаковка пищевых продуктов, поверхности оборудования) могут быть использованы для создания инновационных систем с противомикробными препаратами для пищевых продуктов [211-212].

За последние несколько лет несколько авторов оценили потенциал использования фагов в биоконтроле бактериальных фитопатогенов, а также в биоконтроле патогенов пищевого происхождения человека. Эти исследования имеют долгую историю, и в обоих случаях многие области, связанные с применением фагов, все еще нуждаются в интенсивном

изучении. Взаимодействия между фагами и их бактериальными хозяевами все еще остаются в значительной степени неизученными. Различия в результатах нескольких исследований четко подтверждают этот факт. Большая доступность молекулярных методов и снижение затрат на исследования определенно облегчают проведение дальнейших исследований. Наряду с улучшением понимания биологии, морфологии, ультраструктуры и генетики фагов, попытки оценить фаговые препараты становятся все более частыми.

### ***1.3.1 Патогены пищевого происхождения***

С течением времени инфекции пищевого происхождения участились и в настоящее время представляют серьезную угрозу общественному здравоохранению во всем мире, в результате чего ежегодно заболевает более 600 миллионов человек [213-214]. Патогены пищевого происхождения ответственны за тысячи инфекций и представляют опасность как для здоровья людей, так и для экономики в целом из-за их негативного воздействия на здоровье [215]. Широкий спектр патогенных микроорганизмов способен заражать пищевые продукты на протяжении процессов производства и переработки, а также на протяжении процессов хранения и транспортировки перед употреблением [215-207]. Широко распространенные кишечные расстройства, вызываемые патогенами пищевого происхождения человека, по оценкам, приводят к значительным финансовым потерям и проблемам для здоровья [218-221]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), почти 30% случаев смертности пищевого происхождения приходится на детей в возрасте до пяти лет. Микроорганизмы пищевого происхождения могут вызывать симптомы от легкой до тяжелой степени, такие как диарея, или приводящие к инвалидности заболевания, такие как менингит [222-224]. Это связано с тем, что у маленьких детей более слабая иммунная система и они более уязвимы к



болезням пищевого происхождения. Они также могут чаще засовывать руки в рот или есть пищу, зараженную бактериями, вирусами или паразитами.

По оценкам, каждый четвертый человек ежегодно заболевает инфекциями пищевого происхождения, несмотря на то, что пища проверяется на различных этапах производства и реализации [225-227]. Ряд исследований показали, что на частоту и значимость различных заболеваний пищевого происхождения влияют взаимоотношения между патогенными организмами, людьми, продуктами питания и окружающей средой [228-231]. В результате болезней пищевого происхождения опасные микроорганизмы, такие как бактерии, вирусы, грибки и паразиты, вовлечены в развитие этих заболеваний, хотя бактерии, по-видимому, являются наиболее распространенной причиной и способны приобретать различные характеристики и функции [215, 232-234]. Ряд бактерий, таких как *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus pumilus* и *Bacillus cereus*, могут продуцировать споры и обладают чрезвычайной термостойкостью. Многие из этих микроорганизмов способны вырабатывать токсины, устойчивые к высокой температуре [215]. В большинстве случаев они являются мезофильными, что означает, что идеальная температура их выращивания составляет от 20 до 45°C. Кроме того, некоторые патогены, такие как *Listeria monocytogenes* и *Yersinia enterocolitica*, вызывающие заболевания пищевого происхождения, могут сохраняться в холодильнике или при температуре ниже 10 ° C и вызывать пищевые инфекции [235].

Среди многочисленных заболеваний, вызываемых микроорганизмами пищевого происхождения, включая ботулизм, дизентерию, брюшной тиф, гастроэнтерит, листериоз и ряд других, ботулизм является одним из наиболее распространенных [236]. Заболевание пищевого происхождения может быть вызвано любым организмом или его токсинами, но чаще всего оно диагностируется как острый гастроэнтерит и может сопровождаться и другими симптомами [237]. Существует широкий диапазон тяжести и продолжительности симптомов, связанных с этим

заболеванием. Существуют веские причины серьезно относиться к патогенам пищевого происхождения из-за их зоонозных особенностей и способности вырабатывать токсины, которые вызывают тяжелое течение болезни или даже смерть. Многие страны и регионы, подвержены воздействию патогенов пищевого происхождения в результате увеличения числа случайных инфекций, продолжающихся проблем, а также массовых и ужасающих вспышек, вызванных бактериями, присутствующими в продуктах питания [238]. Большое количество энтеропатогенных бактерий ответственны за большое количество диарейных заболеваний, которые ежегодно возникают среди детей в возрасте до 3 лет, что приводит к, более чем, 3 миллионам смертей во всем мире [239].

Многие исследования и отчеты [240-244] показали, что кишечные спазмы, диарея, рвота, беспокойство, озноб и затрудненное дыхание являются распространенными признаками болезней пищевого происхождения. Эти признаки вызываются либо микроорганизмами, либо действием их эндотоксинов [245-246], либо экзотоксинами, вырабатываемыми микроорганизмами [247-248]. Концепция отравления пищевого происхождения основана на том факте, что оно относится к заболеваниям, вызываемым токсинами, вырабатываемыми бактериями в пище [249-250]. Многие из этих инфекций уже связаны с определенными пищевыми продуктами, такими как курица, полуфабрикаты, рыба, молочные продукты, фрукты и овощи [251-253].

Очевидно, что крайне важно идентифицировать патогены пищевого происхождения, чтобы не допустить причинения ими значительного вреда здоровью человека и окружающей среде [254-263].

Современное производство продуктов питания предпринимает попытки снизить заболеваемость людей за счет уменьшения количества микроорганизмов в продуктах питания [264]. Поддерживая надлежащий мониторинг, вовремя выявляя инфекции, регистрируя происхождение и своевременно удаляя загрязняющие вещества на производстве, риски,

создаваемые животными, находящимися на открытом выпасе, окружающей средой и сельскохозяйственными товарами, попадающими в пищевую цепочку в будущем, могут быть значительно снижены [265-266]. В соответствии с ВОЗ, программы предварительного обеспечения являются важнейшими мерами безопасности пищевых продуктов до и во время внедрения анализа опасности и критической контрольной точки (НАССР) [267]. В мировом сообществе по безопасности пищевых продуктов НАССР признана важным инструментом сокращения числа заболеваний пищевого происхождения [268]. Одним из наиболее важных шагов по профилактике инфекций пищевого происхождения является обеспечение логичной работы производственной линии, соблюдения высоких стандартов чистоты и как можно более частого использования биоцидов и дезинфицирующих средств [269]. Однако методы, используемые в настоящее время для уничтожения патогенов пищевого происхождения, во многом противоречивы. Изменение органолептических характеристик продукта может быть достигнуто приготовлением на пару, нагреванием или использованием ультрафиолетового излучения [270]. Существуют также определенные ограничения, касающиеся применения традиционных методов антибиотикотерапии, особенно тех, которые относятся к фруктам, овощам, а также готовым к употреблению продуктам питания, которые могут препятствовать использованию обычных антибиотиков [270]. Регулярное использование биоцидов способствует развитию резистентности микроорганизмов, что представляет серьезную проблему для общественного здравоохранения [271].

Широкое злоупотребление антибиотиками и, как следствие, рост патогенных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью привели к изменению парадигмы в нашем понимании антибиотиков. Клинические неудачи, связанные с антибактериальной терапией, могут быть объяснены задержками в выявлении патогенов пищевого происхождения [272]. Следовательно, раннее выявление патогенов

важно для предотвращения появления бактерий с множественной лекарственной устойчивостью. Все чаще высказывается озабоченность по поводу распространенности устойчивости к антибиотикам среди бактериальных инфекций пищевого происхождения и ее влияния на результаты лечения [273]. Поскольку бактерии приобрели широкую лекарственную устойчивость, для борьбы с этой проблемой требуются альтернативные меры инфекционного контроля, такие как пребиотики, пробиотики и бактериофаги [274]. Хорошим примером является использование бактериофагов в качестве агентов биоконтроля для борьбы с патогенами пищевого происхождения и предотвращения загрязнения поверхностей, контактирующих с пищевыми продуктами [275]. Бактериофаг - это вирус, который заражает и размножается в бактериальных клетках только при наличии хозяина [276-277]. Благодаря своим уникальным свойствам фаги считаются многообещающими инструментами в борьбе с бактериальными заболеваниями, а также со многими другими заболеваниями, и в результате получили широкое применение в современной медицине [270]. Фаготерапия - лишь одно из многих применений фагов в промышленности. Для обеспечения безопасности потребителя каждое антибактериальное средство, используемое в пищевой промышленности, должно быть тщательно подобрано, прежде чем его можно будет использовать [270]. Есть несколько преимуществ использования фагов перед химическими антибактериальными средствами, включая тот факт, что они не способствуют ухудшению качества продукта; что их можно наносить на широкий спектр субстратов; и что с устойчивостью к вирусам можно бороться гораздо проще по сравнению с обычно используемыми антибактериальными средствами [278-280]. Было обнаружено, что фаги естественным образом могут содержаться в пище, что указывает на то, что это один из способов их взаимодействия с людьми [281]. Помимо того, что фаговые методы являются экономически эффективными и простыми в

использовании, они зарекомендовали себя как альтернатива традиционным антибактериальным методам лечения.

### *Бактериофагу Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* - опасный патоген, вызывающий вспышки пищевого происхождения после употребления многих овощных продуктов, включая красный болгарский перец, салат ромэн, проростки, ломтики яблок, а также обработанных и смешанных фруктов и овощей (Leverentz *et al*). *Listeria monocytogenes* могут выживать при низких температурах в охлажденных пищевых продуктах, что представляет серьезную проблему в пищевой промышленности. Листерия может быть опасна, особенно для беременных женщин, новорожденных, пожилых людей и людей с нарушениями иммунитета. Заболевание характеризуется высоким уровнем смертности, составляющим от 20 до 30% (Choffnes *et al*).

Leverentz *et al* протестировали профилактическое использование фагового коктейля на кусочках дыни. Смесь из шести фагов *Listeria*, получившая название LMP-102, была предоставлена компанией Intralytix, Inc. Суспензию фага разбавляли до различных концентраций и распыляли на ломтики. Наиболее эффективным было применение фагового коктейля до бактериального заражения ( $5 \times 10^5$  КОЕ мл<sup>-1</sup>) или одновременно с ним. Обработка фагами после заражения привела к увеличению роста бактерий к пятому дню хранения при температуре 10 °С. Титры фагов более  $10^6$  ед. мл<sup>-1</sup> успешно подавляли рост бактерий, а концентрация  $10^8$  ед. мл<sup>-1</sup> снижала количество бактериальных клеток до необнаруживаемого уровня. Это указывает на то, что использование более высоких доз фага и фаговая обработка сразу после бактериального заражения является наиболее подходящим способом борьбы с ростом патогенов. Те же авторы также исследовали эффективность фаговой обработки в зависимости от различного количества бактериальных клеток, загрязняющих свежесрезанные продукты (чем меньше количество бактерий, тем сильнее подавление популяции листерий фагами на ломтиках дыни после 5 и 7 дней хранения

при 10 °C). Комбинированная обработка коктейлем из фагов и низином (бактериоцин, вырабатываемый молочнокислыми бактериями) была более эффективной, чем однократная обработка дыни, а также ломтиков яблок, аналогичная результатам комбинированной обработки с левулиновой кислотой, описанной Magnon et al. Авторы рекомендуют использовать мутанты фагов- устойчивые к низкому pH, или высокие дозы фага для свежесрезанных продуктов с низким pH.

Oliveira et al. оценили практическое применение препарата Listex P100 в продуктах из дыни, груш и яблок (соках и ломтиках). Срезы фруктов инокулировали Listex P100 путем пипетирования суспензии фага ( $10^8$  ед.<sup>-1</sup> мл) в лунки сердцевин в срезах после бактериальной инокуляции. Образцы соков смешивали с суспензией фагов и бактерий для получения конечной концентрации  $10^5$  КОЕ-мл<sup>-1</sup> и  $10^8$  КОЕ-мл<sup>-1</sup>. Самый низкий уровень pH был у продуктов яблок (3,70-3,76), за ними следуют груши (4,61-4,91). Самое высокое значение pH было отмечено у ломтиков дыни (5,77-5,92). В соответствии с этими результатами, наибольшее статистически значимое снижение *L. monocytogenes* наблюдалось на ломтиках дыни в течение всех 8 дней хранения. Титр фага в ломтиках яблок снизился ниже обнаруживаемого уровня. Аналогичный эффект наблюдался во фруктовых соках. Однако применение фагов было более эффективным в соках, поскольку жидкая среда может способствовать лучшему контакту бактерий с клетками-хозяевами. Эти результаты вместе с результатами, относящимися к чувствительным к pH сальмонеллам, были получены ранее Leverentz et al. подтверждают идею о том, что стойкость фагов в различных условиях окружающей среды является важным параметром при рассмотрении фагов в качестве агентов биоконтроля. Слишком низкий уровень pH может быть ограничивающим фактором для фаговой обработки, особенно тех, которые хранятся при более высоких температурах (выше 5 °C).

Было проведено несколько исследований эффективности фагов в уничтожении патогенов пищевого происхождения [282-285]. Фаги могут

эффективно использоваться против основных микроорганизмов, связанных с пищевыми продуктами, и могут повлиять на методы микробиологического контроля, используемые в производстве пищевых продуктов. Существует настоятельная необходимость в поиске эффективных альтернатив, которые позволят пищевой промышленности соответствовать высоким стандартам безопасности пищевых продуктов при производстве продуктов питания, поскольку поддержание безопасности пищевых продуктов является глобальной задачей.

## **1.4 Бактериофаги как ингибиторы образования биопленок**

Растущее распространение устойчивости патогенных бактерий к антибиотикам создает серьезные угрозы для клинической, медицинской и пищевой промышленности [286]. Образование бактериальных биопленок считается одним из механизмов устойчивости к антибиотикам, который повышает вирулентность и делает их более патогенными [287]. Согласно статистике, до 80% рецидивирующих микробных и хронических инфекций у людей связаны с образованием бактериальной биопленки [288]. Морфология и физиологические функции бактерий в биопленках полностью отличаются от морфологии и физиологических функций планктонных бактерий, находящихся в свободной суспензии, что позволяет бактериям внутри биопленок быть в 1000 раз более устойчивыми к традиционным методам лечения антибиотиками и иммунным реакциям хозяина по сравнению с планктонными клетками [289-290]. В связи с коэволюционной адаптацией известных патогенов человека к хозяевам и злоупотреблением антибиотиками в современной клинической медицине внутренняя устойчивость бактерий к антибиотикам во всем мире возросла до уровня высокого риска [291]. Следовательно, срочно необходимы эффективные альтернативные терапевтические стратегии для предотвращения образования патогенных бактериальных биопленок и борьбы с инфекциями.

Бактериальные вирусы, встречаются практически в любой среде, и могут сохраняться в виде внутриклеточной паразитарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) или использовать бактерии в качестве хозяина для репликации и вызывать бактериальный лизис [292]. Исследования фагов как терапевтических средств начались в 1910-х годах, но были в значительной степени забыты в эпоху антибиотиков во время Второй мировой войны [297]. В последние несколько лет возродился интерес к фаготерапии на фоне появления устойчивых к антибиотикам бактерий и глобальной нехватки новых разработанных антибиотиков [294]. Недавние исследования показали, что фаготерапия может быть одним



из наиболее перспективных альтернативных вариантов лечения устойчивых к антибиотикам патогенов [295].

#### ***1.4.1 Бактериальные биопленки***

##### *Состав и архитектура бактериальной биопленки*

Бактериальные биопленки относятся к чрезвычайно сложным и высокоструктурированным сообществам, инкапсулированным во внеклеточные полимерные вещества собственного производства (EPSS), которые содержат клетки в различных физиологических и морфологических состояниях, необратимо прикрепленные к биотическим или абиотическим поверхностям [296-297]. В большинстве бактериальных биопленок микроорганизмы составляют всего 10% от сухого веса, тогда как доля EPSs составляет более 90% [298]. ЭПС с гидратированной, студенистой трехмерной структурой состоит из множества внеклеточных полисахаридов, белков, липидов, нуклеиновых кислот (внеклеточная ДНК и РНК) и других биомолекул, обеспечивающих механическую стабильность биопленок, защищающих прилипшие бактерии от воздействия окружающей среды и ограничивающих проникновение антибиотиков [299]. Хотя точный состав и структура бактериальных биопленок сильно различаются в зависимости от вида бактерий, доступности питательных веществ и условий окружающей среды, внеклеточные полисахариды и белки являются общими структурными компонентами, лежащими в основе различных бактериальных биопленок [300]. Доказано, что внеклеточные полисахариды обладают сильным потенциалом связывания металлов и комплексообразования, которые могут взаимодействовать с двухвалентными катионами, такими как кальций и магний, а также цинк, способствуя адгезии микробов к поверхностям и когезии биопленок, а также обеспечивая фундаментальную структурную функцию для целостности матрицы [301-302]. Белки были идентифицированы как незаменимый основной компонент биопленок, несомненно выполняющий важные функции в поддержании биопленки

[303]. Кроме того, белки также могут участвовать в деградации биопленок в качестве внеклеточных ферментов, способствуя высвобождению бактерий, резидентных в биопленках, и образованию новых биопленок [304]. Липиды составляют относительно небольшую долю в биопленках, но они способны связывать белки с образованием липопротеинов, которые играют решающую роль в поддержании клеточной целостности, возникновении инфекций и стимулировании образования биопленок [305]. Кроме того, присутствие липидов обеспечивает важное свойство ЭПС, а именно гидрофобность. Внеклеточная ДНК (eDNA) является недавно обнаруженным компонентом, практически повсеместно встречающимся в биопленках, и участвует в созревании биопленок посредством взаимодействия с другими молекулярными компонентами, такими как экзополисахариды, липопротеины и амилоидогенные пептиды, помогая организовывать и стабилизировать структуры биопленок [306,307]. Предположительно, в биопленках представлены и другие клеточные компоненты, и необходимы дальнейшие исследования их роли в биопленке.

#### *Формирование бактериальной биопленки*

Формирование бактериальной биопленки представляет собой сложный и динамичный процесс, включающий различные физические, химические и биологические процессы. Обычно считается, что жизненный цикл биопленки может быть установлен в основном через следующие стадии: обратимое прикрепление, необратимое прикрепление, образование микроколонии, созревание и рассеивание.

Формирование биопленки начинается с короткого и последовательного процесса адгезионного отделения бактериальных клеток, который называется обратимым прикреплением [308]. На данном этапе бактерии могут распознавать биотические или абиотические поверхности и прикрепляться к ним с помощью различных внеклеточных органелл и белков, и это взаимодействие в первую очередь опосредуется межфазными электростатическими силами и силами ван-дер-Ваальса, позволяя бактериям

продолжать формировать биопленки или возвращаться в планктонное состояние с поверхности контакта [309]. Вторым процессом является ключевым моментом перехода клеток бактерий из свободного состояния в биопленку, который называется необратимым прикреплением. При увеличении числа адгезивных бактерий эти прикрепленные клетки начинают синтезировать молекулы адгезина, а именно EPS, которые могут способствовать адгезии между клетками и поверхностями [310]. После необратимого прикрепления бактериальные клетки начинают делиться и превращаться в небольшие скопления микроорганизмов, называемые микроколониями [311]. На этом этапе активируются и экспрессируются некоторые гены, связанные с образованием биопленок, и секретируется большое количество ЭПС для адгезии, когезии и защиты кластеров микроколоний [312-313]. Затем наступает процесс созревания. При непрерывном размножении микроколоний и усиленной секреции ЭПС эти небольшие скопления клеток в конечном итоге развиваются и созревают в трехмерную структуру биопленок. В ходе этого процесса колонии в биопленке могут транспортировать такие вещества, как вода, питательные вещества и метаболиты, проявляя большую устойчивость к механическим воздействиям и неблагоприятным факторам окружающей среды. Рассеивание биопленки является заключительной стадией формирования биопленки, которая представляет собой активный процесс, запускаемый ухудшением условий внутри биопленок [314]. Этот процесс имеет решающее значение для размножения и самообновления сообщества, позволяя бактериальным клеткам активно высвобождаться из зрелых биопленок, и эти высвобожденные планктонные клетки могут диффундировать в основную жидкость, порождая новые биопленки в новых местах [315]. Таким образом, диспергирование является не только последней стадией развития биопленки, но и началом другого жизненного цикла биопленки.

## 1.4.2 Взаимодействие между фагами и бактериальными биопленками

### Фаги активные в отношении бактериальных биопленок

Фаги являются одними из наиболее распространенных биологических объектов на нашей планете, которые были открыты в начале двадцатого века Феликсом д'Эрелем [316]. Они обитают повсюду и обычно встречаются в местах, изобилующих бактериальными сообществами, таких как сточные воды, грязь и кишечник животных. Фаги высокоспецифичны и нетоксичны, что означает, что они поражают исключительно бактерии и не представляют угрозы для клеток высших организмов [317]. Кроме того, когда они действуют на целевые патогены, они не повреждают нормальную микрофлору хозяина [318].

Фаги крошечные и состоят из белков и нуклеиновых кислот. Считается, что белки представляют собой оболочки из нуклеиновых кислот, которые определяют морфологию фагов. Кроме того, генетический материал фагов состоит из двухцепочечной или одноцепочечной ДНК или РНК [319]. Исследования показали, что фаги могут быть хвостатыми, многогранными, нитевидными или полиморфными. Сообщалось, что около 96% фагов представляют собой двухцепочечные ДНК-геномы с хвостовой морфологией, принадлежащие к отряду *Caudovirales* [320]. На основе структуры хвоста отряд *Caudovirales* можно разделить на три семейства: *Myoviridae* (фаги с сократительным хвостом, такие как T4-подобные фаги), *Siphoviridae* (фаги с несокращающимся длинным хвостом, такие как T5-подобные фаги) и *Podoviridae* (фаги с коротким хвостом, такие как T7-подобно фагам) [321-333].

Заражение и репликация фагов могут осуществляться в рамках литического или лизогенного жизненного цикла. На основе этого цикла наблюдаются два типа фагов: литические фаги и лизогенные фаги. Литические фаги, также известные как вирулентные фаги, обычно проходят пять стадий литического жизненного цикла: прикрепление,

инъекция, репликация и трансляция, сборка и лизис. После заражения бактериями-хозяевами литические фаги могут за короткое время реплицировать свои геномы и достигать самопролиферации, что приводит к быстрому разрушению клеток и лизису клеток-хозяев [334]. Лизогенные фаги, также известные как умеренные фаги, относятся к тем фагам, которые стабильно интегрируются в геном хозяина в качестве профагов во время лизогенного процесса [335-336]. При воздействии окружающей среды профаги могут выходить из лизогенного состояния и становиться литическими.

Будучи естественными врагами бактерий, фаги могут уничтожать биопленки с помощью нескольких механизмов и воздействовать на бактериальные клетки-мишени. Одним из наиболее важных механизмов является то, что фаги могут кодировать различные ферменты, такие как деполимеразы и лизины, для разрушения защитного барьера при инфекциях бактерий-хозяев. Например, Pires et al. определили, что в 143 фагах имеется 160 предполагаемых деполимераз, которые можно разделить на два основных класса: гидролазы, включая сиалидазу, левозидазу, ксилозидазу, глюканидазу, рамнозидазу, а также пептидазу; и лиазы, включая гиалуронидазу, альгинатлиазу, а также пектин / пектинлиазу [337]. Эти деполимеразы в основном обнаруживаются в виде свободных ферментов или хвостовых белков фагов и могут специфически распознавать, связывать и переваривать ЭПС бактериальных клеток-хозяев, нарушая структуру биопленки, облегчая их проникновение к клеткам во внутренних слоях биопленки [338-339]. Лизины, также называемые эндолизинами, представляют собой общее название высокоразвитых пептидогликангидролаз, продуцируемых ближе к концу литического цикла фаговой инфекции, которые вызывают лизис клеток и гибель путем расщепления пептидогликанов в клеточной стенке бактерий и позволяют высвободить зрелых потомков фагов из клеток-хозяев [340].

### *Бактериальные биопленки устойчивые к фаговым инфекциям*

Недавние исследования продемонстрировали, что бактерии развили различные защитные механизмы для борьбы с фаговой инвазией, пролиферацией и диффузией, чтобы выжить при фаговых инфекциях, включая поверхностную модификацию, системы исключения суперинфекции (Sie), рестрикционной модификации (R-M) и кластеризованные системы коротких палиндромных повторов (CRISPR)-Cas с регулярным чередованием и абортной инфекции (Abi) [341-342].

В качестве первой линии бактериальной защиты модификация поверхности считается одним из самых безопасных методов борьбы с фаговыми частицами, который может предотвратить первоначальную адсорбцию фагов клеткой. Предыдущее исследование показало, что гликозилированный пилин IV типа (T4P) звеньями O-антигена или полимерами D-арабинофуранозы может блокировать репликацию фага и защищать *P. aeruginosa* от определенных pilus-специфичных фагов, предполагая, что гликозилирование пилина может представлять собой механизм борьбы с фагами, использующими pili в качестве рецептора [343]. Система исключения суперинфекции - это явление, при котором ранее существовавшая вирусная инфекция предотвращает вторичную вирусную инфекцию [344]. Бактериальные клетки, инфицированные фагами, могут быстро вырабатывать устойчивость к дальнейшим инфекциям теми же или близкородственными фагами, тем самым предотвращая проникновение фаговой ДНК [345]. Кроме того, в недавнем исследовании сообщалось о новой системе защиты, системе защитных островков, связанной с рестрикционной модификацией (DISARM), для ограничения поступающей ДНК фага [346].

Системы рестрикционной модификации и кластеризованные системы коротких палиндромных повторов представляют собой два повсеместных и чрезвычайно разнообразных защитных механизма бактерий от фагов, которые распознают и расщепляют фаговую ДНК в определенных участках,

защищая свои собственные геномы [347]. R-M-системы, в основном состоящие из эндонуклеазы рестрикции и метилтрансферазы, являются одним из инструментов, обычно используемых бактериями для предотвращения фаговой инфекции, которые обеспечивают врожденный иммунитет против чужеродной ДНК (такой как ДНК фагов), которой не хватает соответствующей модификации в определенных сайтах распознавания, и защищают геном хозяина от активности эндонуклеазы рестрикции посредством метилирования тех же сайтов распознавания [348-349]. Было продемонстрировано, что способность бактерий защищаться от фагов может быть усилена за счет увеличения концентрации эндонуклеазы рестрикции в клетках [350]. Системы CRISPR-Cas представляют собой адаптивные системы иммунной защиты бактерий, которые защищают прокариот от вторжения фагов и плазмид путем распознавания и расщепления чужеродных последовательностей нуклеиновых кислот, определяемых последовательностями спейсеров CRISPR РНК, поддерживая целостность их геномов [351-352].

Системы Abi считаются последним барьером, который заставляет бактериальные клетки совершать самоубийство после фаговых инфекций, тем самым уменьшая распространение фагов и защищая общую популяцию бактерий [353-354]. Более конкретно, системы Abi препятствуют развитию фага и предотвращают его пролиферацию после адсорбции фага и инъекции ДНК хозяину, что приводит к высвобождению очень небольшого количества (если таковые имеются) инфекционных вирионов, сопровождающихся гибелью инфицированных фагом бактериальных клеток [355].

### ***1.4.3 Стратегии профилактики и борьбы с биопленками патогенных бактерий***

Рост числа бактериальных инфекций, устойчивых к антибиотикам, является одной из основных глобальных проблем общественного здравоохранения из-за злоупотребления антибиотиками в современной

медицине. Согласно статистике, более 700 000 человек во всем мире ежегодно умирают от резистентности к антибиотикам [356]. Если не будут приняты эффективные меры, к 2050 году устойчивость к антибиотикам, по прогнозам, станет причиной 10 миллионов смертей ежегодно, что превысит число смертей от рака и приведет к общим потерям мировой экономики в размере 100 триллионов долларов США [357]. Таким образом, существует настоятельная необходимость в разработке перспективных альтернатив противомикробной терапии для снижения потенциальных инфекционных болезней. Текущие исследования показали, что фаготерапия демонстрирует большую эффективность при лечении устойчивых к антибиотикам бактериальных инфекций, вызванных биопленками.

#### *Терапия с помощью фаговых коктейлей*

Из-за модификации рецепторов на поверхности бактериальных клеток, выработки модифицированных ферментов рестрикции, которые разрушают ДНК фага, и спонтанных мутаций возникновение устойчивости к фагам может ослабить монофаговую терапию [358]. Фаговые коктейли, смесь фагов, могут быть использованы для эффективного преодоления ограничений монофаговой терапии и улучшения результатов лечения. Недавние исследования продемонстрировали, что терапия фаговым коктейлем более эффективна в предотвращении и уничтожении патогенных бактериальных биопленок, чем отдельные фаги. Например, в исследовании было обнаружено, что коктейль из трех фагов сильно ингибировал образование биопленки и вызывал эрадикацию биопленки у 2-3 штаммов *P. mirabilis* в большей степени по сравнению с одиночными фагами без какого-либо ингибирования активности друг друга [359]. Более того, было замечено, что при совместном использовании всех четырех фагов в форме коктейля лизировалось 86,7% клинических изолятов по сравнению с лизисом в диапазоне 50-66% отдельными фагами, что указывало на то, что терапия коктейлем фагов имеет более широкий литический спектр, чем монофаги [360]. В дополнение к расширению диапазона хозяев и усилению литической



способности фагов, фаговые коктейли также могут быть использованы для значительного снижения генерации и частоты мутаций устойчивых к фагам штаммов и максимального повышения эффективности терапии бактериальных инфекций [361-362]. Хотя терапия фаговым коктейлем более эффективна, чем монотерапия, они также несут большой риск ненужного переноса генов и межфаговой интерференции [363]. Следовательно, в идеале фаги должны быть специально подобраны для их целевых хозяев образующих бактериальные биопленки.

#### *Комбинация фага с антибиотиками*

Фаготерапия сама по себе доказала свою эффективность для клинического применения. Недавние исследования показали, что практика сочетания фагов с антибиотиками может быть одним из возможных терапевтических подходов к повышению эффективности лечения. Например, комбинация фагов с ципрофлоксацином продемонстрировала огромный синергический эффект, уничтожив  $> 6 \log$  КОЕ/г фибриновых сгустков в течение 6 ч и успешно вылечив 64% ( $n = 7/11$ ) крыс с экспериментальным эндокардитом, вызванным *P. aeruginosa* [363]. Было высказано предположение, что фаги могут вызывать значительное снижение жизнеспособности биопленок при использовании в сочетании с противомикробными препаратами по сравнению с каждым лечением в отдельности, проявляя синергизм [364]. Более того, предыдущее исследование выявило, что эффект лечения биопленочной инфекции может быть значительно усилен, если биопленка подвергается воздействию фагов перед приемом антибиотиков [365]. Аналогичным образом, фаговая обработка, предшествующая воздействию ванкомицина или цефазолина, более эффективна в устранении бактерий *S. aureus* которые, ассоциированы с биопленками, и могут быть связаны с быстрой репликацией фагов при обработке ими биопленок перед приемом антибиотиков, что приводит к высокой плотности фагов и разрушению матрицы биопленки, так что последующее добавление антибиотиков может разрушать бактерии более

эффективно [366]. Следовательно, необходимо рассмотреть порядок терапевтического введения фага в сочетании с антибиотиками для устранения биопленок, и точный механизм взаимодействия между ними еще предстоит дополнительно выяснить.

#### *Генно-инженерные фаги*

В целом, в фаготерапии используются фаги из различных сред, в то время как применение фаготерапии может быть ограничено из-за узкого диапазона хозяев фагов и низкой специфичности [367]. В настоящее время стало популярным исследование того, что фаги могут быть модифицированы методами генной инженерии для расширения диапазона их хозяев, изменения специфичности и усиления деградации биопленок для гораздо более широкого применения [368]. Например, Li et al. получен рекомбинантный T4-подобный фаг под названием WGqlae путем изменения области, определяющей рецепторную специфичность гена 37, что наделяет этот сконструированный фаг способностью лизировать четырех дополнительных хозяев по сравнению с его родительскими фагами WG01 и QL01. Кроме того, фаг WGqlae оказывал значительное ингибирующее действие на *E. coli* в планктонном состоянии и формах биопленок [369]. В предыдущей статье авторы использовали сконструированные T7-фаги, экспрессирующие диспергин В, для одновременной атаки на бактериальные клетки и облегчения разрушения ЭПС биопленки *E. coli*, что привело к значительному сокращению количества клеток бактериальной биопленки на 4,5 порядка и существенной скорости удаления биопленки примерно на 99,997% [370]. Более того, исследование показало, что эффективность фагов может быть значительно повышена за счет превращения лизогенного цикла в литический за счет единичных мутаций, и его результат продемонстрировал, что несколько генно-инженерных фагов, разработанных, могут успешно лечить инфекцию вызываемую диссеминированной лекарственно-устойчивой *M. abscessus* [371]. Кроме того, Борн и его коллеги получили генно-инженерный фаг Y2::dpoL1-C путем введения гена деполимеразы

droL1 в геном фага Y2, что значительно усилило уничтожение бактерий и оказало положительное влияние на диспергирование биопленки *E. amylovora* [372]. Эти исследования показали, что генно-инженерные фаги могут быть многообещающими кандидатами для будущих применений фаготерапии против патогенных биопленок.

#### *Ферменты, полученные из фагов*

Природные и инженерные фаги - это наборы инструментов, предлагающие обширный арсенал ферментов, переносимых фагами, таких как деполимеразы, лизины, ДНКазы и липазы, которые демонстрируют очевидный ингибирующий эффект на образование патогенной бактериальной биопленки и высокий лизирующий эффект на существующие биопленки [373]. Таким образом, эти ферменты, полученные из фагов, можно рассматривать как перспективные антибактериальные средства для профилактики и уничтожения инфекционных бактериальных биопленок.

Некоторые фаги обладают генами, кодирующими внеклеточные полисахариддеполимеразы, которые могут специфически разрушать полисахаридные компоненты ЭПС биопленок и облегчать доступ фагов к более глубоким слоям структуры [374]. Например, в недавнем исследовании сообщалось, что новая деполимераза фагового происхождения Dro10 может специфически связывать и разлагать липополисахарид *E. coli* O157 с умеренной устойчивостью к окружающей среде и проявлять высокую активность для предотвращения образования биопленок на различных абиотических поверхностях [375]. Более того, было доказано, что О-специфическая полисахаридлиаза из хвостовика фага LKA1, которая связывает и расщепляет ЛПС В-диапазона, эффективно снижает вирулентность *P. aeruginosa* в модели инфекции *in vivo* *G. mellonella* и эффективно способствует деградации биопленки, не влияя на активность ципрофлоксацина и гентамицина [376]. В другом исследовании Ву и его коллеги сообщили о потенциальном применении новой деполимеразы Dep42, кодируемой фагом SH-KP152226, для борьбы с инфекциями, вызываемыми

капсулой K47 *K. pneumoniae*, и их результаты также показали синергический эффект совместного применения Dep42 и полимиксина против биопленок с множественной лекарственной устойчивостью *K. pneumoniae* [377]. Кроме того, исследование продемонстрировало, что рекомбинантная деполимераза P510dep, предполагаемый белок хвостовых волокон с активностью, разлагающей полисахариды, полученный из фага P510 *пиондовируса*, обладает высокой разрушающей активностью в отношении устойчивых к карбапенему биопленок *K. pneumoniae* [378]. Таким образом, деполимеразы могут быть использованы в качестве вспомогательных средств при уничтожении биопленок.

Помимо деполимераз, лизины, полученные из фагов, успешно использовались для профилактики и удаления, бактериальных биопленок, которые могут применяться *in vivo* в качестве терапевтических средств. В недавнем исследовании лизин стафилококка P128 продемонстрировал значительное снижение до 95,5% в отношении биопленки метициллинчувствительного *S. aureus* и метициллинрезистентного *S. aureus*, выделенного из пазух носа пациентов с хроническим риносинуситом, при применении *in vitro* в концентрации  $\geq 12,5$  мкг / мл [379]. Более того, было обнаружено, что активность LysAB2 в отношении множественной лекарственной устойчивости *A. baumannii* увеличилась до 100 000 раз благодаря двухэтапному механизму уничтожения бактерий, обеспечиваемому его мембранопроницающим пептидом CeA на C-конце, а сконструированный LysAB2 также продемонстрировал значительную активность в отношении *A. baumannii* и выдающуюся способность нарушать образование биопленки [380]. В другом исследовании сообщалось, что PM-477, генно-инженерный эндолизин, полученный из фагов, который генерируется путем перетасовки доменов, обладает потенциалом полностью уничтожать бактерии *Gardnerella* и физически разрушать биопленки, в которых доминируют гарднереллы, не повреждая оставшиеся полезные бактерии у пациенток с бактериальным вагинозом [381]. Кроме того, лизины,

полученные из фагов, могут усиливать внутреннюю убивающую активность в отношении штаммов с множественной лекарственной устойчивостью при использовании в комбинации с другими эндолизинами, антибиотиками или некоторыми соединениями [382]. Синергический эффект эндолизина LysK и поли-N-ацетилглюкозаминдеполимеразы DA7, используемых в комбинации, могут эффективно разрушать биопленки *S. aureus*, и это было подтверждено как на статических, так и на динамических моделях инфекции [383].

Сообщается, что в дополнение к упомянутым выше ферментам несколько других ферментов, кодируемых природными или сконструированными фагами, таких как ДНКазы, ферменты, подавляющие кворум, и липазы, обладают широким спектром антибактериальных эффектов и могут быть лучше использованы в качестве агентов, диспергирующих биопленки. Исследования показали, что ДНК, ассоциированные со стрептококковыми профагами, как факторы вирулентности, играют важную роль в разрушении внеклеточных ловушек, продуцируемых иммунными клетками, такими как нейтрофилы, и могут быть способны устранять биопленки, образованные другими конкурирующими бактериями-комменсалами, или контролировать образование их собственной биопленки [384]. В другой статье Pei et al. сконструирован инженерный фаг T7, который экспрессировал ферменты, подавляющие кворум, для эффективного разложения ацилгомосеринлактонов (AHL) различных бактерий и значительно ингибирует образование биопленок смешанных видов, состоящих из *P. aeruginosa* и *E. coli*, препятствуя распознаванию кворума [385]. Липазы распространены повсеместно по своей природе, они способны рассеивать биопленки путем разрушения липидных связей, участвующих во взаимодействиях клетка–клетка или клетка–поверхность. Действительно, липаза является редким доменом, присутствующим в структурных компонентах фагов. Например, Lipase\_GDSL\_3, домен деполимеразы фага с

активностью гидролиза липидов, был обнаружен у восьми фагов *Cellulophaga* и одного фага *Pseudomonas*.

#### *Комбинация применения бактериофагов с другими стратегиями*

Помимо упомянутых выше терапевтических вариантов, сообщалось также о нескольких других альтернативных стратегиях профилактики бактериальных биопленок и борьбы с ними на основе фагов. Текущее исследование потенциального синергического эффекта фаговой и химической дезинфекции против условно-патогенного микроорганизма *P. aeruginosa* показало, что фаги могут эффективно комбинироваться с химическими дезинфицирующими средствами, такими как гипохлорит натрия и бензалкония хлорид, для улучшения удаления влажных биопленок на поверхностях и одновременно предотвращать регенерацию сухих биопленок [386]. Кроме того, он и соавторы предложили новую интегрированную стратегию AIE-phage, в рамках которой фаговый PAP снабжен активными для фотодинамической инактивации (PDI) AIEgens (люминогены со свойством индуцированной агрегацией эмиссии) для образования нового типа антимикробного биоконъюгата, TVP-PAP, с почти 100% эффективностью уничтожения *P. aeruginosa* с множественной лекарственной устойчивостью [387].

С развитием зеленых и биологических нанотехнологий наноматериалы становятся более безопасной альтернативой антибиотикам для уничтожения патогенных биопленок [388]. Недавние исследования показали, что фаги могут быть иммобилизованы на нанокомпозитах путем физической адсорбции, основанной на электростатической адгезии, или химического связывания [389]. Было замечено, что конъюгация поливалентных фагов *Podoviridae* и кластеров магнитных коллоидных наночастиц удаляла  $98,3 \pm 1,4\%$  площади покрытия двухвидовой биопленки и  $92,2 \pm 3,1\%$  площади покрытия многовидовой биопленки после 6 часов обработки [390], тогда как этот подход к связыванию может расширить применение фагов в борьбе с микробами за счет усиления их прямой доставки к относительно

недоступному внутреннему слою биопленки с помощью низкоэнергетических магнитных полей [391]. Кроме того, исследование показало, что  $\text{nano-TiO}_2$  может способствовать прикреплению фага gM13 к поверхности клеток *E. coli* TG1, что способствует проникновению инфекции фага gM13 [392].

Бактериальные биопленки являются убежищем для бактерий, которые значительно повышают устойчивость бактерий к антибиотикам и способность ускользать от иммунной системы хозяина, приводя к стойким и рецидивирующим инфекциям. Из-за сложности их состава и механизмов устойчивости к антибиотикам сообщества биопленок обладают высокой стойкостью, и их трудно полностью уничтожить традиционными методами лечения антибиотиками. Увеличение дозы антибиотиков не только неэффективно для уничтожения биопленок, но и приводит к неожиданным токсическим и побочным эффектам.

Опубликованные патенты показали, что терапия на основе фагов, включая фаговые коктейли, фаговые и / или производные от фагов продукты в сочетании с другими противомикробными агентами, а также сконструированные фаги, эффективны в борьбе с биопленками, нацелены на патогены и лечат лекарственно-устойчивые бактериальные инфекции [393-394]. Например, композиции, содержащие эффективное количество лизирующих ферментов, связанных с фагами, и носитель для доставки литических ферментов, могут быть использованы для лечения инфекций верхних дыхательных путей, кожных инфекций, ран, ожогов, вагинальных инфекций, глазных инфекций, кишечных расстройств и стоматологических проблем [395]. Был раскрыт другой литический фермент, полученный из фага, который быстро убивает *S. pneumoniae* и другие бактерии [396]. Кроме того, сконструированные гомогенные популяции фагов и хлоротоксиновые фаги могут быть использованы для лечения и /или визуализации опухолей, таких как опухоли центральной нервной системы [397]. Что касается применения в пищевых продуктах, фаготерапия может применяться против

различных пищевых патогенных бактерий. Например, выделенные фаги можно использовать в различных продуктах питания для людей и домашних животных для лечения или профилактики бактериальных заболеваний, вызванных патогенными *Enterobacteriaceae*, такие как *E. coli* и *Salmonella* [398]. Фактически, FDA признало, что некоторые препараты на основе фагов «обычно считаются безопасными» (GRAS) в качестве пищевых добавок.



## 1.5 Бактериофаги как средства дезинфекции

Хотя, препараты на основе бактериофагов могут быть полезны в качестве самовоспроизводящихся дезинфицирующих средств для обеззараживания или очистки поверхностей. Они особенно эффективны при уничтожении бактерий внутри биопленок, поскольку биопленки часто устойчивы к химическим дезинфицирующим средствам. На сегодняшний день было показано, что для некоторых бактерий, химические дезинфицирующие средства, такие как гипохлорит натрия и бензалкония хлорид, оказывают синергическое действие с некоторыми фагами, усиливая устранение биопленок на загрязненных поверхностях. Аналогичным образом сообщалось о фагах, способных уничтожить биопленки других важных бактериальных патогенов, таких как *S. aureus*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* и другие (Song et al., 2021; Liu et al., 2022).

Часто исследователями рекомендуется использование фагов после сбора урожая овощей или перед упаковкой пищевых продуктов, так существует несколько коммерческих продуктов, таких компаний как Intralytix, Micros Food Safety, FINK TEC GmbH, Passport Food Safety Solutions и Phagelux, которые получили одобрение Управления по контролю за продуктами питания и лекарствами (FDA). Это связано с угрозой, которую несут такие продукты, как салаты, зелень, овощи, фрукты и грибы, которые представляют собой среду, подходящую для роста бактерий. Эти продукты были причинами нескольких вспышек, пищевых инфекций вызванных *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* и *Yersinia enterocolitica*.

Однако, наиболее часто бактериофаги рекомендуют применять при дезинфекции больничных помещений [389].

Внутрибольничные инфекции являются ведущей причиной заболеваемости и смертности в больницах и тесно связаны с устойчивостью к противомикробным препаратам [390-394]. Поверхности в больницах обычно постоянно загрязнены несколькими бактериями, представляющими серьезную угрозу из-за их возможной передачи и заражения пациентов. Эти

микроорганизмы при определенных обстоятельствах могут приводить к развитию внутрибольничных инфекций [395-398]. К таким организмам относятся *S. aureus* и, более конкретно, штаммы, устойчивые к метициллину (MRSA), которые вызывают особую озабоченность из-за трудностей в лечении, а также *E. coli*, которые являются одними из наиболее распространенных причин госпитальных инфекций, из-за развития особенно проблематичных штаммов, обладающих различными формами устойчивости к противомикробным препаратам [399-402]. Уборка больничных поверхностей обычно включает использование нескольких дезинфицирующих средств. Однако существуют проблемы, связанные с применимостью, внедрением и эффективностью доступных в настоящее время дезинфицирующих средств, которые могут сделать эти варианты частично неэффективными, по крайней мере, для некоторых конкретных патогенов [403-405]. Кроме того, теоретическая озабоченность развитием устойчивости к химическим веществам, а также к антибиотикам, наряду с тем фактом, что дезинфицирующие средства уничтожают не только патогенные бактерии, но и те, которые могли бы защищать поверхности от контаминации устойчивыми больничными штаммами, усиливает необходимость определения дополнительных мер по дезинфекции больничных поверхностей [406-407].

Существуют исследования, оценивающие действие фагов против патогенов, которые могут быть выделены с различных поверхностей и оборудования больниц, таких как *E. coli*, *Salmonella*, *MRSA* и *A. baumannii*, и их результаты действительно многообещающие [408-409]. Однако применимость таких средств в условиях стационара в повседневной практике может иметь некоторые оговорки, поскольку экспериментальные условия в исследованиях могут существенно отличаться от условий стационара. В исследованиях фаги использовались против бактерий с очень высокой плотностью, обеспечивая оптимальное взаимодействие фаг/бактерия, при этом взаимодействие опосредовалось нанесением водного раствора,

содержащего фаги, которые наносились на поверхности в течение длительного времени; это условия, которые нелегко выполнить в повседневных условиях больницы [408]. Интересно, однако, что существуют исследования, оценивающие использование фагов в больницах, которые показали многообещающие результаты. Таким образом, в исследовании использовались фаги для дезинфекции отделения интенсивной терапии (ОРИТ) и были специально нацелены на резистентных к карбапенемам *A. baumannii* наряду со стандартными процедурами очистки было существенно снижено количество внутригоспитальных инфекций, вызванных этим микроорганизмом, что означает, что фаговая дезинфекция может иметь практическое применение в борьбе с нозокомиальными инфекциями [410].

В попытке продвигать экологичную дезинфекцию, направленную на уничтожение целевых патогенов на больничных поверхностях оценивали применение фагов в дополнение к экологически чистым моющим средствам (probiotic cleaning hygiene system (PCHS)), содержащим непатогенные пробиотические бактерии рода *Bacillus*, в попытке контролировать микробиом больницы [411-412]. С этой целью добавление фагов, нацеленных на патогенные бактерии, могло бы усилить обеззараживание при этом, добавленные фаги не обладали активностью против непатогенных пробиотических бактерий, содержащихся в моющем средстве. Уже было показано, что эта система очистки пробиотиками эффективна и безопасна для пациентов, приводит к постепенному и стабильному изменению микробиома больничных поверхностей, включая уменьшение количества патогенов с повышенной устойчивостью к противомикробным препаратам, что приводит к значительному снижению процента возникновения внутрибольничных инфекций, использованию противомикробных препаратов и расходов больницы [413-416]. Следовательно, использование фагов в этом контексте может привести к более быстрой очистке и / или уничтожению специфических патогенов, которые колонизировали определенные помещения больницы или палаты, как в случае с патогенами,

преобладающими в отделениях интенсивной терапии [407]. Тесты *in vitro* показали, что при сочетании ПХГ с фагами они сохраняют свою стабильность и активность, что позволяет им воздействовать на бактерии со значительной устойчивостью к противомикробным препаратам, которые часто также устойчивы к дезинфицирующим средствам, что приводит к аддитивному или синергетическому эффекту [417]. Исследование, оценивающее эффект комбинации ПХГ и фагов против *Staphylococcus spp.* в ваннных комнатах, которые являются наиболее сильно загрязненными зонами больниц, показало, что ежедневная санитарная обработка с помощью комбинации препаратов привела к быстрому и значительному снижению уровня *Staphylococcus spp.* на поверхностях, где они применялись, и это было на 97% эффективнее по сравнению с использованием только ПХГ [408].

Примечательно, что фаги могут использоваться не только для дезинфекции больничных поверхностей и медицинского оборудования от свободных бактерий, но также могут быть полезны для дезинфекции от биопленок [418]. Например, исследование эффекта использования фагов и химической дезинфекции против *P. aeruginosa* показало, что фаги можно успешно комбинировать с химическими дезинфицирующими средствами, такими как бензалкония хлорид и гипохлорит натрия, для повышения эффективности увлажнения биопленки и удаления бактериального загрязнения поверхностей, а также снижения вероятности регенерации биопленки [419].

Более того, фаги могли бы также использоваться в медицинских целях, не связанных с работой человека, если бы использовались в биосенсорах, поскольку в этом случае биосенсоры могли бы использовать биозонды и преобразователи для обеспечения своевременного выявления бактериального заражения критически важных точек.

## **1.6 Критические факторы при разработке и применении средств на основе консорциума бактериофагов**

Характеристики коктейльных терапевтических средств связаны с фагами, используемыми в терапии. К ним относятся стабильность фагового вириона, секреция фаговых рецепторов, факторы, препятствующие вирулентности бактерий, и патогенность хозяина, все из них говорят в пользу терапии фаговыми коктейлями. Однако существует кодировка детерминант вирулентности бактерий и склонность к продуцированию бактериальных лизогенов, эти факторы являются минусами фаготерапии [420]. Кроме того, существуют опасения по поводу того, будет ли антибактериальная терапия, применяемая в виде монофагов, а не мультифаговых коктейлей, взаимодействовать с взаимной способностью генерировать новые вирионы при заражении одной и той же бактерии, будет ли резистентность бактерий к отдельным фагам быстро развиваться *in vivo* или *in vitro*, и могут ли бактериальные мутации устойчивости к фагам приводить к подавлению устойчивости бактерий или вирулентности [421-428]. Таким образом, на состав и применение фаговых коктейлей влияют несколько факторов.

### ***1.6.1 Длительное хранение и транспортировка***

Антимикробная эффективность терапевтических средств состоящих из фаговых коктейлей может быть сведена на нет несколькими факторами, влияющими на ход их разработки и применения. Считается, что несколько ключевых факторов значительно снижают эффективность их работы [429-434]. Фаги могут постепенно терять свою активность при длительном хранении в условиях окружающей среды, что требует использования стабилизированных составов и перевода водных фаговых составов в порошкообразную форму. В первую очередь, фаги состоят из генетического материала, заключенного в белковый капсид (богатая белком оболочка фагов, а также их сложность делают их уязвимыми к внешним условиям хранения), который взаимодействует друг с другом посредством

межмолекулярных взаимодействий. Следовательно, интенсивное превращение водного фагового состава в порошкообразную фазу для длительного хранения или транспортировки может быть запрещено, поскольку это отрицательно может влиять на их жизнеспособность. Эффективность стабилизаторов, включая полиэтиленгликоль (ПЭГ) и сахарозу в лиофилизированном фаге, при длительном хранении не подтверждена [435]. Кроме того, ни один из исследованных до сих пор стабилизирующих подходов или составов не представляется универсальным из-за различной восприимчивости конкретных фагов к химическим и физическим факторам, таким как кислотность, ионы солей и температура. Стабильность фагов зависит от внешних факторов. Большинство фагов можно хранить в водной или лиофилизированной форме в течение длительного времени при нейтральных уровнях pH в диапазоне от 6 до 8 [436]. Как правило, титры фагов постепенно снижаются с повышением pH. Например, сообщается, что титр фага *S. aureus* снижается на 2 логарифма в течение 4-6 часов при изменении pH с 6,19 до 5,38. pH ниже 4,5 может препятствовать размножению нескольких фагов. Например, фаг PM2 из семейства *Corticoviridae* полностью теряет свою жизнеспособность через 1 час при pH 5,0 и 37 °C. Фаг T4 из семейства *Myoviridae* нестабилен при pH <5. Фаги могут выживать при высоких температурах (40-90 °C). Кроме того, фаги могут храниться в течение длительного времени при температуре холодильника [437-438]. Сообщается, что NaNO<sub>3</sub> электролит не влияет на стабильность и титр F-специфических РНК-фагов (MS2), а ионная сила может усиливать агрегацию фагов [439-440]. Таким образом, в коктейле для каждого фага могут быть разные условия хранения, и в синтетической биологии возникает новая проблема длительного хранения фаговых коктейлей, разработанных на основе вирусных частиц с различной чувствительностью. Для эффективного применения средств на основе консорциума бактериофагов необходимо

поддерживать жизнеспособность отдельных фагов в течение определенного периода хранения.

### ***1.6.2 Неблагоприятные условия окружающей среды***

Так, в биоконтроле болезней растений на основе фаговых коктейлей временная персистенция фагов в различных растительных средах по-прежнему является серьезной проблемой [441-445]. Вероятно, наиболее практичными подходами к применению фаговых коктейлей в растительных системах являются опрыскивание, полив или капельное нанесение. Эти методы подвергают бактериофаги входящие в состав коктейлей воздействию неблагоприятных условий окружающей среды в ризосфере и филлосфере. В ризосфере гетерогенный почвенный матрикс, влажность и рН почвы препятствуют распространению фагов в почве и могут препятствовать использованию фаговых коктейлей в качестве средств биоконтроля. В филлосфере фаги подвергаются воздействию солнечного света и неблагоприятных температур, которые отрицательно снижают эффективность фаговых коктейлей. Следовательно, филлосфера более разрушительна для фагов по сравнению с ризосферой. Для достижения эффективности этих агентов биоконтроля в филлосфере было исследовано несколько методов повышения жизнеспособности и выживаемости фагов, таких как защитные препараты, авирулентные бактерионосители и применение фаговых коктейлей ранним утром и вечером [443, 446-447]. Например, аттенуированные штаммы некоторых бактерий увеличивают стойкость фагового коктейля на поверхности листьев *Solanum lycopersicum* и поддерживают популяцию фагов, не влияя на развитие растения и жизнеспособность фагового коктейля [443]. Несколько защитных материалов, таких как предварительно желатинизированная кукурузная мука (PCF) и обезжиренное молоко в определенных рецептурах, защищают фаги от неблагоприятных условий окружающей среды и повышают их эффективность [448-452]. Например, природные соединения в составе 5%

сока красного перца или 10% моркови, в количестве 34% и 28% соответственно от исходного титра фага защищают фаг Y2 *E. amylovora* от 5-минутного воздействия ультрафиолетового излучения. Кроме того, 50 мМ фенилаланина, 50 мМ триптофана и 50 мМ тирозина в соотношении 1:1:1 также могут повысить жизнеспособность фага [448]. Эти составы очень важны для применения фаговых коктейлей, что затрудняет процесс производства. Использование авирулентных бактериальных штаммов с фагом в эквивалентных количествах может быть проблемой при создании коктейлей для большого числа патогенов. Следовательно, необходимы точные стратегии для продвижения механизма биоконтроля патогенных заболеваний растений.

При фаготерапии проникновение патогенов в ограниченные участки тканей и органов может препятствовать успешному использованию фагов. Следовательно, сомнительно, насколько эффективными были бы фаги в борьбе с заболеваниями, индуцируемыми внутриклеточными патогенами [453-454]. В большинстве случаев фаговые коктейли не могут диффундировать через мембраноподобные молекулы и, следовательно, требуют механизма введения для достижения конкретной клетки-мишени. Для достижения эффективного механизма доставки непатогенные бактерии могут использоваться в качестве средства для транспортировки фага к его мишени.

Сложные фаговые коктейли, содержащие поливалентные фаги, могут представлять серьезную угрозу для нецелевых бактериальных сообществ (микробиома растений), даже если воздействие минимально. Поливалентные фаговые коктейли применяются в качестве противомикробных средств для воздействия на несколько патогенных бактерий растений и могут в конечном итоге уничтожать эндофиты. Ожидается, что поливалентные фаги будут влиять на состав микробиома растений либо напрямую, влияя на эволюцию или размер популяции микробного сообщества, либо косвенно, формируя конкуренцию между видами внутри растения [455]. Более того, микробиом



растений может быть враждебен действию фагового коктейля, если он антагонистичен фитопатогенам. Следовательно, вероятное влияние фаговых коктейлей на микробиом растений в ходе полевых исследований может быть изучено с помощью количественных молекулярных подходов до и после применения фаговых коктейлей.

### ***1.6.3 Время и стоимость разработки***

Время и затраты на разработку, оценку и модификацию относительно сложных фаговых коктейлей являются ключевыми факторами, влияющими на их разработку и применение. Хотя фаги могут быть выделены за считанные дни, всесторонняя характеристика, очистка, валидация и составление рецептур большого количества фаговых коктейлей могут отнимать много времени и быть дорогостоящими. Стоимость, однако, будет определяться количеством рассматриваемых патогенов. Коллекции фагов можно использовать для хранения свежевыделенных и описанных фагов, что сокращает время, необходимое для разработки и составления фаговых коктейлей. Средства защиты растений или биопестициды должны соответствовать нормативным стандартам, таким как безопасность, эффективность и качество. Законодательные стандарты различаются от страны к стране и могут потребовать новых разрешений и сертификации при модификации фагового коктейля, поскольку он может считаться новым продуктом [456]. Хотя научные стандарты должны поддерживаться, существует потребность в универсальности нормативной базы, позволяющей быстро обновлять фаговые коктейли в ответ на появление устойчивых к фагам фитопатогенов.

### ***1.6.4 Типы фагов, используемых в качестве агентов биоконтроля, и лежащие в их основе механизмы действия***

С исторической точки зрения термин "фаговая терапия" был преднамеренно введен для терапии животных и человека, но в настоящее

время стратегия биоконтроля фагов чаще используется против большого числа разрушительных бактериальных патогенов растений со значительно обнадёживающими последствиями [457-461]. Основное соображение при определении того, подходит ли фаг для биоконтроля, заключается в том, является ли он преимущественно литического или умеренного действия по своей природе. Вирулентные фаги вызывают инфекцию, которая в конечном итоге заканчивается лизисом бактерии-хозяина, высвобождая частицы потомства фага. Умеренный фаг может проникать в организм хозяина литическим путем, но также может инфицировать лизогенным путем, при котором геном фага интегрируется в хромосомы бактерии-хозяина или сохраняется в виде профага [462-463]. Однако геном нитчатых фагов может размножаться исключительно внутри хозяина или по лизогенному пути заражения, и фаги последовательно проникают через бактериальные мембраны, не подвергаясь лизису.

#### *Нитевидные фаги*

Нитчатые фаги представляют собой вирусы с одноцепочечной ДНК (ssDNA) из семейства *Inoviridae*, которые могут поражать несколько граммотрицательных бактерий, входящих в роды *Salmonella*, *Xanthomonas*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Neisseria* и *Thermus* [464-466]. Нитчатые фаги также используются в качестве агентов биоконтроля против бактериальных инфекций растений. В одном исследовании сообщалось, что нитчатый фаг XacF1 может поражать *X. axonopodis* pv. *citri* посредством рекомбинации XerC/D. Интересно, что заражение XacF1 приводит к различным физиологическим изменениям в клетках-хозяевах, таким как снижение выработки EPS, ограниченная подвижность, замедленная скорость роста и значительное снижение патогенности. В частности, снижение патогенности продемонстрировало, что XacF1 может быть использован в качестве средства биоконтроля против цитрусовой язвы [467]. Основным механизмом инфекции требует связывания нитевидного фага с его хозяином. Адсорбция фагов (M13, fd, f1) запускается связыванием

кодируемого фагом белка (ген 3 белка, g3p) с рецептором на поверхности клетки-хозяина, а именно с F-пилусом клеток *E. coli*. Впоследствии g3p связывается с ToIA, белком внутренней мембраны, который служит корецептором. ssDNA генома фага транслоцируется в цитоплазму хозяина, освобождаясь от белка основной оболочки (gp8). Комплементарная цепь ДНК генома фага вырабатывается в организме хозяина, а затем встраивается в геном хозяина путем использования механизмов организма хозяина. В таких случаях геном фага остается неактивным до тех пор, пока сигналы стресса не запускают репликацию для синтеза кольцевой, сверхспиральной двухцепочечной ДНК (dsDNA), также называемой репликативной формой (RF), при этом интегрированный геном служит матрицей. Некоторые нитевидные фаги (M13) имеют геномы в виде плазмидоподобных векторов, и их ДНК немедленно трансформируется RF ферментами, кодируемыми хозяином. Геном фага может переноситься горизонтально при делении клетки, аналогично другим плазмидам, или путем рекомбинации [466-469]. Нитчатые фаги могут находиться в клетке-хозяине в виде умеренных или вирулентных фагов и интегрироваться в хромосомы хозяина в качестве профагов, играя важную роль в вирулентности и эволюции патогенных бактерий, как сообщается в случае с растительным патогеном с его фагом *φrss1*, который вызывает повышенную вирулентность. Следовательно, их точная роль в качестве агентов биоконтроля все еще остается не до конца ясной.

#### *Умеренные фаги*

Как упоминалось ранее, умеренные фаги могут проникать в клетку лизогенным путем, при котором их ДНК-геномы интегрируются в хромосомы хозяина в качестве профагов и размножаются синхронно с хромосомами хозяина [470-476]. Умеренные бактериофаги могут включаться в литический цикл, самопроизвольно переключаясь с лизогении под воздействием физических или химических факторов окружающей среды (УФ-свет, тепло и др.). Недавно Аль-Анани с соавторами сообщил, что

комбинированное применение фага НК97 умеренного действия и антибиотика ципрофлоксацина приводит к уничтожению бактериальных патогенов [477]. Эта синергия фага и антибиотика (PAS) повышает эффективность фага против бактериальных патогенов [478-482]. Более того, это разнообразный механизм, который не просто усиливает продукцию фагов и действует через белок RecA, но также является критическим компонентом бактериального SOS-ответа. Эта стратегия может несколько усилить их кандидатуру в качестве агентов биоконтроля, но в этом отношении она требует серьезного внимания [483]. С другой стороны, профаги рассматриваются как эволюционные молекулярные бомбы замедленного действия, поскольку ДНК профага может играть значительную роль в эволюции и появлении новых патогенных штаммов посредством трансдукции или горизонтальной передачи генов вирулентности среди бактерий [484-488]. Например, в случае фитопатогенов *P. atropeticum* профаги ECA29 и ECA41, повышают подвижность бактерий-хозяев [489]. Следовательно, пригодность как нитчатых, так и умеренных фагов для применения в биоконтроле сомнительна, поскольку инфицирование ими может оказывать различное воздействие на вирулентность хозяина.

### *Литические фаги*

В идеале кандидатный фаг для биоконтроля должен быть исключительно литическим с широким спектром действия. Это обеспечивает эффективное заражение всех устойчивых патогенных штаммов бактерий, включая род и варианты, на которые они нацелены. Кроме того, преобладает мнение, что фаги должны быть способны быстро лизировать хозяина, создавая большое количество потомства фага, и эффективно диффундировать через среду, в которую они вводятся. Фаги, входящие в состав *Caudovirales*, инфицируют хозяина посредством немедленной экспрессии отдельных генов с последующим захватом клеточного аппарата хозяина и перенаправлением его на репликацию ДНК фага и синтез белка, вызывая патогенность этих фагов, которые разрушают пептидогликан (PG),

что приводит к лизису клеток хозяина, гибели и высвобождению потомства для последующих инфекций [490]. Патогенность трех литических фагов, включая *vRsoP-WF2*, *vRsoP-WR2* и *vRsoP-WM2*, была подтверждена в различных реальных ситуациях и диапазонах хозяев, что привело к успешному заражению целевых патогенов растений, таких как подвид *R. syzygii. indonesiensis*, *R. solanacearum*, обладающих свойствами, подходящими для применения в биоконтроле. Аналогичным образом, *Podoviridae*-подобные литические фаги, такие как *RsoP1IND*, *φrsa1*, *φrsb1* и *φrs11*, также эффективно используются для биоконтроля бактериального увядания, вызванного *R. solanacearum*, хотя их инфекционность связана с уровнем EPS и составом. Следовательно, фаги *Podoviridae* преимущественно заражают хозяев, продуцирующих высокий или нейтральный ЭПС [491-494]. Литические фаги взаимодействуют с хозяином посредством совершенно иных механизмов, чем антибиотики, обладая исключительной эффективностью как против устойчивых к противомикробным препаратам (AMR), так и против бактериальных инфекций, не связанных с AMR [495]. Например, литические фаги могут взаимодействовать с индукторами SAR для интеграции в организм хозяина для успешной борьбы с бактериальной пятнистостью томатов и ксантомонадной гнилью листьев лука. Литические фаги имеют первостепенное значение в составах агрофаговых коктейлей для устойчивой борьбы с болезнями и повышения урожайности сельскохозяйственных культур. Требуется значительное внимание для изучения, лежащего в их основе механизма заражения из-за разнообразия и взаимодействия каждого фага в коктейле.

## 2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 2.1. Материалы и методы исследований

Исследования проведены на базе кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ и Мелекесского центра ветеринарии и безопасности продовольствия им. С.Г. Дырченкова.

#### 2.1.1. Материалы

##### *Штаммы бактерий:*

В работе использовали референсные штаммы бактерий *Pseudomonas syringae* В-10917, *Bacillus pumilus* 66, *Listeria monocytogenes* 56, *Listeria monocytogenes* 9-127, *Listeria monocytogenes* 9-72, *Yersinia enterocolitica* O 9, *Yersinia enterocolitica* O 9H, *Yersinia enterocolitica* O3, *Yersinia enterocolitica* O 8, *Yersinia enterocolitica* O 8R, *Bacillus cereus* 8035, *Bacillus cereus* 2527, *Bacillus cereus* ATCC 14579 полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ. Бактерии обладали типичными для данных родов и видов морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

В исследованиях по изучению специфичности действия выделенных бактериофагов дополнительно использовали референсные и полевые штаммы *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria seeligeri*, *Listeria grayi*, *Listeria murrayi*, *Listeria welshimeri*, *Erysipelothrix insidiosa*, *Jonesia dentrificans*, *Staphylococcus aureus*, *Rhodococcus equi*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Paenibacillus polymixa*, *Paenibacillus larvae* из музея

кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

Бактерии обладали типичными для данных родов и видов морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами.

#### *Объекты исследований*

В ходе работы по выделению бактерий проанализировано 473 пробы почвы, воды, кормов растительного и животного происхождения, молочной, мясной и растительной продукции.

Для выделения бактериофагов отбирались пробы почвы, сточных вод, растительной продукции из различных регионов Приволжского федерального округа.

#### *Питательные среды и реактивы*

Мясопептонный бульон (МПБ) (Оболенск); мясопептонный агар (МПА) (Оболенск); агар бактериологический (Оболенск), Среда Кинга В, Пептон ферментативный (ООО НИЦФ СПб); генцианвиолет 548-62-9 (ЗАО «Вектон», РФ); Глицерин раствор (ОАО Самарамедпром РФ); калий фосфорнокислый двузамещенный ГОСТ 4198-75 (УлХИМ РФ); магний сернокислый (УлХИМ РФ); Оксидазные диски (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия); водорода перекись раствор 3% (ООО «ЮжФарм». Краснодарский край, Крымский р-н, ст. Троицкая); Аргининовый бульон (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия); Питательный желатин (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия); Раствор Люголя (ООО НИЦФ СПб); Пептон ферментативный (ООО НИЦФ СПб); Натрий хлористый ГОСТ 4233-77 УлХИМ РФ; калий фосфорнокислый двузамещенный ГОСТ 4198-75 УлХИМ РФ; бромтимоловый синий (HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия); Натрий хлористый ГОСТ 4233-77 УлХИМ РФ; Кальций хлористый ГОСТ 450-77 УлХИМ РФ; ГРМ-агар агар (ФБУН ГНЦПМиБ Россия г Оболенск); Tween 80 (HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия); Сахароза (чда) ГОСТ 5833-75 УлХИМ РФ; Полоски с реактивом Ковача (на индол) HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия); Железосодержащий

пептонный агар HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия); Трихлорметан стабилизированный 0,6-1 % этанола (хлороформ) ч.д.а. ТУ 2631-066-44493179-01; питательные среды Гисса (ООО «НПЦ «Биокомпас-С» Россия, г. Углич), эмульсия яичного желтка («HiMedia», Индия), среда Мосселя (МУР-агар) (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ); среда РЕМВА (ООО «Ростехнохим», РФ), среда Донована (НПЦ «Биокомпас-С», РФ), желточный агар с хлористым натрием, полимиксином В и 2,3,5-трифенилтетразолиум хлоридом («HiMedia», Индия); дифференциально-диагностическая среда для выявления и культивирования сибиреязвенного микроба с фенолфталеинфосфатом натрия (ФБУН ГНЦ ПМБ, РФ); среда Кларка (ООО «БиоКомпас-С», РФ), Urea Agar Base (Christensen) Основа уреазного агара (по Кристенсену) («HiMedia», Индия), Urea 40% Мочевина 40 % раствор («HiMedia», Индия); нитратный агар («HiMedia», Индия); среда № 7 ISP тирозиновый агар («HiMedia», Индия); Corn Meal Peptone Yeast Agar Пептонно-дрожжевой агар («HiMedia», Индия); цитратный агар Симмонса (ФГУП «НПО Микроген», РФ); Arginine Dihydrolase Broth Аргининовый бульон («HiMedia», Индия); Blood Agar Base Основа кровяного агара («HiMedia», Индия); Nutrient Gelatin Питательный желатин («HiMedia», Индия), TSB (триптоно-соевый) агар (Tryptic Soy Agar, India ), TSB (триптоно-соевый) бульон (Tryptic Soy Broth, India), набор для окраски по Граму, Оксфорд агар (Listeria Oxford Medium Base, India) в сочетании с селективной добавкой, хромогенный агар (Chromogenic Listeria Agar Base TM Media, Rajasthan, India) с селективными добавками, основа бульона Фрейзера (Fraser Broth Base HiMedia Laboratories Pvt. Limited) с селективными добавками, кровяной агар с добавлением 5% дефибринированной крови барана, лецитиназный агар, лецитиназный агар с 1% активированным углем, сульфаниловая кислота, альфа-нафтиламиновый реактив, уксусная кислота, молоко цельное; 0,6 % спиртовой раствор  $\alpha$ -нафтола, йод кристаллический CAS 7553-56-2 (Производство Чили), перекись водорода 3 % (ООО Росбио), водный раствор малахитовой зелени, 0,25%-ный водный раствор основного



фуксина; Натрий хлористый (хч) (АО ЛенРеактив, РФ); 0,1 % водный раствор Конго красного (АО ЛенРеактив, РФ), карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) (ФКП «Комбинат «Каменский», РФ), 1 М раствор CaCl<sub>2</sub>, фосфатный буфер (ОАО «Агат-Мед», РФ), Твин - 80 бактериологический («HiMedia», Индия), Rectin Directa (Agdia), ЭНТЕРОтест24 (Микро-ЛА-Тест), картофель; стерильная дефибрированная кровь барана, яйцо куриное диетическое, комплект реагентов для выделения ДНК (состав: лизирующий раствор 7,5 мл; сорбент 1,0 мл; промывочный раствор №1 10 мл; промывочный раствор №2 10 мл; промывочный раствор №3 10 мл; элюирующий раствор 5 мл), «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ с Taq-ДНК-полимеразой и ингибирующими активностью фермента антителами» (состав набора: дезоксинуклеозидтрифосфаты, 2.5 мМ, 500 мкл; 10-кратный ПЦР буфер, 500 мкл; MgCl<sub>2</sub>, 25 мМ, 500 мкл; Taq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами, 5 Е/мкл, 50 мкл; деионизированная вода, 2x1,7 мл.) («Синтол», Москва).

#### *Для постановки ПЦР*

применяли реакционную смесь БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue(2×) и БиоМастер HS-qPCR (2×) (Биолампис, Россия) и стандартный набор лабораторного оборудования и расходных материалов, включающий: центрифуга/вортекс для пробирок (BioSan, Польша), ламинарный бокс БМБ-П-«Ламинар-с»-1 2 (ЛамСистем, Россия), твердотельный термостат TDB-120 (BioSan, Польша), центрифуга-встряхиватель медицинская серии SM-50M (ELMI, Польша), детектирующий амплификатор ДТ-96 («ДНК-Технология», Москва), микроцентрифуга «Eppendorf» на 13000 об./мин. для пробирок объемом 1,5 мл «Axugen», автоматические пипеточные дозаторы переменного объема (5-50; 20-200; 200-1000мкл) «Gilson», «Ленпипет», «Eppendorf»; вакуумный аспиратор (насос) с колбой-ловушкой.

#### *Приборы и оборудование*

Лабораторная посуда, холодильники бытовые, термостат (ТСО-1/80) ОАО «Смоленское СКТБ СПУ»; термометр; ультрафиолетовая лампа марки

«Phillips» с длиной волны 253 нм; лабораторная стерильная посуда; лабораторные весы(CE323-C); автоклав (ГК-100-3); Дистиллятор (Liston); лабораторные центрифуги (ELMI-Multi centrifuge CM 6M) – 3000 об/м; водяная баня (UT4302E); термометр ртутный; лупа бинокулярная МБС-9; автоклав (ВК-75); шкаф сушильно-стерилизованный (ШШС-80); дистиллятор (ДЭ-50); спектрофотометр Nanodrop 2000/2000с (ThermoFisher), амплификатор («MaxyGene», AXYGEN Scientific, США); ультрафильтр Merck (Millipore).

### **2.1.2. Методы**

Отбор проб осуществляли в соответствии Методическими рекомендациями МР 4.2.0220-20 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы санитарно-бактериологического исследования микробной обсемененности объектов внешней среды.

Выделение и идентификацию искомым микроорганизмов проводили согласно общеизвестным бактериологическим тестам указанным в литературных источниках, в том числе «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria» (2015). Вследствие значительного расширения научной базы по вопросу идентификации бактериальных культур, а также актуализацией многих методик, проводили самостоятельную корректировку предложенных схем выделения и идентификации изучаемых бактерий. Постоянное хранение выделенных бактерий осуществляли при температуре 2-4<sup>0</sup>С на мясопептонном агаре (0,3%).

При идентификации выделенных штаммов из окружающей среды определяли следующие свойства бактерий: морфологические, тинкториальные, культуральные и биохимические. Определение тинкториальных свойств (окраска по Грамму, подвижность культуры, образование спор) проводили по стандартной методике.

Приготовление и стерилизация питательных сред ГОСТ Р 51446-99. Приготовление разведений и суспензий – ГОСТ Р 51426-99. Посев на

питательные среды согласно ГОСТ Р 26670-91. Отбор и подготовку лабораторных проб проводили ГОСТ 26669-85, ГОСТ 26668-85.

*Выделение бактериофагов из культур бактерий под действием индуцирующего фактора*

Выделение бактериофагов из культур бактерий под действием индуцирующего фактора, в качестве которого использовалось воздействие ультрафиолетовыми лучами (УФ), проводили с помощью ртутной газоразрядной лампы, при уровне излучаемой энергии в виде УФ-лучей не менее 90% с длиной волны в пределах 250-260 нм. В данном эксперименте использовали культуры, находящиеся в экспоненциальной фазе роста (4-6 часов). Готовили разведение культур бактерий в фосфатном буфере (рН 7,4) в соотношении 1:20 и по 10 мл разливали в две чашки Петри для каждой повторности. После чего одну из чашек (опытную) открывали и в течении 20 (30, 40, 60) секунд облучали в зоне действия УФ-лучей на расстоянии 40 (50, 60) см, оставшуюся чашку выдерживали в зоне действия ультрафиолетовых лучей закрытой при тех же параметрах облучения. Эксперимент проводили в затемненном помещении без доступа солнечных лучей с целью предохранения культур микроорганизмов, подвергшихся облучению, от фотореактивации.

Затем взвеси бактерий (3-4 мл) засеивали в отдельные пробирки с 5 мл МПБ и инкубировали 24 часа в условиях термостата.

Параллельно осуществляли посев методом агаровых слоев с использованием индикаторной культуры и инкубировали при оптимальной температуре в течении 24 часов. Литический эффект действия определяли в первом случае по просветлению среды в пробирке с взвесью бактерий из открытой чашки, во втором случае по появлению негативных колоний на среде. Схема эксперимента представлена на рисунке 1.

Выделение профага из бактериальных клеток воздействием на них химического фактора, индуцирующего механизм репликации фаговой ДНК, проводили при использовании митомицина С в дозе 0,5 мкг/мл. Для этого в

пробирки с жидкой питательной средой МПБ, содержащей 0,5 мкг/мл митомцина С, засеивали исследуемые культуры. Пробирки культивировали в течении 5-6 часов при оптимальной температуре развития бактерий.

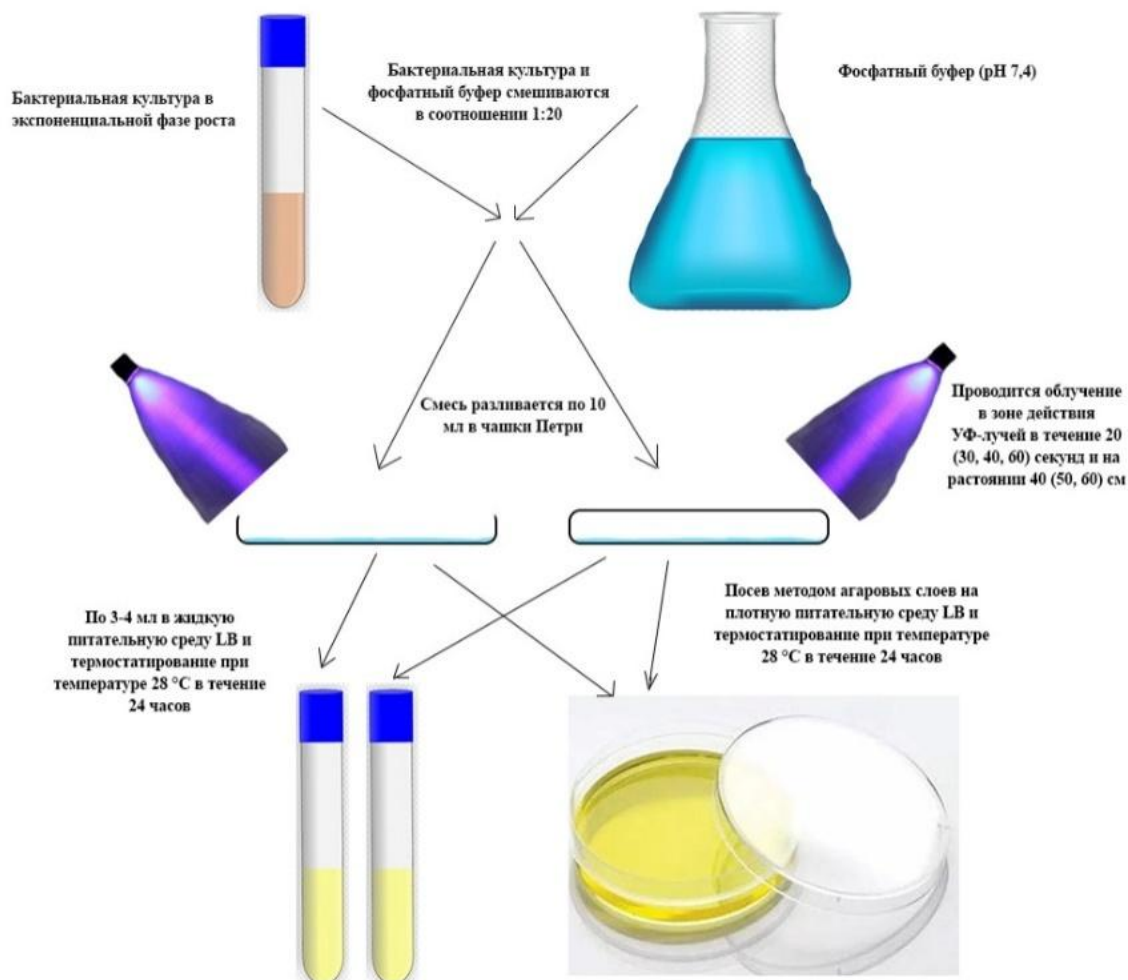


Рисунок 1 - Схема выделения бактериофагов из бактериальных культур путем воздействия на них индуцирующего фактора (УФ-лучи)

После этого содержимое пробирок центрифугировали при 3000 об/мин в течении 20 минут, фильтровали через мембранные фильтры с величиной пор 0,22 мкм. Наличие бактериофагов изучали методом «стекающая капля», для чего на поверхность МПА наносили несколько капель суточной культуры бактерий, далее стерильным шпателем растирали капли по поверхности среды и термостатировали в течении 20-30 минут с целью

подсушивания «газона». Каплю исследуемого фильтрата наносили на поверхность среды и наклоняли чашку Петри. После чего чашки термостатировали в течении 48 часов. Наличие зон лизиса свидетельствовало о присутствии бактериофага в исследуемом фильтрате. Схема эксперимента представлена на рисунке 2.

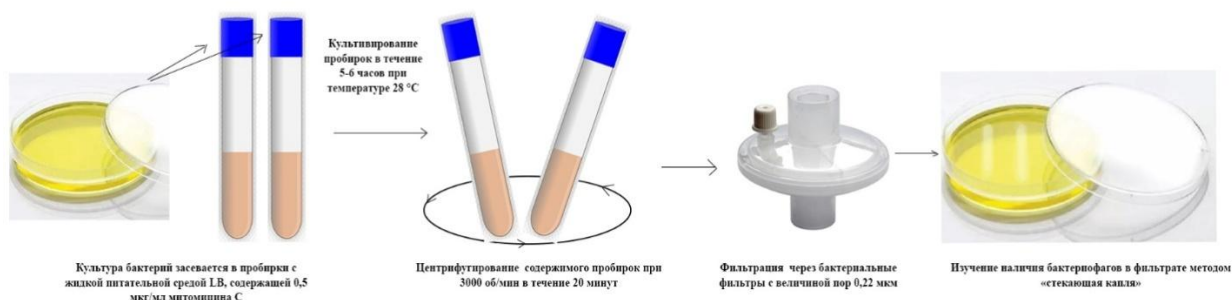


Рисунок 2 - Схема выделения бактериофагов из бактериальных культур путем воздействия на них индуцирующего фактора (митомycin С)

### *Методы выделения бактериофагов из окружающей среды*

Выделение бактериофагов и изучение их биологических свойств проводили методами, предложенными М. Адамсом и Д.М. Гольдфарбом, отработанными и модифицированными сотрудниками ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ.

#### *Выделение бактериофага методом обогащения с «подсевом»*

Жидкие и твердые образцы засеивали в мясо-пептонный бульон (МПБ).

Одновременно с исследуемым материалом в питательную среду вносили 0,2– 0,5 мл суточной бульонной культуры бактерий, гомологичных выделяемому фагу. Для контроля культуру бактерий, применяемую для обогащения, засеивали в стерильную питательную среду. Емкости с посевами ставили в термостат при температуре, оптимальной для роста культуры, на 18–24 ч. После инкубации из опытной и контрольной пробирок брали по несколько миллилитров жидкости и фильтровали через бактериальные

фильтры. Полученный фильтрат исследовали на присутствие бактериофага, гомологичного бактериям, примененным для обогащения.

Сущность данного метода заключается в предварительном обогащении исследуемого материала клетками того микроорганизма, к которому ищем бактериофаг. Бактерии, внесенные в исследуемый материал, начинают размножаться, и вместе с ними увеличивается количество фага.

*Обнаружение бактериофага на плотных питательных средах по методу Отто*

1,5% мясопептонный агар разливали в чашки Петри. После застывания питательную среду засеивали 16–18-часовой бульонной культурой бактерий, гомологичных искомому фагу. Для получения сплошного роста 2–3 капли культуры наносили на чашку и растирали шпателем равномерно по всей ее поверхности. Спустя 5–10 мин после посева на подсушенную поверхность питательной среды наносили каплями исследуемый фильтрат. После того как жидкость впиталась в среду, чашки переворачивали вверх дном и ставили в термостат при оптимальной температуре роста микроорганизмов на 18–24 ч. Учет результатов: доказательством наличия бактериофага служит полное отсутствие роста культуры в месте попадания капли фильтрата (активный бактериофаг) или появление в этом участке мелких стерильных пятен – колоний бактериофага.

*Обнаружение бактериофага на плотных питательных средах двуслойным методом по Грациа*

1,5% МПА разливали в чашки Петри в количестве 25–30 мл (первый слой). После застывания среды чашки ставили в термостат на 1½–2 ч для подсыхания. В пробирку с 2,5 мл 0,7% расплавленного и остуженного до 45 °С агара вносили 1 мл исследуемого фильтрата и 0,2 мл суточной культуры, соответствующей искомому фагу. Содержимое пробирок быстро перемешивали, чтобы не произошло затвердевания агара, и выливали на чашку вторым слоем. После того, как агар застывал, посев ставили в термостат при оптимальной температуре роста микроорганизмов. Результат

учитывали через 16–18 ч инкубации в термостате. Присутствие бактериофага определяли по наличию прозрачных пятен, хорошо видимых на матовом фоне роста бактерий.

*Выделение бактериофагов, активных в отношении определенного спектра бактерий-мишеней*

Выделение и изучение биологических свойств фагов проводили по методам, предложенным Д.М. Гольдфарбом, определения титра фаговых частиц и морфологии негативных колоний - по методу Грациа, с учетом температурных режимов оптимальных для культивирования отобранных бактерий-хозяев.

Для выделения бактериофагов из сточных вод, исследуемые образцы объемом 15 мл засеивали в колбу с МПБ в объеме 50 мл, внося при этом по 0,2 мл (полная петля) суточной бактериальной культуры. После инкубирования из колбы брали 10 мл жидкости и помещали в стерильную пробирку. Затем, с целью освобождения от посторонней микрофлоры, материал центрифугировали в течение 30 мин при 5000 об/мин, надосадочную жидкость отбирали и фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Присутствие бактериофага определяли по наличию прозрачных пятен (бляшек, негативных колоний), хорошо видимых на матовом фоне роста бактерий.

В случае положительного результата негативные колонии или участок лизиса пересеивали с помощью бактериологической петли в МПБ с соответствующей индикаторной культурой. Для этого в две пробирки с 4,5 мл МПБ добавляли стерильной пипеткой по 0,2 мл суточной бульонной индикаторной культуры, в одну из которых пересеивали негативную колонию соответствующего бактериофага, вторая пробирка служила контролем. Определяющим моментом являлось просветление бульона в опытной пробирке и выраженное помутнение среды в контроле. После чего содержимое опытной пробирки с целью освобождения от бактериального дебриса центрифугировали в течение 30 мин при 5000 об/мин, надосадочную

жидкость отбирали и фильтровали через мембранные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

#### *Определение титра литической активности бактериофагов*

После выделения бактериофага необходимо определить его количественное соотношение, или титр фага. Для титрования бактериофага предложены различные методы, однако наибольшее распространение из них получили способ титрования фага в жидкой питательной среде, предложенный Аппельманом, и метод агаровых слоев, разработанный Грациа.

#### *Титрование бактериофага в жидкой питательной среде по методу Аппельмана*

Метод основан на внесении различных количеств титруемого бактериофага в питательный бульон, засеянный одной и той же дозой бактериальной культуры, чувствительной к данному фагу. Для этого брали 10 пробирок с 4,5 мл МПБ в каждой. В первую пробирку вносили 0,5 мл исследуемого фага, содержимое пробирки тщательно перемешивали. Из первой пробирки 0,5 мл переносили во вторую и т.д. до получения ряда последовательных 10-кратных разведений фага ( $10^{-1}$  -  $10^{-10}$ ). В каждую пробирку приготовленного ряда вносили по 0,03 мл взвеси суточной агаровой культуры бактерий, содержащей  $10^9$  микробных клеток в 1 мл по стандарту мутности (10 МЕ), чувствительной к данному фагу. Для контроля брали 2 пробирки с МПБ, в одну из которых вносят 0,5 мл исследуемого фага (контроль на стерильность фильтрата фаголизата), в другую пробирку 0,03 мл микробной культуры (контроль культуры). Все пробирки помещали в термостат при оптимальной температуре роста микроорганизмов на 18 ч. Результат определяли по отсутствию видимого роста бактерий в присутствии бактериофага. Активность (силу литической активности или специфическую активность, но не титр) бактериофага обозначают отрицательной степенью десяти, где степень указывает последнее разведение бактериофага, в котором рост индикаторной культуры визуально не наблюдался.



### *Титрование бактериофага методом агаровых слоев (метод Грация)*

Этот метод основан на внесении различных разведений титруемого бактериофага в соответствующую культуру бактерий и посева на плотную питательную среду с целью получения негативных колоний бактериофага. Накануне опыта готовили питательные среды. В чашки Петри разливали 1,5% МПА по 25 мл среды. Среду в чашках подсушивали в термостате до полного удаления конденсата. Агар должен быть абсолютно сухим, так как даже незначительное увлажнение может изменить количественные показатели содержания частиц фага в исследуемой жидкости. Брали 0,7% МПА в пробирках по 2,5 мл в каждой, расплавляли его на водяной бане и охлаждали до 48–50 °С. Из жидкости, содержащей титруемый бактериофаг, готовили в пробирках ряд последовательных разведений (как в методе Аппельмана). Затем в пробирку с 0,7% МПА вносили 1 мл соответствующего разведения исследуемого бактериофага, слегка перемешивали, добавляли 0,1–0,2 мл  $10^9$  культуры, чувствительной к бактериофагу, опять слегка перемешивали и содержимое пробирки выливали в чашку с МПА (вторым слоем). Смесь равномерно распределяли по поверхности агара и оставляли чашку в горизонтальном положении на 40–50 мин, то есть до полного охлаждения агара. Затем чашки слегка подсушивали и инкубировали в термостате при оптимальной температуре роста микроорганизмов в течение 18–20 ч. На фоне равномерного роста микробов отмечались пятна, где рост отсутствовал (полный лизис). При большом количестве бактериофага наступал лизис микроорганизмов на всей поверхности агара. Когда количество фаговых частиц невелико, то участков лизиса мало, и можно рассчитать количество бляшкообразующих единиц (БОЕ) фага в 1 мл препарата, допуская, что каждый участок лизиса образовывался в результате действия одной частицы фага. Допустим, что на агаре в чашке имелось 30 пятен лизиса (колоний фага) при исследовании фильтрата в разведении  $10^{-7}$ . Следовательно, титр фага будет равен  $3 \times 10^{-8}$ , т.е. в 1 мл фага содержится  $3 \times 10^8$  БОЕ.

### *Определение спектра литической активности бактериофагов*

Спектр литической активности бактериофагов оценивали методом нанесения фага (spot-тест) на газон бактериальной культуры. В чашки Петри разливали 1,5% МПА. После застывания и подсушивания агара на чашки Петри наносили по 0,1 мл 16–18-часовой бульонной культуры микроорганизмов, растирали шпателем по всей поверхности чашки, чтобы получить равномерный сплошной рост культуры. После того, как культура впиталась и чашки подсохли, на них каплями (spot-тест) наносили бактериофаги. После того, как жидкость впиталась в среду, чашки переворачивали вверх дном и ставили в термостат при оптимальной температуре роста культуры на 18–24 ч. На следующие сутки производили учет результатов – наличие или отсутствие «пятна лизиса».

### *Получение фаговой биомассы с высоким титром фаговых частиц*

Фаговую биомассу с высокой литической активностью получали методом выращивания на плотных питательных средах (Патент РФ №2525141 «Способ получения бактериофага»). Он включает следующие этапы:

1-й этап – это получение ночной (18-часовой) культуры штамма-хозяина. Бактериальную культуру, выросшую на плотной питательной среде, микробиологической петлей засевают в МПБ, разлитый по 4,5 мл из расчета одна пробирка на одну матрасную колбу. Посеянные таким образом индикаторные штаммы культивируют в термостате 18 ч.

2-й этап – нанесение штамма-хозяина на поверхность плотной питательной среды.

В матрасные колбы с плотным питательным агаром вносят 18-часовую культуру штамма-хозяина. Распределяют культуру по всей поверхности питательной среды, создавая монослой. Культивируют в течение 3,5 ч при оптимальной температуре для роста культуры штамма-хозяина.

3-й этап – нанесение маточного штамма бактериофага.

В образовавшийся таким образом газон культуры вносят шприцем или стерильной микробиологической пипеткой 2 мл одноименного (маточного) бактериофага в титре  $10^6$ – $10^7$  БОЕ/мл. Соотношение посевной культуры и бактериофага составляет 100 к 1, т.е. на 100 бактериальных клеток – 1 частица бактериофага. Покачивающим движением распределяют бактериофаг. И опять отбирают стерильной пипеткой лишнюю жидкость. Инкубируют в термостате 13–15 ч при оптимальной температуре для роста культуры штамма-хозяина и одноименного бактериофага.

4-й этап – сбор бактериофага.

В матрас в асептических условиях вносят физиологический раствор с рН 7,0–7,2 в количестве 0,04–0,045 мл на 1 см<sup>2</sup> (9 мл на один матрас). Плавным покачивающим движением производят смыв фага с поверхности питательного агара. Стерильной микробиологической пипеткой собирают жидкую фракцию и переносят в стерильные центрифужные пробирки. Эта фракция состоит из бактериофага, обломков бактериальных клеток, живых нелизированных клеток штамма-хозяина. Для освобождения фаголизата от нелизированных бактерий в пробирки добавляют хлороформ из расчета 1/10. Экспонируют полученную суспензию 30 мин, центрифугируют 30 мин при 5000–6000 об/мин. Собирают полученный супернатант.

5-й этап – очистка и контроль фаголизата.

Полученный таким образом фаголизат стерилизуют фильтрацией через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

*Методы оценки стабильности бактериофагов к воздействию агрессивных факторов*

Устойчивость бактериофагов-кандидатов к повышенным температурам  
Степень устойчивости бактериофагов к воздействию высокой температуры проводили следующим способом: исследуемые бактериофаги разводили в МПБ (рН 7,2–7,4) для того, чтобы получить бактериофаг определенной концентрации. Затем пробирки с фагами прогревали на водяной бане в диапазоне измеряемой температуры с определенным

интервалом в течение заданного промежутка времени. Параллельно титровали контроль – фаголизат без прогревания и охлаждения. Количество негативных колоний определяли методом агаровых слоев по Грациа.

#### *Устойчивость бактериофагов к воздействию трихлорметана*

Трихлорметан является недорогим и доступным средством, не всегда убивающим бактериофаговые частицы, которое используется для освобождения фаголизата от жизнеспособных микроорганизмов. Определение чувствительности бактериофагов к данному химическому веществу проводили методом обработки фаговой суспензии трихлорметаном в соотношении 1:10 при постоянном перемешивании. Для этого брали по 3 пробирки с 4,5 мл МПБ, в каждую вносили по 0,2 мл испытываемого бактериофага и 0,2 мл бактериальной культуры, чувствительной к данному фагу (индикаторная культура). Пробирки культивировали при оптимальной температуре в течении 18–20 ч. Затем в каждую пробирку добавляли по 0,5 мл трихлорметана. Выдерживали смесь при непрерывном встряхивании в течении заданного времени, откручивали на центрифуге 30 мин при 5000 об/мин. Собирали супернатант. Активность бактериофага определяли по методу Грациа. Контролем служил стерильный фильтрат фаголизата, полученный с использованием бактериальных фильтров.

Выделение ДНК из образцов проводили в соответствии с инструкциями к используемым наборам.

Поиск полных нуклеотидных последовательностей генов определяющих факторы патогенности осуществляли в системе NCBI. Множественное выравнивание генов проводили в Multiple Sequence Alignment Viewer 1.22.1 и UGENA 44.0.

Праймеры и пробы были сконструированы в системе Primer Blast NCBI.

Статистическая обработка результатов исследований проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft Office 2017.

## 2.2. Результаты собственных исследований

### 2.2.1. Выделение и изучение биологических свойств новых штаммов фитопатогенных бактерий *Pseudomonas syringae*, *Bacillus pumilus* и основных пищевых патогенов *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*

Отбор проб осуществляли в заранее заготовленные контейнеры в соответствии с действующими Правилами взятия патологического материала, крови, кормов и пересылки их для лабораторного исследования и Методическими рекомендациями МР 4.2.0220-20 Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Методы санитарно-бактериологического исследования микробной обсемененности объектов внешней среды.

#### 2.2.2.1 Выделение и изучение биологических свойств новых штаммов бактерий вида *Pseudomonas syringae*

Выделение и идентификацию бактерий вида *Pseudomonas syringae* из проб растительной продукции проводили по схеме, представленной на рисунке 3. Схема включала в себя основные биохимические свойства данного вида бактерий, отобранные на основе анализа научной литературы. Были отобраны такие параметры, как окраска выделенных микроорганизмов по Грамму; подвижность; наличие флуоресценции; тесты на оксидазу, каталазу, аргинингидролазу; образование левана, индола и сероводорода; липолитическая (твиназная) и лецитиназная активность; использование глюкозы, лактозы, сахарозы, маннозы и сорбита в качестве источника углерода; рост при 41°C и в среде с 5% NaCl; тест на мацерацию ткани и гиперчувствительность.

В соответствии с представленной схемой на первые сутки осуществлялась пробоподготовка, для чего в колбу с 50 мл МПБ добавляли исследуемый образец в соотношении 1:10 и термостатировали при 28°C в течение 24 часов. На второй день из колбы с полученным субстратом делали

посев на чашки Петри со средой Кинг Б и культивировали в течение суток при 28°C. На третий день с чашек отбирали колонии, характерные по морфологическим свойствам бактериям *P. syringae*, проводили окраску по Грамму. В случае обнаружения грамотрицательных клеток проводили пересев этих колоний на МПБ для дальнейшей идентификации.

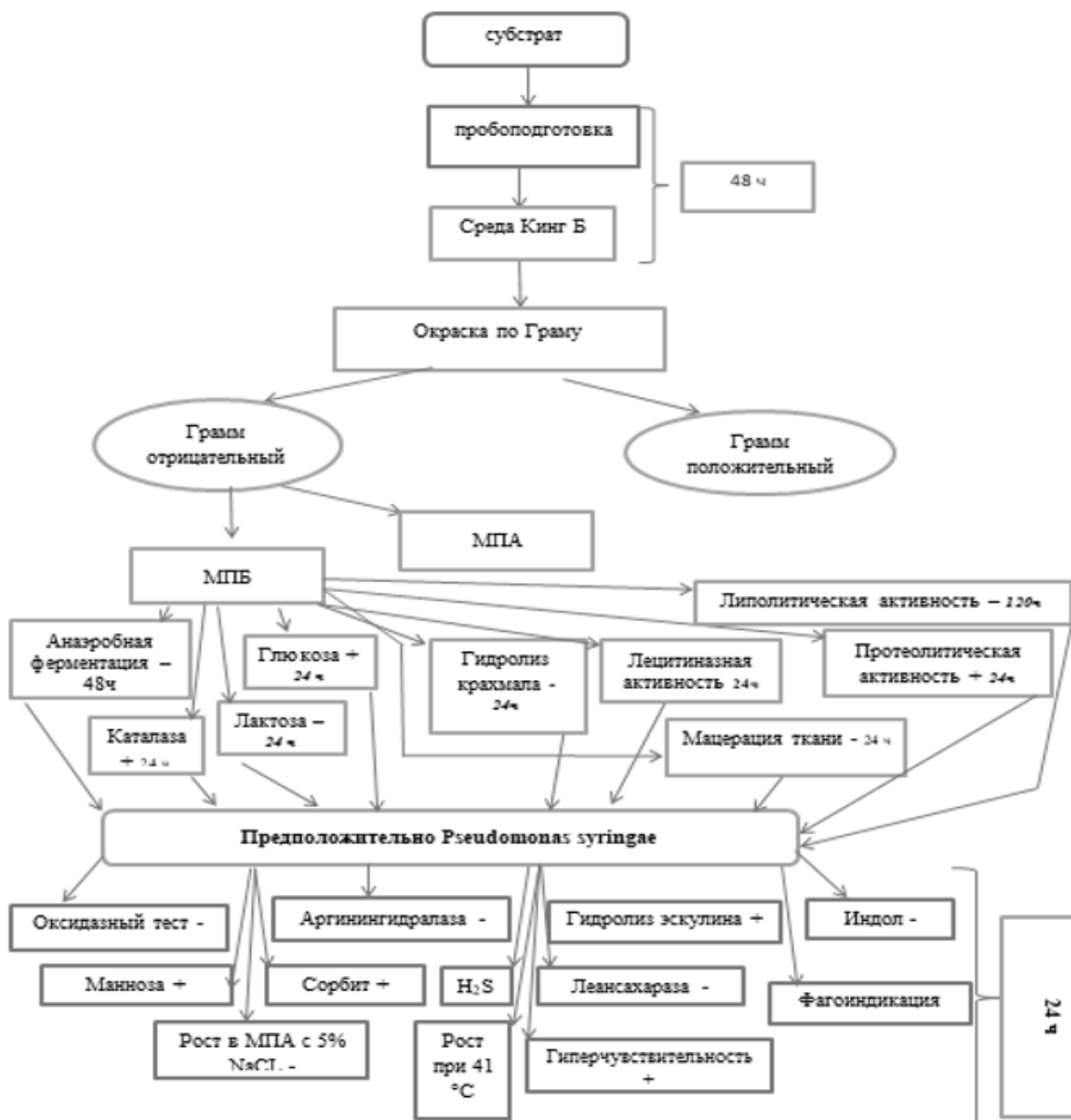


Рисунок 3 – Бактериологическая схема выделения и идентификации бактерий *Pseudomonas syringae*

Из 134 исследуемых образцов растительной продукции было выделено 12 штаммов бактерий, которые в дальнейшем были типированы, как

*Pseudomonas syringae*. Все выделенные микроорганизмы представляли собой грамотрицательные мелкие прямые или слегка изогнутые палочки. Установлено, что клетки выделенных бактерий в мазке располагались преимущественно поодиночке, равномерно. Образование спор и капсул отмечено не было.

Было проведено изучение характера роста выделенных штаммов микроорганизмов на различных питательных средах (Кинг Б, цетримидный агар, картофельный агар с ТТХ), используемых в микробиологическом контроле. После культивирования посевов на МПА наблюдали рост мелких белых колоний с ровными краями. На среде Кинг Б отмечен рост мелких круглых колоний со слабой флюоресценцией в проходящем УФ свете. На среде с картофельным агаром с ТТХ рост был слабым, отмечены мелкие колонии. Рост на среде с цетримидном агаром наблюдались мелкие с четкими краями белые колонии с флюоросценцией.

Тинкториальные свойства всех изучаемых штаммов соответствовали бактериям вида *Pseudomonas syringae*. Все штаммы на среде Кинг Б при проходящем свете давали флуоресцирующий оттенок (рис.4).



Рисунок 4 – Характер роста бактерий *Pseudomonas syringae* на среде Кинг Б под УФ лучами

Подвижность выделенных штаммов определяли на 0,7% агаризованной питательной среде, путем посева уколом в толщу агара. О подвижности микроорганизмов судили по характеру роста. Все выделенные штаммы по итогам исследования продемонстрировали рост не только по линии посева, но и в толще питательной среды, что свидетельствовало об их подвижности.

Тест на каталазную активность проводили с применением 3% раствора перекиси водорода. На суточные культуры бактерий, выращенные на плотной питательной среде, наносили несколько капель 3% раствора перекиси водорода. Реакцию считали положительной при образовании вокруг колоний бактерий пузырьков газа (рис.5).



Рисунок 5 - Изучение каталазной активности штамма Pss3

Тест на оксидазу проводили экспресс методом. Суточные культуры наносили на оксидазные диски (HiMedia Laboratories Pvt. Limited, Индия), результаты оценивали по изменению цвета дисков. У всех выделенных штаммов реакция на оксидазу была отрицательна.

Оценку способности исследуемых бактерий к гидролизу крахмала проводили на питательной среде, содержащей 1% крахмала. После культивирования на поверхность питательной среды наносили раствор люголя и наблюдали за реакцией. По результатам проведенных исследований



наличия гидролиза крахмала используемыми микроорганизмами отмечено не было (рис.6).



Рисунок 6 – Определение гидролиза крахмала

Далее было проведено определение способности выделенных бактерий к анаэробной ферментации (O/F тест). Результаты в процессе постановки эксперимента регистрировали ежедневно в течение 3 суток. Полученные результаты показали, что исследуемые микроорганизмы образовывали кислоту в открытой пробирке (O-реакция), что свидетельствовало об окислительном типе метаболизма (рис. 7).

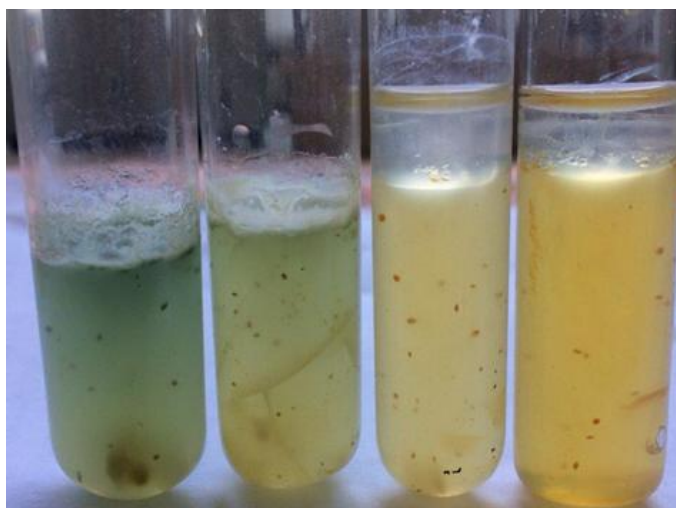


Рисунок 7 - O/F тест (определение анаэробной ферментации) слева 2 пробирки без вазелинового масла (штамм Pss7), справа 2 пробирки с вазелиновым маслом (штамм Pss7)

Для определения лецитиназной активности готовили яично-желточную плотную среду. Затем суточные культуры засеивали в чашки, инкубировали в течение 24 часов при 28°C. При положительной реакции вокруг колоний формируется небольшой ареол, отливающий металлическим блеском. При отрицательной реакции цвет среды вокруг колонии не изменяется.

Тест на продукцию левана использовали для установления видовой принадлежности бактерии рода *Pseudomonas*. Многие бактерии из рода *Pseudomonas* утилизируют сахарозу в качестве источника углерода и продуцируют из нее леван, что свидетельствует о наличии фермента левансахаразы. Для определения свойства выделенные штаммы бактерий высевали на МПА с 5% сахарозой. Результаты учитывали в течение 3 суток. При образовании на среде с сахарозой белых, мукоидных, тянущихся колоний отмечали способность штамма к продуцированию левана (рис. 8).



Рисунок 8 – Образование левансахаразы *Pseudomonas syringae*, время экспозиции 24 часа при 28°C (первый сектор штамм Pss4, второй сектор штамм Pss5, третий сектор штамм Pss6)

Все штаммы образовывали леван, что доказывается ростом всех исследуемых культур бактерий на среде с 5% сахарозой в виде белых, мукоидных, тянущихся колоний.

Липолитическая (твиназная) активность также используется для идентификации бактерий рода *Pseudomonas*. Твины – это эфиры спиртов (сорбитол, маннитол и др.) и жирные кислоты. Твин 80 является эфиром олеиновой кислоты. Под действием бактериальных липаз жирные кислоты отщепляются, затем осаждаются в виде мыла присутствующими в питательной среде ионами кальция. Весь этот процесс сопровождается помутнением среды. Для определения свойств выделенных штаммов проводили их высев медальонами на подготовленную питательную среду, содержащую твин 80 и инкубировали в течение 7 суток. Оценку результата проводили по образованию вокруг бляшек помутнения (рис. 9).

Все исследуемые штаммы бактерий показали положительный результат, что проявлялось в образовании зон помутнения вокруг выросших колоний.

Протеолитическую активность определяли на среде с желатином. Наличие протеолитических ферментов, выделяемых в процессе роста культур, приводило к разжижению питательной среды.

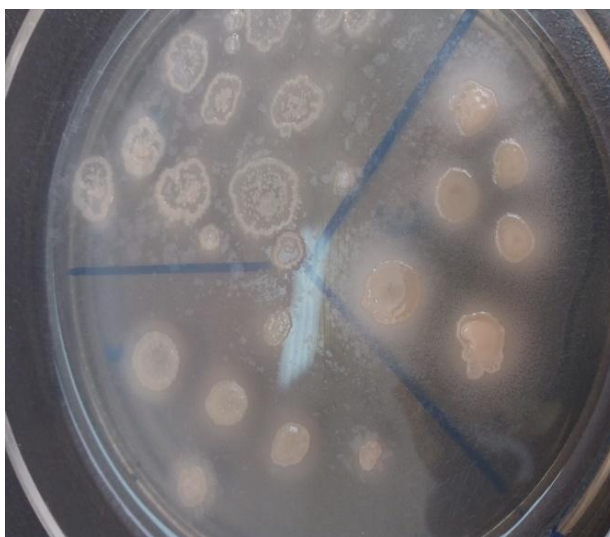


Рисунок 9 – Липолитическая (твиназная) активность *Pseudomonas syringae* время экспозиции 72 часа при 28°C

Штаммы Pss2, Pss3, Pss5, Pss7 и Pss8 желатин разжижали медленно в течение 3 суток, остальные штаммы не разжижали желатин вовсе (рис. 10).

Данный факт отмечался в некоторых источниках литературы, данное свойство можно объяснить тем, что бактерии *Pseudomonas syringae* имеют более 50 патоваров.



Рисунок 10 – Разжижение желатина выделенными бактериями (слева-направо штаммы: Pss2, Pss3, Pss5, Pss7, Pss8)

Суть определения аргинингидралазы состоит в том, что бактерии, обладающие аргинингидралазой, образуют из аргинина  $\text{NH}_3$  в анаэробных условиях, что сопровождается защелачиванием среды и изменением цвета индикатора. Обычно данный метод также используется для дифференциации псевдоманад (рис. 11).

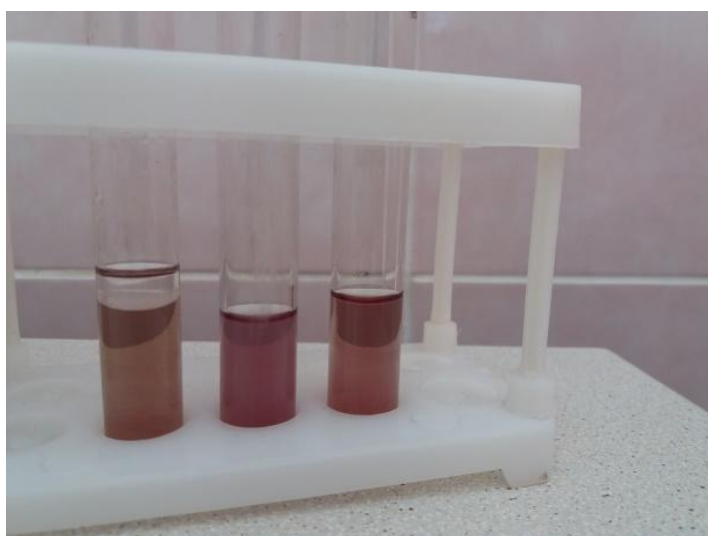


Рисунок 11 – Реакция на аргинингидролазу у *Pseudomonas syringae* (первая и вторая пробирка тестовые, третья пробирка контроль; штамм Pss4)

Ферментативные свойства исследуемых бактерий определяли на средах Гисса. Обобщенные результаты по всем тестам представлены таблице 2.

Проведено изучение способности бактерий к росту при температуре 41°C и в среде, содержащей 5% NaCl. Полученные данные показали, что все штаммы не способны расти при заданных условиях.

Для оценки фитопатогенных свойств бактерий проводили определение гиперчувствительности, которое состоит в том что, при заражении растения фитопатогенными бактериями, не являющимися патогенным для данного вида растений, на месте введения бактерий запускаются быстрые механизмы защитного ответа в виде почернения и усыхания. Обычно в качестве тест-растения для определения реакции гиперчувствительности берут растения бобов конских (*Vicia faba*) и табака настоящего (*Nicotiana tabacum*). Данные растения неприхотливы, у них имеются листовые пластинки пригодные для инокуляции бактерий с помощью иглы, и также они быстро растут. Бобы являются специфическим для бактерий *Pseudomonas syringae*, то есть некоторые патовары данного вида бактерий могут вызвать заболевание бобов. В связи с этим в эксперименте использовались ростки табака. Для работы суточные культуры на скошенном агаре смывали 3-4 мл физиологическим раствором и 15-20 мкл вводили в мякоть листа с помощью стерильного шприца. В качестве контроля использовали стерильный физиологический раствор. Результаты оценивали в течение 3 суток.

Для определения теста на мацерацию ткани использовали картофель. Для этого брали срезы клубней картофеля и наносили на них суточные культуры исследуемых бактерий. Спустя сутки наблюдали за результатом (рис. 12).

В таблице 1 приведены сводные данные, в сравнении с литературными данными и результатами изучения биологических свойств референсных штаммов.

Таблица 1 - Сводная таблица с информацией об основных свойствах бактерий *Pseudomonas syringae*

Характеристика	Данные об основных свойствах бактерий <i>Pseudomonas syringae</i> по Bergey	Штаммы бактерий <i>Pseudomonas syringae</i>		Результаты по 12 выделенным культурам <i>Pseudomonas syringae</i>		
		В-10917	Ps.s.-3-УГСХ А			
				+	-	±
окраска по Граму	Гр-	Гр-	Гр-		12	
подвижность	+	+	+	12		
флуоресценция	+	+	+	12		
оксидаза	-	-	-		12	
каталаза	+	+	+	12		
аргинингидралаза	-	-	-	6	6	
<b>Гидролиз</b>						
желатина	В	-	-	5	7	
крахмала	-	-	-		12	
<b>Ферментация</b>						
глюкозы	+	+	+	12		
лактозы	-	-	-		12	
сахарозы	+	+	+	10	2	
маннозы	+	+	-	6	6	
сорбита	+	+	-	3	9	
<b>Иные биохимические свойства</b>						
О/Ф тест	О	О	О	12		
липолитическая (твиназная) активность	+	+	+	12		
лецитиназная активность	-	-	-		12	
образование левана	+	+	+	12		
образование индола	-	-	-		12	
образование сероводорода	-	-	-		12	
Тест на мацерацию ткани	-	-	-		12	
Гиперчувствительность	+	+	+	12		
<b>Рост при температуре культивирования</b>						
Рост при 41°C	-	-	-		12	
<b>Рост на МПА в присутствии NaCl</b>						
Рост в МПА с 5% NaCl	-	-	-		12	

Примечание – «+» - положительный результат, «-» - отрицательный результат,

«d» - вариабельный результат, « » - данные отсутствуют.



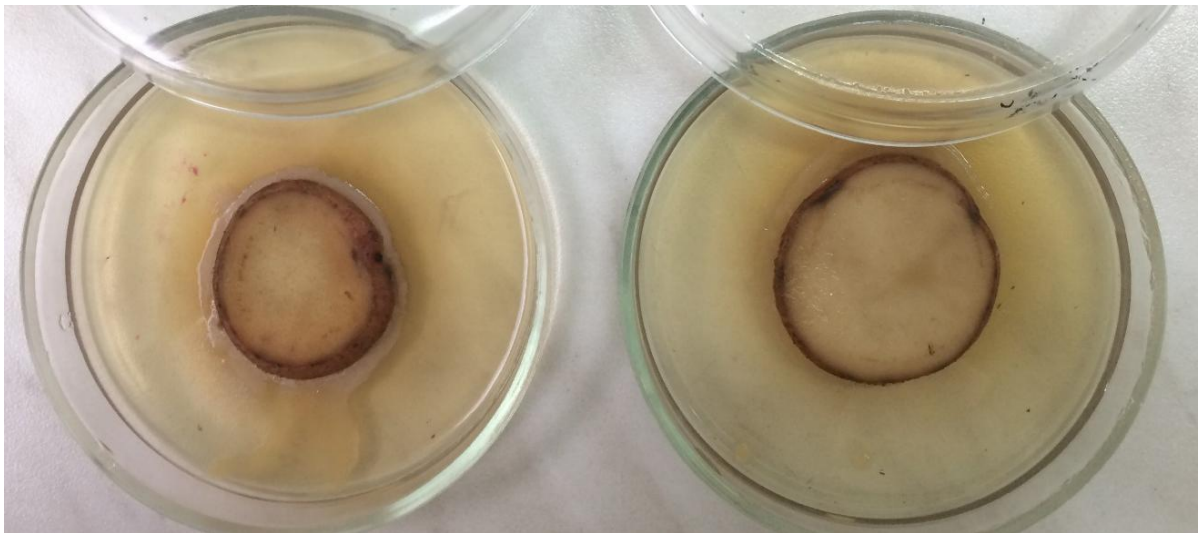


Рисунок 12 – Тест на мацерацию ткани на картофеле время экспозиции 24 часа при 28°С

Из таблицы 2 видно что оба референс штамма показали отрицательную реакцию на оксидазу и аргинингидралазу, являлись каталазоположительными. По многим литературным источникам бактерий *Pseudomonas syringae* гидролизуют желатин вариабельно, по нашим исследованиям оба референс штамма не гидролизовали желатин. Окислительная реакция положительна, то есть бактерий являются аэробами.

Реакция гиперчувствительности ткани была положительна у всех выделенных штаммов, что соответствовало литературным данным. В свою очередь тест на мацерацию растительной ткани показал отрицательный результат.

Как мы видим из представленных в таблице 2 данных, все выделенные штаммы можно охарактеризовать как бактерии вида *Pseudomonas syringae*, несмотря на некоторые вариабельные свойства, такие как гидролиз желатина.

Таким образом, из 134 исследуемых образцов растительной продукции выделено 12 штаммов бактерий *Pseudomonas syringae*.

### 2.2.2.2 Выделение и изучение биологических свойств новых штаммов бактерий вида *Bacillus pumilus*

В качестве пробоподготовки для выделения бактерий *Bacillus pumilus* образец гомогенизировали, далее навеску вносили в стерильный мясо-пептонный бульон в соотношении 1:10, посеvy термостатировали ( $t = 36 \pm 1$  °C)  $20 \pm 4$  часа, для активизации процесса вегетации споровых клеток.

В качестве селективной среды для выделения бактерий использовали *Cereus Selective Agar (MYP-agar)*, способствующий первичной селекции бактерий по устойчивости к полимиксину и дифференциации по манниту.

С учетом биологических свойств *Bacillus pumilus*, отраженных в «Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria», был произведен отбор тестов для идентификации бактерий (окраска по Граму, форма эндоспоры, подвижность и наличие пигмента, возможности роста в аэробных/анаэробных условиях, продукция каталазы (рис. 13), особенности биохимической активности) и составлена схема исследований (рис. 14). Согласно подобранным бактериологическим тестам можно идентифицировать бактерии *Bacillus pumilus* в течение десяти дней.

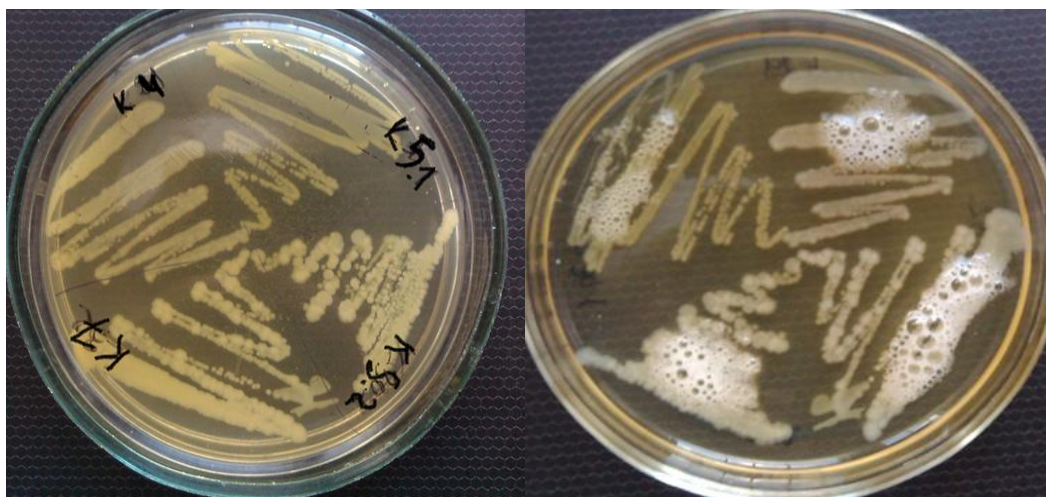


Рисунок 13 – Изучение каталазной активности штаммами *B.pumilus* (24 часа культивирования в термостате при температуре  $36 \pm 1$  °C)

Основной объем исследований начинался с четвертого дня и включал изучение биохимических свойств выделенных культур (рис. 14).



Длительность исследований связана с учетом показателя желатиназной активности.

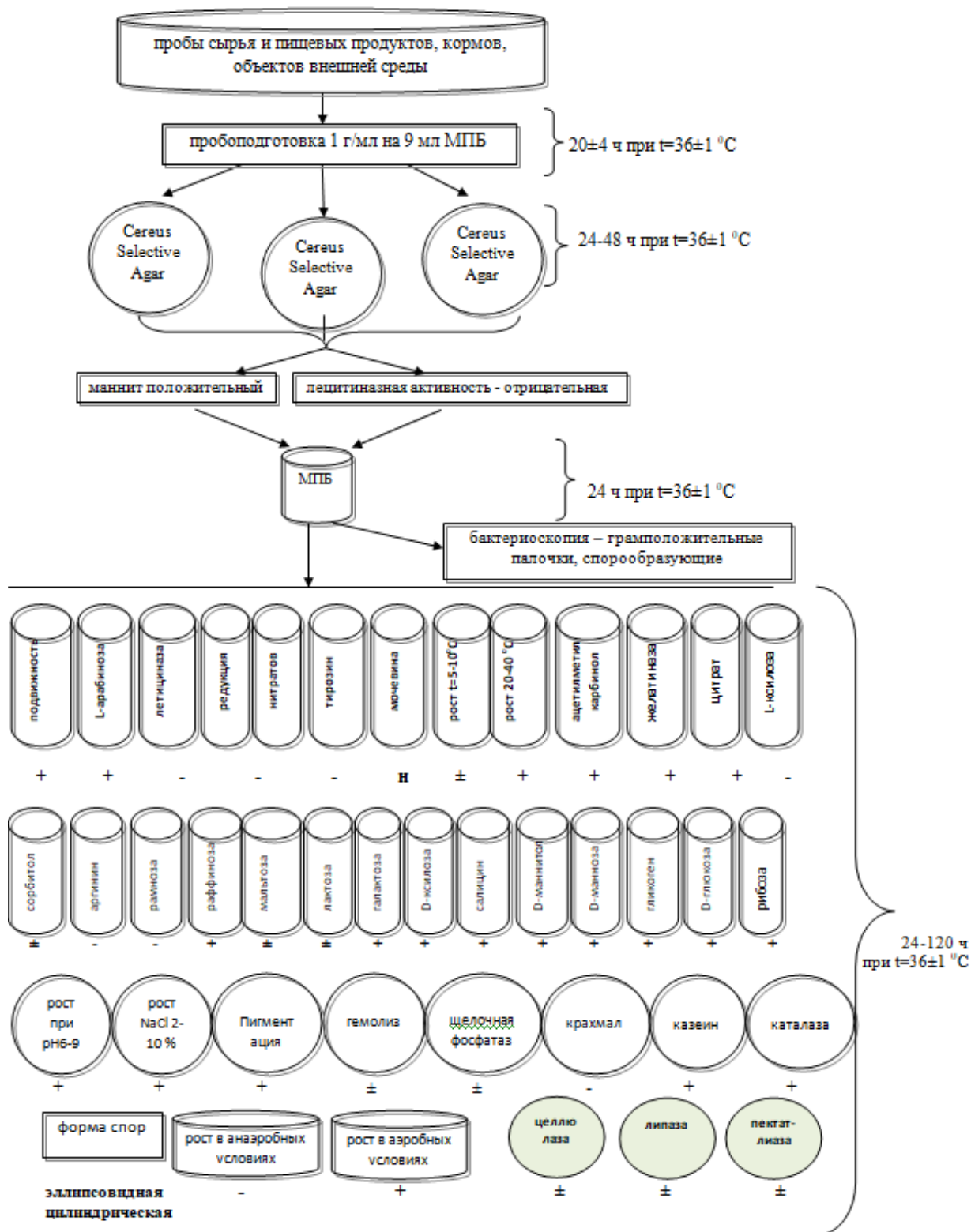


Рисунок 14 – Схема выделения и идентификации бактерий *Bacillus pumilus*, основанная на изучении бактериологических характеристик



Рисунок 15 – Гидролиз крахмала штаммами *B.pumilus* (24 часа культивирования в термостате при температуре  $36\pm 1$  °C)

При изучении физиолого-биохимических свойств бактерий *Bacillus pumilus* целесообразно использовать дополнительные тесты, ориентированные на выявление фитопатогенных свойств: определение продукции пектаттиаз, целлюлозолитической и липолитической активности.

С помощью предложенной схемы выделены 74 штамма бактерии типированные как *Bacillus pumilus*. Экспериментально нами было установлено, что выделенные культуры практически аналогичны по большинству анализируемых показателей (табл. 2).

Для определения целлюлозолитической активности производили посев выделенных культур «медальонами» на поверхность глюкозо-солевой среды с содержанием 0,2 % карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ). Время культивирования посевов – 72-120 часов. По истечении времени инкубирования посевов на поверхность среды на 10 минут наносили 0,1 % водный раствор Конго красного. Далее краситель сливали, а чашки несколько раз промывали 8 % раствором NaCl с целью удаления Конго красного. О продукции целлюлаз свидетельствовали светлые зон вокруг колоний.

Отмечено, что штаммы, изолированные из объектов растительной продукции проявляли повышенную целлюлозолитическую активность, в отличие от штаммов, выделенных из проб почвы.

Для изучения пектолитической активности на поверхность агаризованной, содержащей ионы  $\text{Ca}^{2+}$  питательной среды, наслаивали 4,0 мл 1 % раствора полипектата натрия. После его полимеризации на поверхность образовавшегося геля «медальонами» засеивали выделенные культуры. Продукция пектатлиаз выделенными культурами визуально регистрировалась как разжижение полипектатного геля вокруг колоний бактерий через 72-96 часов культивирования. Продукция пектатлиаз установлена у всех выделенных штаммов *Bacillus pumilus*. Необходимо также отметить, что пектолитическая активность у изолированных штаммов явно регистрировалась только на третьи сутки в виде ореолов вокруг колоний бактерий.

Анализ воздействия неблагоприятных факторов на выделенные бактерии показал, что все изолированные штаммы проявляли способность к росту на МПА, содержащем 10 % р-р NaCl и при понижении температуры культивирования (зафиксирован рост при  $t +10\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

Полученные результаты исследований по изучению биологических свойств выделенных бактерий в основном не критично расходятся с паспортными данными эталонного штамма *Bacillus pumilus* бб, учитывая полиморфизм биохимических свойств бактерий рода *Bacillus*.

Таблица 2 – Сводная таблица с информацией об основных свойствах выделенных штаммов бактерий *Bacillus pumilus*

Характеристика	Данные об основных свойствах бактерий <i>B. pumilus</i> по Bergey	Результаты исследований 74 штаммов, выделенных в экспериментах		
		+	-	±
пигментация	-	4	70	
подвижность	+	74		
диаметр клетки > 1 мкм	-		74	
окраска по Граму	Гр+	Гр+		
форма спор		эллипсоидная		

эллипсовидная цилиндрическая	+	цилиндрическая		
каталаза	+	74		
рост в аэробных условиях	+	74		
<b>Ферментация</b>				
L-арабинозы	+	74		
D-глюкозы	+	74		
гликогена	-		74	
D-маннита	+	74		
D-маннозы	+	74		
салицина	+	74		
D-ксилозы	+	74		
галактозы	+	74		
лактозы	d	63	4	7
мальтозы	d	57	6	11
раффинозы	+	74		
рамнозы	-		74	
сорбитола	d	54	8	12
L-ксилозы	-		74	
<b>Гидролиз</b>				
казеина	+	74		
крахмала	-		74	
тирозина	-		74	
<b>Иные биохимические свойства</b>				
утилизация цитрата	+	74		
гемолитическая активность		12	36	26
желатиназная активность	+	74		
лецитиназная активность	-		74	
щелочная фосфатаза		31	20	23
ацетил-метилкарбинол	+	74		
аргининдегидролаза	-		74	
пектолитическая активность		59	9	16
липолитическая активность		74		
целлюлозолитическая активность		53	21	
<b>Рост на МПА в присутствии NaCl</b>				
10 %	+	74		
<b>Рост на МПА при pH</b>				
9,0	+	74		
<b>Рост при температуре культивирования</b>				
10 <sup>0</sup> С	+	74		

Примечание – «+» - положительный результат, «-» - отрицательный результат,  
«d» - переменный результат, « » - данные отсутствуют.

Таким образом, из 244 проб почвы и растительной продукции выделено 74 штамма, которые были отнесены виду *Bacillus pumilus*.

Сформированная коллекция полевых штаммов бактерий *Bacillus pumilus* в дальнейшем использовалась в качестве панели индикаторных штаммов при выделении специфических бактериофагов.

### 2.2.2.3 Выделение и изучение биологических свойств новых штаммов бактерий вида *Listeria monocytogenes*

Для исследований были отобраны 290 образцов объектов окружающей среды, включая воду открытых водоемов, сточные воды, корма животного и растительного происхождения, растительную продукцию.

Выделение и идентификацию *Listeria monocytogenes* проводили в соответствии с ГОСТ 32031-2012 Продукты пищевые. Методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* по схеме, представленной на рисунке 16.

Пробы в соотношении 1:10 засеивали на бульон Фрейзера. По истечении 24 часов культивирования в термостате при 37°C штаммы согласно плану исследований пересеивали параллельно на агар ALOA и Oxford агар. По истечении 24 часов рост культур контролировался на наличие характерных для листерий колоний. Окончательные результаты были получены спустя 48 часа (рис. 17-18). Характерные для листерий колонии пересеивали на МПА для получения чистых культур. Посевы культивировали в условиях термостата 24 часа при 37°C, после чего с выросших колоний готовили мазки и окрашивали по Граму параллельно проводили посев колоний в полужидкий агар для определения подвижности и каталазой активности (табл. 3).

Применение теста Singlepath® L.'mono для подтверждения *L. monocytogenes* на этапах вторичного обогащения или посева на плотные питательные среды позволяло сократить протокол выделения и идентификации (рис. 19). Результаты изучения биологических свойств выделенных штаммов *L. monocytogenes* представлены в таблице 3.

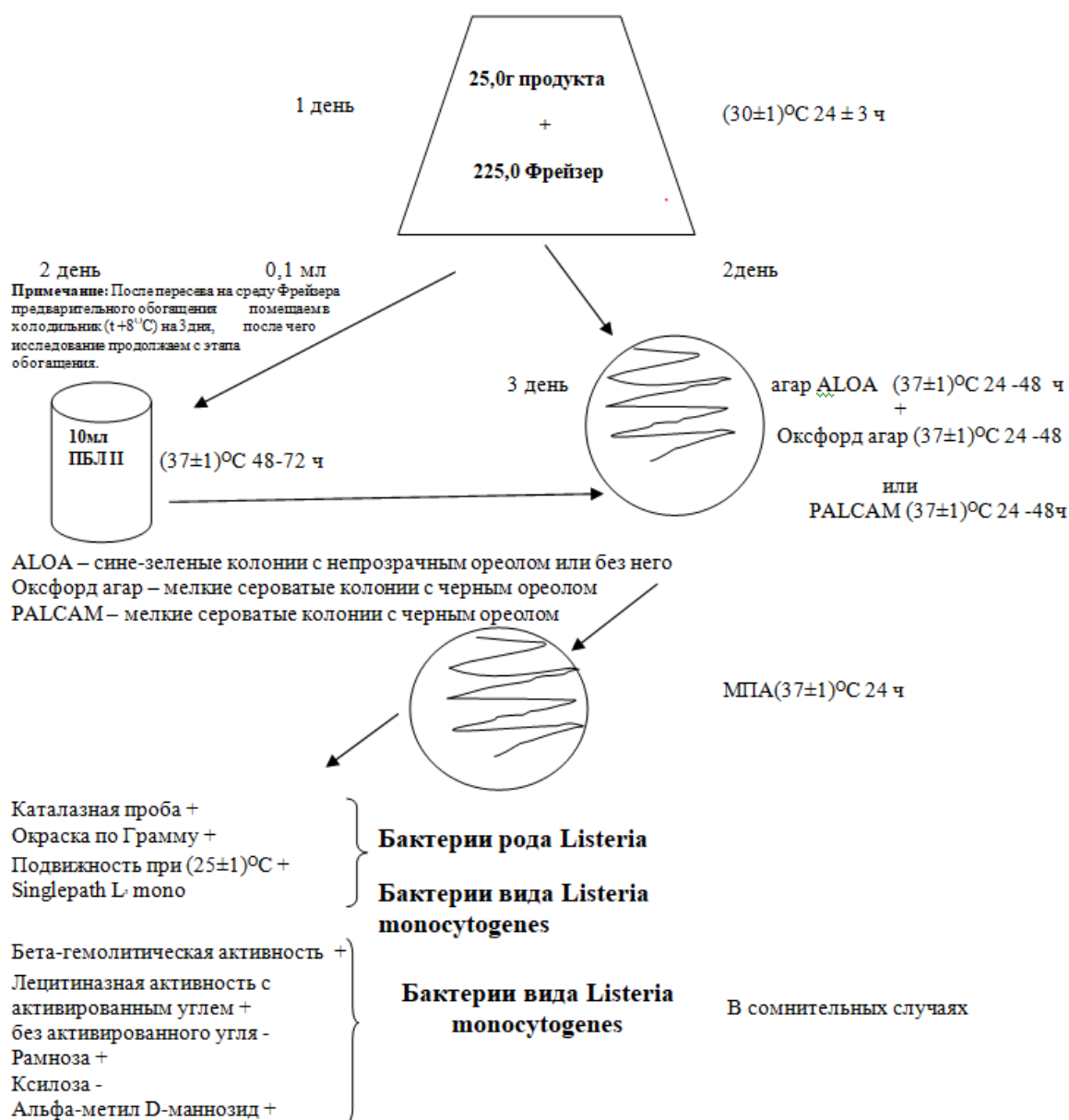


Рисунок 16 – Схема выделения и идентификации бактерий вида *Listeria monocytogenes*

Таким образом, из 290 проб объектов окружающей среды (вода открытых водоемов, сточные воды, корма животного и растительного происхождения, растительная продукция) выделено 16 штаммов бактерий вида *Listeria monocytogenes*.





Рисунок 17 – Выделение *L. monocytogenes* на агаре ALOA

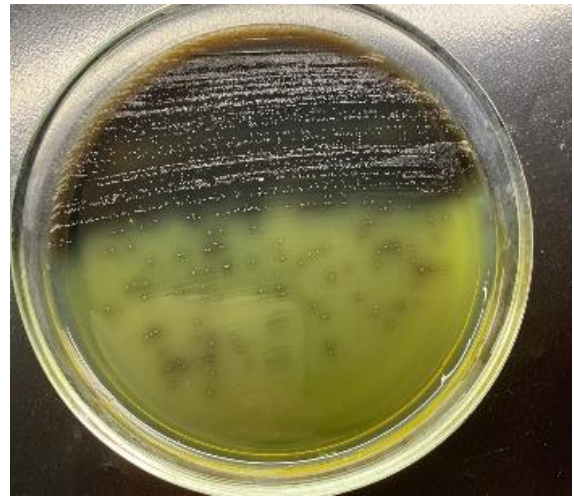


Рисунок 18 - Выделение *L. monocytogenes* на Oxford агаре



Рисунок 19 - Тест Singlepath® L.'mono для подтверждения *L. monocytogenes* 758

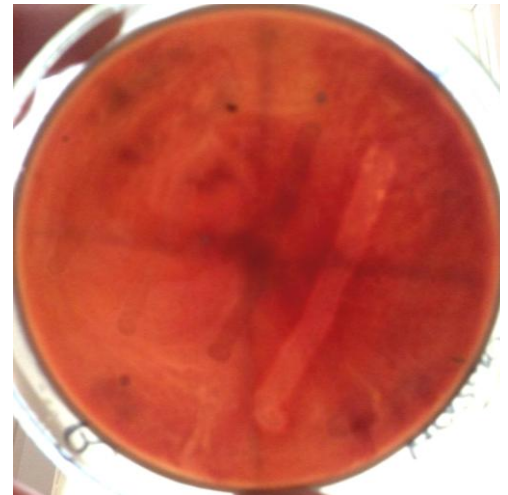


Рисунок 20 - CAMP-тест (*S.aureus*) с выделенным штаммом *L. monocytogenes* 758

Сформированная коллекция полевых штаммов бактерий *Listeria monocytogenes* в дальнейшем использовалась в качестве панели штаммов определения спектра литической активности листериозных бактериофагов.

Таблица 4 – Сводная таблица с информацией об основных свойствах бактерий вида *Listeria monocytogenes*

Характеристика	Данные об основных свойствах бактерий <i>Listeria monocytogenes</i> по Bergey	Результаты исследований 16 штаммов, выделенных в экспериментах		
		+	-	±
Подвижность при 25°C	+	16		
Подвижность при 37°C	-		16	
окраска по Граму	Гр+	Гр+		
каталаза	+	16		
оксидаза	-		16	
САМР-тест <i>S.aureus</i>	+	16		
САМР-тест <i>R equi</i>	-		16	
<b>Ферментация</b>				
L-рамноза	+	16		
α-метил-D-маннозида	+	16		
маннитола	-		16	
D-ксилозы	+		16	
лактозы	-		16	
глюкозы	+	16		
дульцита	-		16	
сахарозы	-		16	
<b>Гидролиз</b>				
гипшурат	+	16		
крахмала	-		16	
<b>Иные биохимические свойства</b>				
восстановление нитрата	+		16	
β-гемолитическая активность	+	16		
лецитиназная активность с углем	+	16		
лецитиназная активность без угля	-		16	

Примечание – «+» - положительный результат, «-» - отрицательный результат, «d» - вариабельный результат, « » - данные отсутствуют.



#### 2.2.2.4 Выделение и изучение биологических свойств новых штаммов бактерий вида *Yersinia enterocolitica*

Проанализированно 272 образцов объектов окружающей среды, воды, молочной, мясной и растительной продукции.

Выделение и идентификацию *Yersinia enterocolitica* проводили согласно схеме, представленной на рисунке 21.

В качестве пробоподготовки отобранные образцы воды, продуктов животного и растительного происхождения измельчали при необходимости и вносили в колбы с селективным бульоном для иерсиний, закрывали и тщательно встряхивали в течение 15 минут. После чего инкубировали колбы при температуре  $28 \pm 1$  °C в течении 24 часов.

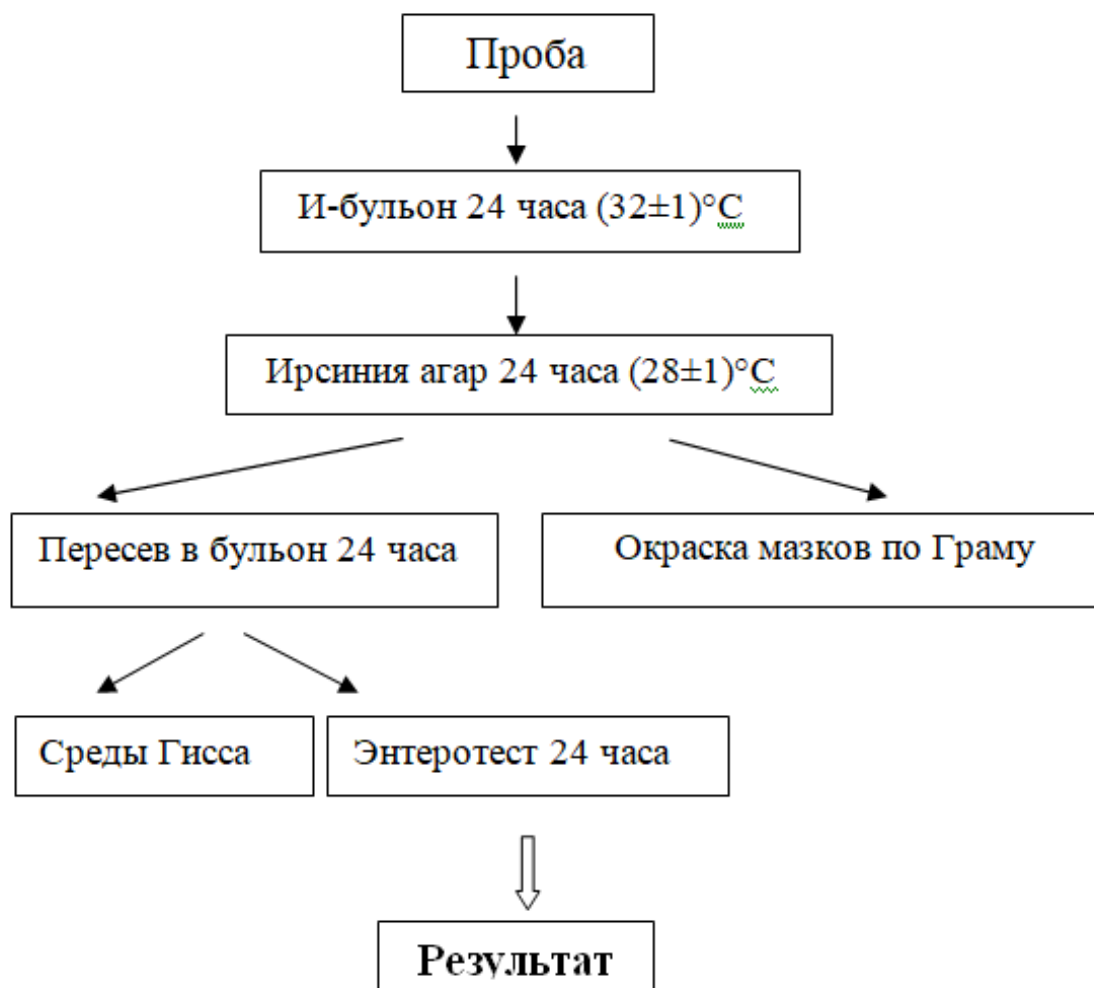


Рисунок 21 – Схема выделения и идентификации *Y. enterocolitica*

По истечении времени пробы засеивали на селективный агар для иерсиний (агара CIN) инкубировали 24 часа при температуре 32 ° С. Через сутки при положительном результате наблюдали рост прозрачных с малиновым центром колоний. Результаты представлены на рисунке 22.

Далее типичные для *Yersinia enterocolitica* колонии с Ирсиния агара окрашивали по Граму. Полученные суточные бульонные культуры использовали для дальнейшего изучения морфологических, тинкториальных и биохимических свойств.

Культуры в мазках, окрашенных по Грамму, были представлены грамотрицательными палочками. Для изучения биохимических свойств использовали набор Энтеротест 24 (рис. 23). Результаты изучения основных биологических свойств выделенных штаммов представлены в таблице 4.



Рисунок 22 – Колонии *Yersinia enterocolitica* на селективном агаре для иерсиний  
Рисунок 23 – Пример результатов ЭНТЕРОтеста24

Таким образом, из 272 проб объектов окружающей среды и пищевых продуктов (вода открытых водоемов, сточные воды, молочная, мясная, растительная продукция) выделено 33 штамма бактерий вида *Yersinia enterocolitica*.

Таблица 4 – Сводная таблица с информацией об основных свойствах бактерий *Yersinia enterocolitica*

Характеристика	Данные об основных свойствах <i>Yersinia enterocolitica</i> по Bergey	Результаты исследований 33 штаммов, выделенных в экспериментах		
		+	-	±
подвижность	+	33		
окраска по Граму	Гр-		Гр-	
Реакция Фогеса-Проскауэра	+	33		
Ферментация				
маллоната	-		33	
салицина	d	17	3	13
сорбитола	+	33		
мелибиозы	-		33	
целлобиозы	d	33		
лактозы	-		33	
трегалозы	+	33		
маннитола	+	33		
дульцита	-		33	
адонитола	-		33	
арабитола	d	28		5
сахарозы	+	33		
инозитола	d		33	
раффинозы	-		33	
эскулина	d	15	18	
β - глюкорунидазы	-		33	
β - галактозидазы	+	33		
β - ксилоксидазы	-		33	
Гидролиз				
желатина			33	
Иные биохимические свойства				
утилизация цитрата	-		33	
образование индола	d	21	12	
образование сероводорода	-		33	
уреаза	d	33		
лизиндекарбоксилаза	-		33	
орнитиндекарбаксилаза	+	33		
аргининдегидролаза	-		33	
липолитическая активность	d	19	14	

Примечание – «+» - положительный результат, «-» - отрицательный результат, «d» - переменный результат, « » - данные отсутствуют.

Сформированная коллекция полевых штаммов бактерий *Yersinia enterocolitica* в дальнейшем использовалась в качестве панели штаммов при определении спектра литической активности иерсиниозных бактериофагов.

#### 2.2.2.5 Выделение и изучение биологических свойств новых штаммов бактерий вида *Bacillus cereus*

При выделении бактерий вида *Bacillus cereus* пробоподготовка осуществлялась следующим образом: объект исследований твердой консистенции гомогенизировали, далее 1 г вносили в пробирку с 9 мл МПБ и ставили в термостат ( $t = 36 \pm 1$  °C) на  $20 \pm 4$  часа для подращивания. Объекты исследований жидкой консистенции в объеме 1 мл вносили с пробирки с 9 мл МПБ и термостатировали при выше обозначенных параметрах. Этап подращивания вводился нами с целью перевода спорных клеток в вегетативное состояние.

В качестве селективной среды использовали Cereus Selective Agar (МҮР-агар). Бактерии *Bacillus cereus* образуют на МҮР-агар сухие шершавые колонии с красным или розовым основанием, окруженные кольцом плотного преципитата (рис. 24). Колонии, окруженные желтой или прозрачной зоной, не принадлежат к *Bacillus cereus*.



Рисунок 24 - Бактерии *Bacillus cereus* 8035 на среде Моссея (МҮР-агар) (18 часов культивирования в термостате при температуре  $36 \pm 1$  °C)

Дальнейшую идентификацию штаммов проводили по схеме предложенной на рисунке 25.

Для изучения каждого образца брали по 3 чашки с МҮР-агаром и вносили в каждую по 0,1 мл суспензии, которую распределяли по поверхности среды, не касаясь сторон чашки шпателем. Затем оставляли чашки на 15 минут с закрытыми крышками при комнатной температуре для впитывания суспензии. По истечении времени чашки переворачивали и инкубировали в течение 24 часов при температуре  $36\pm 1$  °С. Первый учет результатов проводили через сутки, второй – через двое суток.

При наличии на чашках презумптивных колоний *B. cereus* размерами  $0,8\pm 0,3$  см, розового цвета с зоной преципитата отбирали их для получения чистых культур и окрашивали по Граму.

Грамположительные споровые бактерии засеивали на МПБ. После  $7\pm 1$  часов при температуре  $36\pm 1$  °С производили высев на среду Кларка (для постановки реакции Фогес-Проскауера) и селективную дифференциально-диагностическую среду с фенолфталеинфосфатом натрия для выделения возбудителя сибирской язвы и близкородственных бацилл группы «*Bacillus cereus*». Все посеы помещали в термостате при температуре  $36\pm 1$  °С на  $22\pm 2$  часа (рис. 26).

У выделенных культур изучали факторы патогенности в опытах *in vitro* (гемолитическую активность: исследуемую культуру засеивали в чашки Петри с 5%-м кровяным агаром, посеы инкубировали при  $36\pm 1$  °С в течение 24 ч (рис. 27); наличие продукции фермента желатиназы, посеы инкубировали при  $36\pm 1$  °С в течение 6 суток; лецитиназная активность определяется по наличию кольца преципитата по МҮР–агаре и МПБ с яичным желтком).

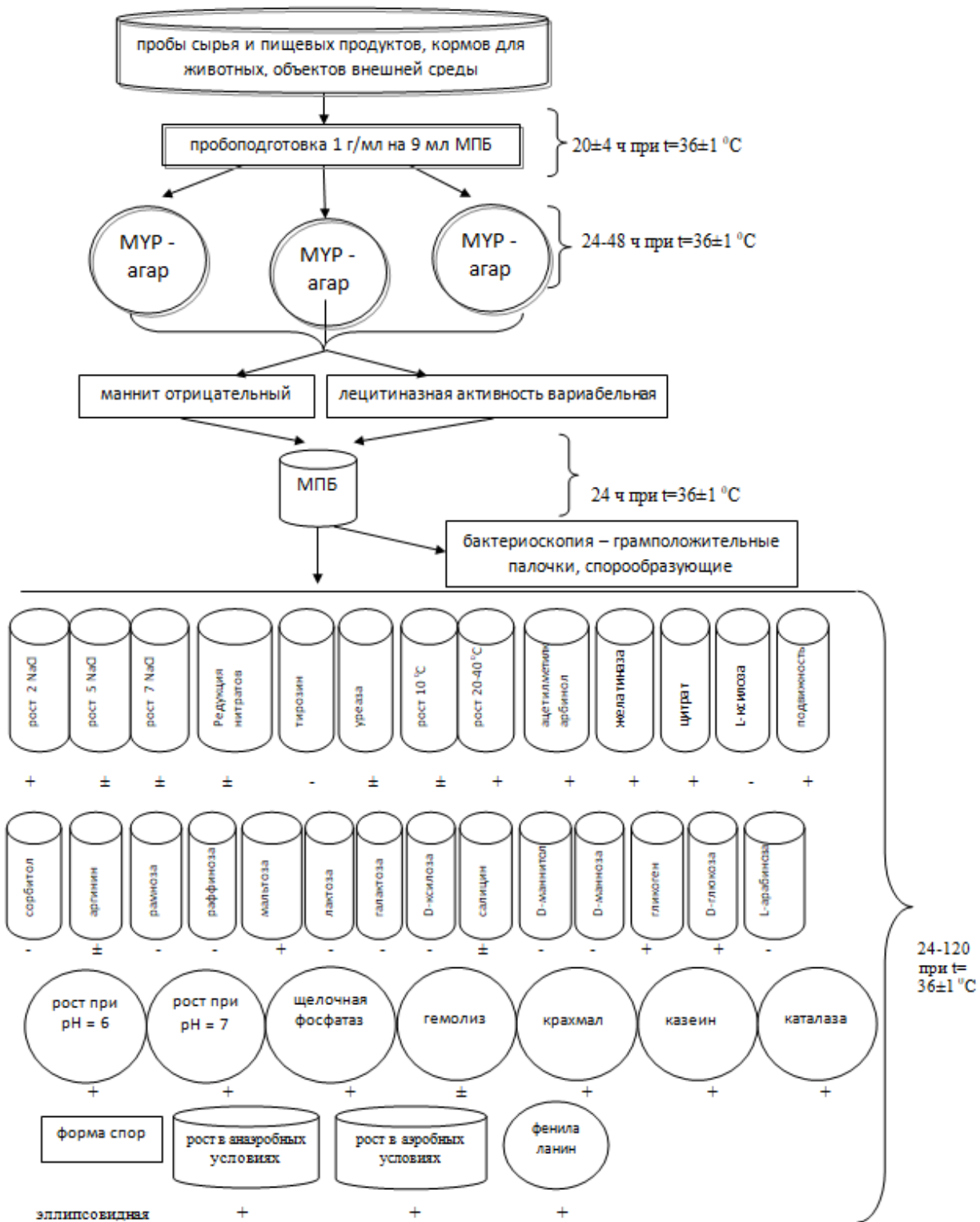


Рисунок 25 - Схема выделения и бактериологической идентификации *Bacillus cereus*, составленная на основании полученных результатов исследований





А

Б

Рисунок 26 – Бактерии *Bacillus cereus* 252 на дифференциально-диагностической среде для выявления и культивирования сибиреязвенного микроба (24 часа культивирования в термостате при температуре  $36\pm 1$  °С): А до воздействия колонии бактерий парами аммиака; Б - воздействия колонии бактерий парами аммиака

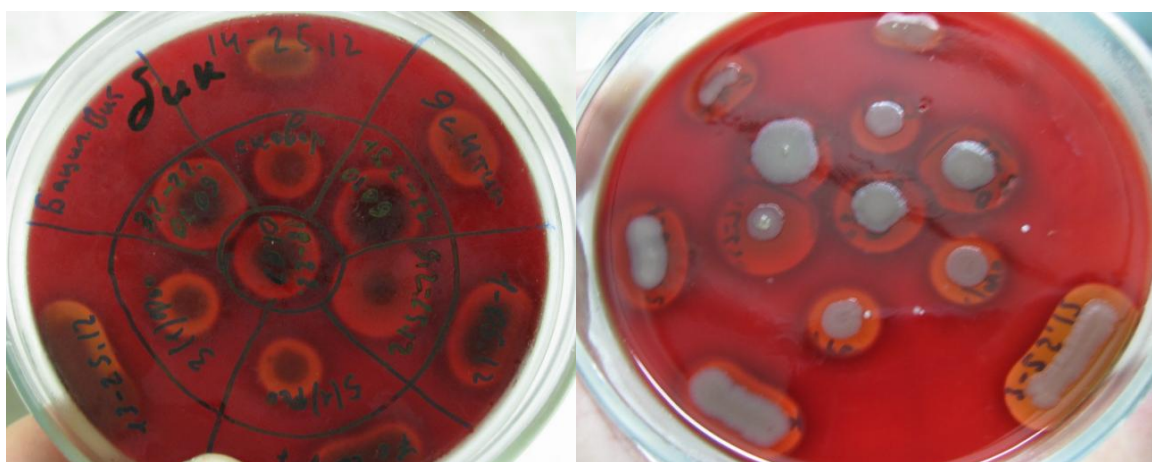


Рисунок 27 – Определение способности к гемолизу эритроцитов барана полевыми штаммами *Bacillus cereus* (24 часа культивирования в термостате при температуре  $36\pm 1$  °С)

Бактериальные штаммы также проверяли на способность роста при рН в диапазоне 6,0-7,0; выявляли температурный минимум и максимум вегетативных форм, выявляли возможность роста на среде с 2-7 % содержанием хлорида натрия.

Форма спор оценивалась в мазках, окрашенных по методу Трухильо, приготовленных из бактериальных штаммов, которые выращивали на пептонно-кукурузном агаре. Форма, характер расположения спор в клетке – признаки, используемые для группового и видового разграничения бацилл.

Ферментативная активность регистрировалась по изменению цвета засеянных изучаемой культурой питательных сред с сахарами и индикаторами: L-арабинозой, D-глюкозой, D-маннитолом, D-маннозой, салицином, D-ксилозой, галактозой, лактозой, мальтозой, раффинозой, рамнозой, сорбитолом, L-ксилозой и индикаторами. Результаты всех проведенных исследований отражены в таблице 5. Полученные результаты исследований по изучению некоторых биологических свойств выделенных нами бактерий в основном не расходятся с паспортными данными референс-штаммов – *Bacillus cereus* 8035, *Bacillus cereus* 2527, *Bacillus cereus* ATCC 14579 (музей бактериальных культур кафедры МВЭ и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ).

Таблица 5 - Сводная таблица с информацией об основных свойствах выделенных штаммов бактерий *Bacillus cereus*

Характеристика	Данные об основных свойствах бактерий <i>B. cereus</i> по Bergey	Результаты исследований 82 штаммов, выделенных в экспериментах		
		+	-	±
пигментация	-		82	
подвижность	+	82		
диаметр клетки > 1 мкм	+	82		
окраска по Граму	Гр+	Гр+		
форма спор	эллипсоидная	эллипсоидная		
каталаза	+	82		
рост в анаэробных условиях	+	82		
рост в аэробных условиях	+	82		
Ферментация				
L-арабинозы	-		82	
D-глюкозы	+	82		
гликогена	+	82		
D-маннитола	-		82	
D-маннозы	-		82	
салицина	d	78	4	
D-ксилозы	-		82	



галактозы	-		82	
лактозы	-		82	
мальтозы	+	82		
раффинозы	-		82	
рамнозы	-		82	
сорбитола	-		82	
L-ксилозы	-		82	
Гидролиз				
казеина	+	82		
крахмала	+	82		
тирозина	-		82	
мочевины	d	57	22	3
Утилизация				
цитрата	+	82		
гемолитическая активность	±	82		
желатиназная активность	+	82		
лецитиназная активность	+	82		
щелочная фосфатаза	+	82		
ацетил-метилкарбинол	+	82		
аргининдегидролаза	d		82	
редукция нитратов до нитритов	d	82		
Рост на МПА в присутствии NaCl				
2 %	+	82		
5 %	+	82		
7 %	d			82
Рост на МПА при pH				
6,0	+	82		
7,0	+	82		
Рост при температуре культивирования				
5 °С	-		82	
10 °С	d	5	77	
20 °С	+	82		
30 °С	+	82		
40 °С	+	82		

Примечание – «+» - положительный результат, «-» - отрицательный результат, «d» - вариабельный результат, « » - данные отсутствуют.

Таким образом, из 473 проб почвы, воды, кормов растительного и животного происхождения, молочной, мясной и растительной продукции выделено 82 штамма, которые были отнесены к виду *Bacillus cereus*.

Сформированная коллекция полевых штаммов бактерий *Bacillus cereus* в дальнейшем использовалась в качестве панели индикаторных штаммов при выделении специфических бактериофагов.

### 2.2.2.6 Арел и степень распространения изучаемых бактерий

В ходе проведенного исследования проанализировано 473 проб почвы, воды, кормов растительного и животного происхождения, молочной, мясной и растительной продукции. Результаты изучения ареала и степени распространения изучаемых бактерий в отобранных пробах объектов внешней среды представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Арел и степень распространения изучаемых бактерий в отобранных пробах объектов внешней среды

№ п/п	Источники выделения	Количество образцов	Количество выделенных штаммов				
			<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>
1	Почва	110	31	28	-	-	-
2	Вода открытых водоемов, сточные воды	65	16	-	-	6	11
3	Корма растительного происхождения	38	7	-	-	2	-
4	Корма животного происхождения	53	2	-	-	3	-
5	Молоко и молочная продукция	47	6	-	-	-	5
6	Мясо и мясная продукция	26	3	-	-	-	3
7	Растительная продукция (томаты, огурцы, цуккини, картофель, салаты, злаковые, бобовые, специи)	134	17	46	12	5	14
Итого:		473	82	74	12	16	33

Выделено и идентифицировано 217 штаммов искомым бактерий, включая *Pseudomonas syringae* – 12, *Bacillus pumilus* – 74, *Bacillus cereus* – 82, *Listeria monocytogenes* – 16, *Yersinia enterocolitica* – 33. Получены данные о степени распространения искомым бактерий в объектах внешней

среды. Установлено, что совокупный процент контаминации растительной продукции (томаты, огурцы, цуккини, картофель, салаты, злаковые, бобовые, специи) составил 70%.

Бактерии вида *Pseudomonas syringae* выделялись в 9,7% исследуемых проб растительной продукции. Процент выделения бактерий видов *Bacillus pumilus* из образцов почвы и растительной продукции составил 30%. В 5,5% из проб объектов окружающей среды (вода открытых водоемов, сточные воды, корма животного и растительного происхождения, растительная продукция) обнаруживались бактерии вида *Listeria monocytogenes*. Процент выявления *Yersinia enterocolitica* из 272 проб объектов окружающей среды и пищевых продуктов (вода открытых водоемов, сточные воды, молочная, мясная, растительная продукция) составил 12,1%. Для выделения бактерий вида *Bacillus cereus* использовали пробы почвы, воды, кормов растительного и животного происхождения, молочной, мясной и растительной продукции. Искомые бактерии выявлялись в 17,3% из обозначенных 473 проб.

## **2.2.2. Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов, активных в отношении бактерий *Pseudomonas syringae*, *Bacillus pumilus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus***

При выборе индикаторных культур для выделения вирулентных бактериофагов устанавливалось отсутствие у бактериального штамма способности к продукции свободного фага и к продукции профага под воздействием индуцирующих факторов (ультрафиолетовые лучи, митомицин С в дозе 0,5 мкг/мл).

### **2.2.2.1 Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов активных в отношении *Pseudomonas syringae***

Выделение бактериофагов, активных в отношении бактерий *Pseudomonas syringae* проводили с использованием всех имеющихся штаммов бактерий, как коллекционных, так и выделенных из объектов окружающей среды.

Выделение бактериофагов из объектов внешней среды проводили путем суспендирования 10 г исследуемого материала, в качестве которого использовались образцы почвы и/или среза растений с признаками сосудистого бактериоза, в 50 мл МПБ. Затем в получившуюся суспензию добавляли по 2 мл 24-часовых культур бактерий *Pseudomonas syringae* и культивировали при 28 °С в течении суток.

Очищали исследуемый субстрат от механических примесей путем фильтрования через ватный фильтр, разливали в центрифужные пробирки и центрифугировали при 3000 об в течении 30 мин. После отбирали надосадочную жидкость и очищали путем фильтрации через мембранные фильтры с величиной пор 0,22 мкм. Полученные суспензии исследовали на наличие в них бактериофагов методом «стекающая капля». Для этого на поверхность МПА наносили несколько капель изучаемой культуры бактерий *Pseudomonas syringae*, далее стерильным шпателем растирали капли по поверхности среды и термостатировали при 28 °С в течении 20-30 минут с

целью подсушивания «газона». Затем наносили каплю исследуемого фильтрата на поверхность среды и наклоняли чашку Петри. После чего чашки термостатировали при 28 °С в течении 48 часов.

По результатам выделения проводили селекцию бактериофагов с целью повышения их литической активности путем десятикратного пассирования бактериофага на индикаторных культурах бактерий *Pseudomonas syringae*.

Пассирование бактериофагов проводили по следующей схеме: в пробирку с 4,5 мл жидкой питательной среды МПБ вносили 0,2 мл исследуемого бактериофага и 0,2 мл восприимчивой культуры бактерий *Pseudomonas syringae*. После проводили инкубирование посевов в течение 24 часов при температуре 28 °С. По истечению заданного времени содержимое пробирок с бактериофагом фильтровали с применением мембранных фильтров фирмы Millipore (0,22 мкм). Далее проводили очередной пассаж путем внесения 0,2 мл полученного фильтрата и 0,2 мл свежей культуры бактерий *Pseudomonas syringae* в пробирку, содержащую 4,5 мл МПБ. В качестве контроля служила пробирка с 4,5 мл МПБ, к которой добавили 0,2 мл восприимчивой культуры бактерий и 0,2 мл стерильной питательной среды вместо исследуемого бактериофага. Характеристика выделенных бактериофагов представлена в таблице 7.

Всего по итогам проведенных работ из объектов окружающей среды было выделено 7 штаммов бактериофагов, активных в отношении *Pseudomonas syringae*.

Морфологию негативных колоний изучали на плотных питательных средах для дифференциации их на умеренные и вирулентные. Экспериментальным путем было установлено, что выделенные бактериофаги бактерий *Pseudomonas syringae* на МПА формировали округлые колонии с зонами вторичного роста по внешней стороне и прозрачными центрами, диаметр колоний колебался от 0,5 до 3,0 мм в зависимости от начального титра (рис. 28).

Таблица 7 - Характеристика объектов исследований для выделения бактериофагов

№	Название бактериофага	Индикаторная культура	Наименование объекта выделения	Местонахождение объекта выделения
1	1ф УлГАУ	Pss3	Листья огурца	Ульяновская область (РФ Чердаклинский район)
2	2ф УлГАУ	Pss3	Листья огурца	Ульяновская область (РФ Чердаклинский район)
3	3ф УлГАУ	Pss3	Почва	Ульяновская область (РФ Чердаклинский район)
4	4ф УлГАУ	Pss3	Почва	Ульяновская область (РФ Старомайнский район)
5	5ф УлГАУ	Pss3	Почва	Ульяновская область (РФ Старомайнский район)
6	6ф УлГАУ	Pss3	Почва	Ульяновская область (РФ Старомайнский район)
7	7ф УлГАУ	Pss3	Почва </td <td>Ульяновская область (РФ Чердаклинский район)</td>	Ульяновская область (РФ Чердаклинский район)

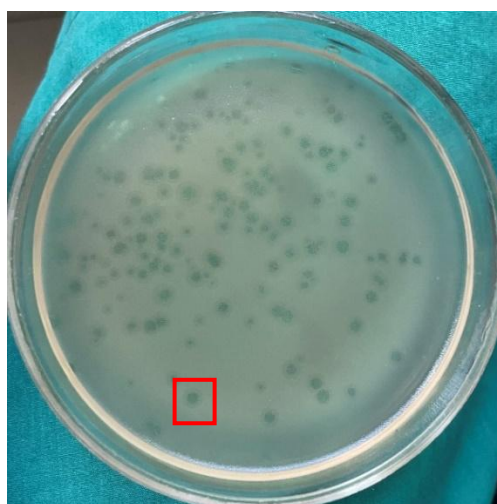


Рисунок 28 – Морфология негативных колоний бактериофагов *Pseudomonas syringae* 2ф-УлГАУ

Литическую активность выделенных бактериофагов изучали по методу Аппельмана и Грация. С целью получения достоверных результатов каждый эксперимент проводили троекратно. Индикаторную культуру бактерий *Pseudomonas syringae* Pss3, выращивали на МПБ в течение 24 часов. Учет результатов проводили спустя 24 часа культивирования посевов в термостате

при 28 °С. Результаты проведенных исследований представлены на рисунках 29 и 30.



Рисунок 29 – Определение литической активности методом Грация бактериофага 7ф-УлГАУ,  $10^7$  КОЕ/мл

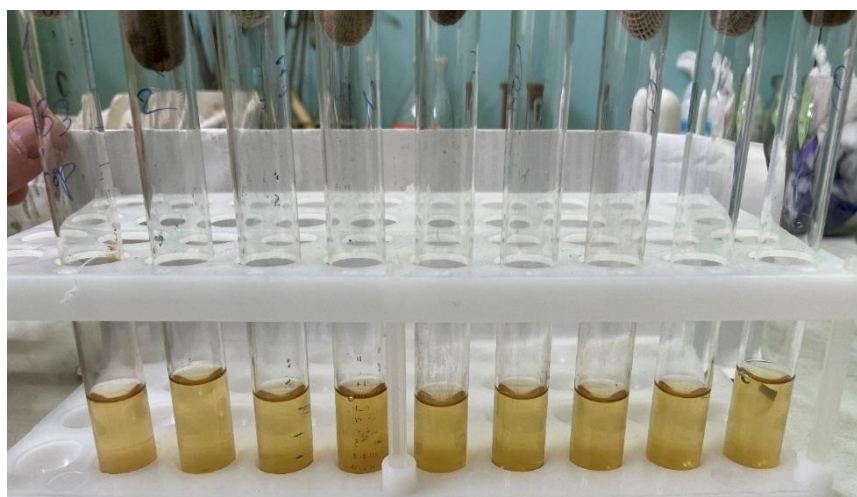


Рисунок 30 – Определение титр бактериофага 7ф-УлГАУ по Аппельману,  $10^7$  КОЕ/мл, индикаторная культура *Pseudomonas syringae* Pss3

Селекционированные бактериофаги проявляли различную литическую активность, что отражено в таблице 8.

Литическая активность изучаемых бактериофагов бактерий *Pseudomonas syringae* составила по Аппельману от  $10^6$  до  $10^9$ ; по Грация от  $1,0 \pm 0,1 \times 10^7$  до  $1,0 \pm 0,1 \times 10^9$  (БОЕ/мл).

Таблица 8 - Литическая активность бактериофага, КОЕ/мл

№	Наименования фага	Литическая активность	
		по Аппельману	по Грация
1	1ф-УлГАУ	$10^{-7}$	$2,0 \pm 0,1 \times 10^8$
2	2ф-УлГАУ	$10^{-8}$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^8$
3	3ф-УлГАУ	$10^{-6}$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^7$
4	4ф-УлГАУ	$10^{-7}$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^7$
5	5ф-УлГАУ	$10^{-8}$	$3,0 \pm 0,1 \times 10^8$
6	6ф-УлГАУ	$10^{-7}$	$2,0 \pm 0,1 \times 10^7$
7	7ф-УлГАУ	$10^{-9}$	$1,0 \pm 0,1 \times 10^9$

Изучение спектра литического действия выделенных бактериофагов проводили с использованием 14 штаммов бактерий *Pseudomonas syringae*, выделенных нами из образцов почвы и пораженных растений, а также полученных из музея кафедры. Исследования проводили нанесением исследуемого бактериофага на газоны бактериальных культур методом спот-теста.

Эксперименты показали, что изученные фаги характеризуются различными диапазонами литической активности по отношению к изучаемым культурам бактерий. Наибольший спектр литического действия обладал бактериофаг 7ф-УлГАУ, который лизировал все используемые в работе штаммы бактерий (табл. 9).

Изучение специфичности проводили методом «стекающей капли», для чего на заранее подготовленные чашки Петри с МПА наносили газон следующих видов бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Pectobacterium carotovorum*, *Xanthomonas campestris*, *Saimonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Echerichia coli*, *Proteus vulgaris*. Газон культур подсушивали в термостате в течение 15-20 минут при 28 °С. Далее чашки Петри с газоном условно делили на сектора. На опытный сектор наносили несколько капель исследуемого бактериофага *Pseudomonas syringae*, на контрольный – несколько капель стерильного МПБ.



Посевы инкубировали в течение 24 часов при 28 °С. Полученные результаты представлены в таблице 10.

Таблица 9 - Спектр литического действия выделенных бактериофагов

Название бактериофага	Штаммы бактерий <i>Pseudomonas syringae</i>														% лизируемых культур
	Pss1	Pss2	Pss3	Pss4	Pss5	Pss6	Pss7	Pss8	Pss9	Pss10	Pss11	Pss12	Ps.s.-3-УГСХА	B-10917	
1ф-УлГАУ	л	л	л	л	л	л	л	нл	л	л	нл	л	л	л	85,7
2ф-УлГАУ	л	л	л	л	л	л	л	л	нл	л	л	л	л	нл	85,7
3ф-УлГАУ	л	л	л	л	л	л	л	нл	л	нл	нл	л	л	л	78,5
4ф-УлГАУ	л	л	л	л	нл	л	л	нл	л	нл	нл	л	л	л	71,4
5ф-УлГАУ	л	л	л	л	л	л	л	л	нл	л	л	л	л	нл	85,7
6ф-УлГАУ	л	л	л	л	нл	нл	л	нл	л	нл	л	л	л	л	71,4
7ф-УлГАУ	л	л	л	л	л	л	л	л	л	л	л	л	л	л	100

Примечание: л – лизис культуры бактерий, нл – отсутствие лизиса

Эксперименты по определению специфичности всех восьми бактериофагов показали, что все исследуемые бактериофаги строго специфичны по отношению к бактериям вида *Pseudomonas syringae*.

Изучение устойчивости индикаторных культур *Pseudomonas syringae* и селекционированных бактериофагов к воздействию температуры в диапазоне от +50 до +80 °С в течение 30 минут и трихлорметану в соотношении 1:10 в течение 5-40 минут показало, что все изучаемые изоляты фагов имеют умеренную устойчивость к воздействию температурного фактора и устойчивы к трихлорметану.

Таблица 10 - Специфичность бактериофагов *Pseudomonas syringae*

Бактериофаг	1ф-УлГАУ	2ф-УлГАУ	3ф-УлГАУ	4ф-УлГАУ	5ф-УлГАУ	6ф-УлГАУ	7ф-УлГАУ
Культура							
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл
<i>Pseudomonas putida</i>	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл
<i>Xanthomonas campestris</i>	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл
<i>Saimonella enteritidis</i>	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл
<i>Salmonella typhimurium</i>	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл
<i>Yersinia enterocolitica</i>	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл
<i>Echerichia coli</i>	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл
<i>Proteus vulgaris</i>	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл

Примечание: «л» - зона лизиса, «нл» - отсутствие зоны лизиса

Для дальнейших работ, посвященных конструированию фагового биопрепарата, было принято решение использовать бактериофаг 7ф-УлГАУ, как обладающий наиболее высокими показателями литической активности и спектра литического действия. Отметим, что полученные результаты в дальнейшем могут быть транслированы и на другие штаммы выделенных бактериофагов при необходимости введения их в состав разрабатываемого биопрепарата.

#### 2.2.2.2 Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов активных в отношении *Bacillus pumilus*

Наиболее эффективно в качестве источника выделения бактериофагов бактерий рода *Bacillus*, использовать пробы почвы, так как они являются почвенными сапрофитами. При исследовании 88 проб почвы различного

хозяйственного назначения различных регионов Приволжского федерального округа, удалось выделить 4 изолята фагов бактерий *Bacillus pumilus*. Результаты исследований представлены в таблице 11. Изоляты фагов на газоне индикаторной культуры образовывали зону лизиса (рисунок 31), с которой делался смыв стерильным МПБ, далее он центрифугировался и использовался после очистки в качестве маточного фага для первого пассажа.

Таблица 11 - Характеристика объектов выделения бактериофагов

№	Название бактериофага	Индикаторная культура	Наименование объекта выделения	Местонахождение объекта выделения
1	FBp 131 УлГАУ	<i>Bacillus pumilus</i> 17	Почва	Республика Мордовия (г. Саранск)
2	FBp 144 УлГАУ	<i>Bacillus pumilus</i> 4	Почва	Ульяновская область (п. Ишеевка)
3	FBp 159 УлГАУ	<i>Bacillus pumilus</i> 20	Почва	Ульяновская область (р.п. Сурское)
4	FBp 162 УлГАУ	<i>Bacillus pumilus</i> 44	Почва	Пензенская область (г. Пенза)



Рисунок 31 – Зона лизиса на газоне культуры *Bacillus pumilus*

Селекцию фагов проводили десятикратным пассированием изолированных негативных колоний на мясопептонном агаре с перевиванием на мясопептонный бульон, подбирая визуально время пассажа. Очистка фагов *Bacillus pumilus* от

бактериальных клеток осуществлялась методом фильтрации с использованием мембранных фильтров (filtertype: 0,45 и 0,22  $\mu\text{m}$  GV).

Морфология бляшкообразующих единиц изолятов фагов представлена в таблице 12 и на рисунках 32-33.

Таблица 12 – Характеристика выделенных фагов бактерий *Bacillus pumilus*

№ п/п	Описание морфология бляшкообразующих единиц	Наименование бактериофага
1 тип	Прозрачные негативные колонии округлой формы 1,5 ± 0,5 мм в диаметре	FBp 131 УлГАУ
2 тип	Прозрачные негативные колонии округлой формы 2,0 ± 1,0 мм в диаметре	FBp 144 УлГАУ, FBp 159 УлГАУ, FBp 162 УлГАУ

Литическую активность выделенных бактериофагов оценивали по их способности вызывать лизис бактериальной культуры на плотной питательной среде методом агаровых слоев. Результаты проведенных исследований, представленные в таблице 13. Показатели литической активности бактериофагов *Bacillus pumilus* были выявлены в диапазоне от  $3,4 \pm 0,1 \times 10^8$  до  $2,8 \pm 0,2 \times 10^{10}$  БОЕ/мл.

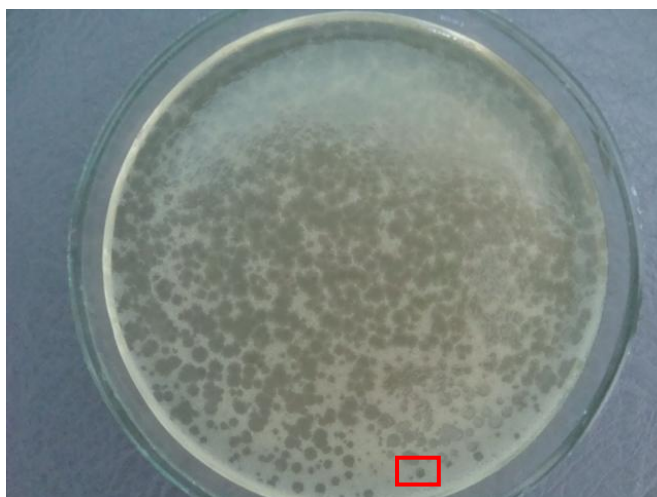
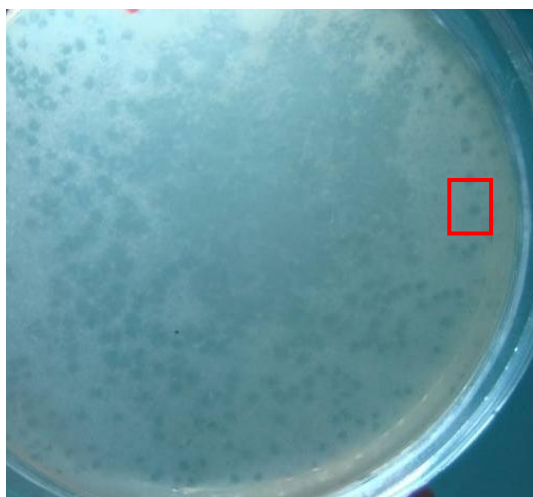


Рисунок 32 - Морфология негативных колоний фага FBp 131 УлГАУ  
Рисунок 33 - Морфология негативных колоний фага FBp 144 УлГАУ

Таблица 13– Литическая активность бактериофагов *Bacillus pumilus*

№ п/п	Наименования фага	Литическая активность	
		по Аппельману	по Грациа
1	FBp 131 УлГАУ	10 <sup>-8</sup>	1,2±0,1x10 <sup>9</sup>
2	FBp 144 УлГАУ	10 <sup>-9</sup>	2,5±0,2x10 <sup>10</sup>
3	FBp 159 УлГАУ	10 <sup>-7</sup>	3,4±0,1x10 <sup>8</sup>
4	FBp 162 УлГАУ	10 <sup>-9</sup>	2,8±0,2x10 <sup>10</sup>

Для изучения спектра литического действия и специфичности фагов использовали 74 штамма бактерий *Bacillus pumilus*, выделенных ранее и бактерии гетерологичных видов и родов. Исследования проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры методом «стекающая капля». Экспериментальным путем установлено, что изучаемые специфичные бактериофаги имеют различный диапазон действия по отношению к штаммам *Bacillus pumilus*, наиболее широкий спектр литического действия продемонстрировал изолят FBp 144 УлГАУ - 89,2 %, все изучаемые фаги видоспецифичны (таблица 14).

Таблица 14 – Результаты изучения диапазона литической активности и специфичности бактериофагов *Bacillus pumilus*

№ п/п	Бактериофаги	Виды бактерий											% лизированных культур
		<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Paenibacillus polymixa</i>	<i>Paenibacillus larvae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria ivanovii</i>	
Кол-во штаммов		74	8	106	12	11	56	3	2	2	18	2	-
1.	FBp 131 УлГАУ	+/33	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	44,6
2.	FBp 144 УлГАУ	+/66	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	89,2
3.	FBp 159 УлГАУ	+/17	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	22,9
4.	FBp 162 УлГАУ	+/51	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	68,9

Примечание: «л» - зона лизиса, «нл» - отсутствие зоны лизиса

Изучение селекционированных бактериофагов *Bacillus pumilus* к воздействию температуры в диапазоне от +57 до +90 °С в течение 30 минут трихлорметана в соотношении 1:10 в течение 5-35 минут показало, что все изучаемые изоляты фагов устойчивы к воздействию температурного фактора и имеют различную степень устойчивости к трихлорметану.

Для дальнейших работ, посвященных конструированию фагового биопрепарата, было принято решение использовать бактериофаг FBp 144 УлГАУ, как обладающий наиболее высокими показателями спектра литического действия и высокой литической активностью. Полученные результаты в дальнейшем могут быть транслированы и на другие штаммы выделенных бактериофагов при необходимости введения их в состав разрабатываемого биопрепарата.

### 2.2.2.3 Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов активных в отношении *Listeria monocytogenes*

Для выделения вирулентных листериозных бактериофагов шестнадцать образцов сточных вод были отобраны из очистных сооружений и канализационных стоков города Ульяновска и Ульяновской области. Из соображений безопасности пробы отбирались стерильными шприцами. Образцы были доставлены в лабораторию и хранились в соответствующих температурных условиях. Выделение бактериофагов проводили без обогащения, для этого готовили субстрат в соотношении 1:10, в колбу емкостью 100 мл вносили 45,0 мл мясопептонного бульона и 5,0 мл исследуемого материала. Для лучшего связывания бактериофага с бактерией-хозяином к каждому образцу сточных вод добавляли 1%-ный раствор хлорида кальция. Образцы инкубировали в течение 48 часов при 28°С. По истечении времени фильтровали субстрат через бумажные фильтры и центрифугировали в течении 10 минут при 3000 об/мин. Получившийся супернатант пропускали через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм и исследовали на наличие бактериофагов в комбинации с

индикаторными культурами метод агаровых слоев по Грация с некоторыми модификациями. Для первого слоя готовили 1,5 % триптико-соевый агар, с добавлением 0,1%  $\text{CaCl}_2$  и подсушивали в условиях термостата при температуре 30°C. Для формирования второго слоя использовали расплавленный 0,7% триптико-соевый агар с добавлением 0,1%  $\text{CaCl}_2$ , куда вносили исследуемый фильтрат и 18 часовую индикаторную культуру в соотношении 1:2. Посевы инкубировали при 28°C в течении 24-36 часов. Положительным результатом считали наличие на среде негативных колоний, хорошо видимых на матовом фоне глубинного роста индикаторной культуры, отрицательным – газонный рост бактериальной культуры.

Из 16 отобранных проб сточных вод 3 образца дали положительный результат на наличие фага. На рисунках 34-36 показан отбор изолированных негативных колоний для селекции и формирования чистых фаговых линий.

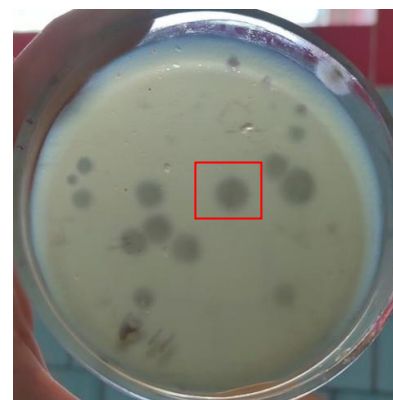
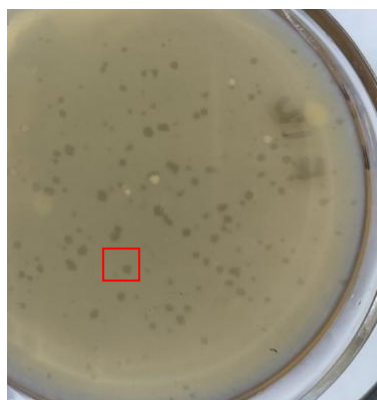
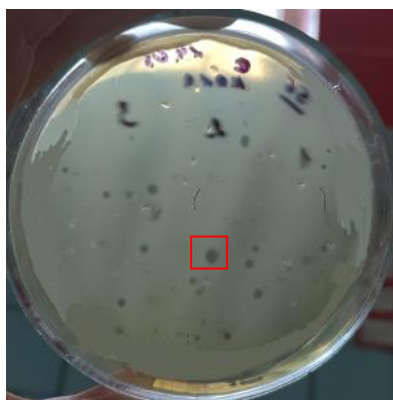


Рисунок 34 – Отбор негативной колонии для получения чистой линии фага F-11  
Рисунок 35 - Отбор негативной колонии для получения чистой линии фага F-12  
Рисунок 36 - Отбор негативной колонии для получения чистой линии фага В-13

Селекцию фагов проводили с помощью анализа бляшек. Фильтрат серийно разводили в фосфатном буфере (pH=7,6), смешивали с индикаторной культурой и инкубировали при 28°C в течении 24 часов. После инкубации одну изолированную негативную колонию (прозрачную, без зоны неполного лизиса, максимального размера) отбирали и элюировали

в фосфатном буфере при 22°C в течение 24 часов. Процедуру повторяли 5-7 раз до получения чистых линий фагов. В этом исследовании были получены три изолята фагов, получившие названия F-11 УлГАУ, F-12 УлГАУ и В-13 УлГАУ.

Результаты исследований по изучению литической активности листериозных бактериофагов отражены в таблице 15.

Таблица 15 - Литическая активность листериозных бактериофагов

№	Название изучаемого биологического свойства	Результат изучения характерных биологических свойств литических листериозных бактериофагов		
		F-11 УлГАУ	F-12 УлГАУ	В-13 УлГАУ
1	Литическая активность, БОЕ/мл (по Грациа) при выделении	$2,8 \times 10^2$	$1,2 \times 10^4$	$4,3 \times 10^4$
2	Литическая активность, БОЕ/мл (по Грациа) после 5 циклов непрерывного пассирования	$1,4 \pm 0,1 \times 10^8$	$1,3 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$2,1 \pm 0,1 \times 10^{10}$
3	Литическая активность (по методу Аппельмана) после пассирования	$10^{-7}$	$10^{-9}$	$10^{-9}$
4	Спектр литического действия на культуре (по Отто) после пассирования	++	+++	+++

Результаты изучения специфичности и диапазона литического действия показали, что выделенные бактериофаги не способны лизировать культуры гетерологичных родов и видов. Негативные колонии формировались только на питательной среде, содержащей *L. monocytogenes*. Для подтверждения широкого спектра действия выделенных бактериофагов в отношении бактерий *Listeria monocytogenes*, было проведено исследование на 16 культурах. Установлено, что спектр составляет от 62,5% до 87,5%. Результаты представлены в таблице 16.

Изучение устойчивости селекционированных бактериофагов *Listeria monocytogenes* к воздействию температуры в диапазоне от +40 до +70 °C в течение 30 минут и трихлорметану в соотношении 1:10 в течение 5-40 минут



показало, что все изучаемые изоляты фагов имеют умеренную устойчивость к воздействию температурного фактора и устойчивы к трихлорметану.

Таблица 16 - Диапазон литического действия и специфичность листериозных бактериофагов

Род (вид) бактерий	Кол-во исслед-ых штаммов	Бактериофаги					
		F-11 УЛГАУ		F-12 УЛГАУ		B-13 УЛГАУ	
		% лизируемых культур	Количество штаммов	% лизируемых культур	Количество штаммов	% лизируемых культур	Количество штаммов
<i>L.monocytogenes</i>	16	68,8	11	62,5	10	87,5	14
<i>L.ivanovii</i>	3	нл	0	нл	0	нл	0
<i>L.innocua</i>	2	нл	0	нл	0	нл	0
<i>L.seeligeri</i>	2	нл	0	нл	0	нл	0
<i>L.welshimeri</i>	1	нл	0	нл	0	нл	0
<i>L.murrayi</i>	1	нл	0	нл	0	нл	0
<i>L.grayi</i>	1	нл	0	нл	0	нл	0
<i>Erysipelothrix insidiosa</i>	1	нл	0	нл	0	нл	0
<i>Jonesia dentrificans</i>	1	нл	0	нл	0	нл	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	нл	0	нл	0	нл	0
<i>Rhodococcus equi</i>	1	нл	0	нл	0	нл	0

Примечание: «л» - зона лизиса, «нл» - отсутствие зоны лизиса

Для дальнейших работ, посвященных конструированию фагового биопрепарата, было принято решение использовать бактериофаг B-13 УЛГАУ, как обладающий наиболее высокими показателями литической активности и спектра литического действия. Полученные результаты в дальнейшем могут быть транслированы и на другие штаммы выделенных бактериофагов при необходимости введения их в состав разрабатываемого биопрепарата.

#### 2.2.2.4 Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов активных в отношении *Yersinia enterocolitica*

Для выделения бактериофагов *Y. enterocolitica* из объектов внешней среды использовали 32 пробы бытовых сточных вод и вод открытых водоемов. Доставленные в лабораторию пробы фильтровали через бумажный фильтр для освобождения от механических примесей в случае необходимости. В колбу емкостью 1,0 л, содержащую стерильный, МПБ в объеме 0,5 литра, вносили 50,0 мл фильтрата и по 1,0 мл, индикаторных штаммов бактерий. Колбу термостатировали в течении 24 часов при 37°C. После этого содержимое колбы разливали в пробирки, центрифугировали при 3000 об/мин в течении 30 минут, надосадочную жидкость фильтровали с помощью бактериальных фильтров в стерильные пробирки. Фильтраты исследовали по методу Отто. Чашки помещали в термостат на 18-20 часов при 37°C. Наличие негативных колоний или зон лизиса на газоне роста индикаторной культуры расценивали как положительный результат.

После проведенной селекции и этапов работы последовательному пассированию фага с индикаторной культуре на плотных питательных средах отобрано 4 изолята бактериофагов активных в отношении бактерий вида *Y. enterocolitica*.

Морфологию негативных колоний фагов изучали методом агаровых слоев. Негативные колонии, образуемые бактериофагами имеют различную морфологию. Результаты представлены, в таблице 17 и на рисунках 37-40.

Индикаторные культуры бактерий вида *Y. enterocolitica* для определения литической активности бактериофагов, выращивали на стандартном мясопептонном бульоне в течение 18-20 часов. Литическую активность селекционированных бактериофагов определяли по методу Аппельмана и Грация. Результаты представлены в таблице 18. Активность исследуемых бактериофагов варьировала от  $1,73 \pm 0,1 \times 10^8$  до  $1,8 \pm 0,1 \times 10^{10}$  корпускул в 1 мл.

Таблица 17 - Описание морфологии негативных колоний фагов *Y. enterocolitica*

Наименование фага	Колонии фага	Индикаторная культура
У-2 УлГАУ	Колонии диаметром 0,9-1,0 с прозрачным центром диаметром и узкой зоной неполного лизиса	<i>Yersinia enterocolitica</i> УлГАУ 8
У-8 УлГАУ	Колонии диаметром 1,0-1,5, прозрачные, без зоны неполного лизиса	<i>Yersinia enterocolitica</i> УлГАУ 7
У-9 УлГАУ	Колонии диаметром 0,5-0,7, прозрачные, с узкой зоной неполного лизиса	<i>Yersinia enterocolitica</i> УлГАУ 7
У-11 УлГАУ	Колонии диаметром 0,7-0,8, с прозрачным центром и с широкой зоной неполного лизиса	<i>Yersinia enterocolitica</i> УлГАУ 8

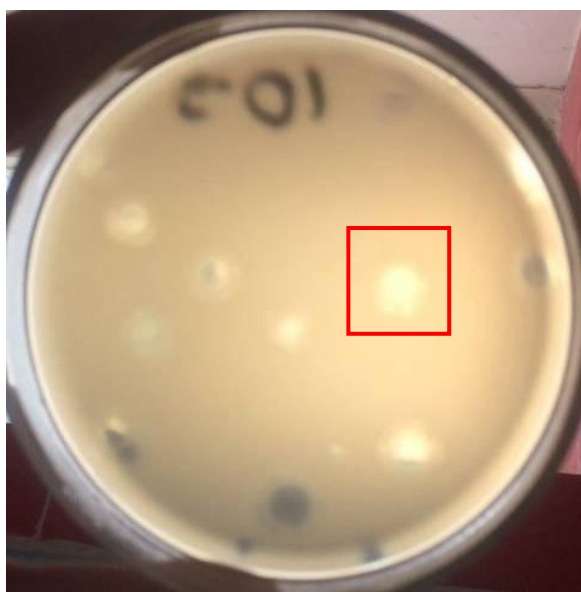


Рисунок 37 – Морфология негативных колоний ирсиниозного фага У-2

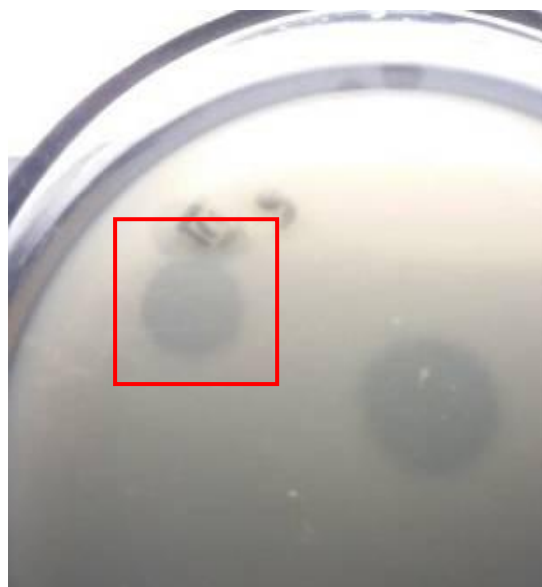


Рисунок 38 – Морфология негативных колоний ирсиниозного фага – У-8

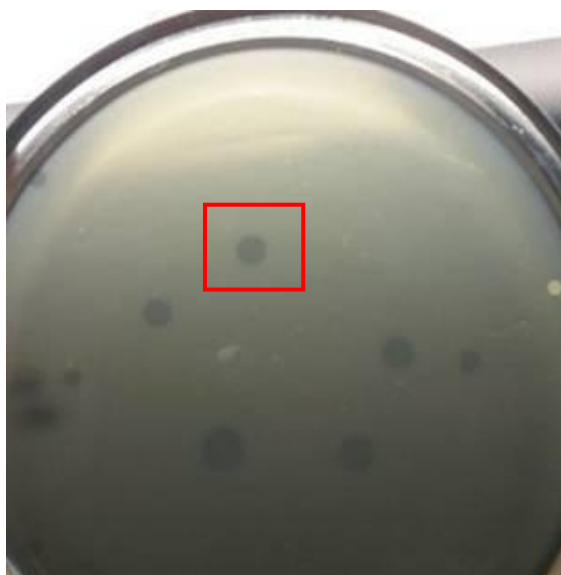


Рисунок 39 – Морфология негативных колоний ирсиниозного фага Y-9



Рисунок 40 – Морфология негативных колоний ирсиниозного фага Y-11

Таблица 18 - Литическая активность бактериофагов *Y. enterocolitica*

№ пп	Наименования фага	Активность по Аппельману	Активность по Грациа, корпускул в 1 мл
1	Y-2 УлГАУ	$10^{-7}$	$1,3 \pm 0,1 \times 10^8$
2	Y-8 УлГАУ	$10^{-9}$	$1,8 \pm 0,1 \times 10^{10}$
3	Y-9 УлГАУ	$10^{-8}$	$3,2 \pm 0,1 \times 10^9$
4	Y-11 УлГАУ	$10^{-6}$	$2,2 \pm 0,1 \times 10^8$

Для изучения спектра литической активности селекционированных фагов использовали 38 референсных и полевых штаммов *Y. enterocolitica* из полученных из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ВСЭ ФГБОУ ВО Ульяновского ГАУ. Определение этого показателя проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры по методу Отто. Результаты представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Изучение спектра литического действия ирсиниозных бактериофагов

№ пп	Название культуры	Наличие лизиса на газоне культуры при нанесении фага
------	-------------------	--

		Y-2 УлГАУ	Y-8 УлГАУ	Y-9 УлГАУ	Y-11 УлГАУ
1.	<i>Yersinia enterocolitica</i> O 9	-	+	+	-
2.	<i>Yersinia enterocolitica</i> O 9H	-	+	+	-
3.	<i>Yersinia enterocolitica</i> O3	+	+	-	-
4.	<i>Yersinia enterocolitica</i> O 8	+	+	+	-
5.	<i>Yersinia enterocolitica</i> O 8R	+	+	+	+
6.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 1 УлГАУ	+	+	-	-
7.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 2 УлГАУ	+	+	+	-
8.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 3 УлГАУ	-	+	-	+
9.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 5 УлГАУ	-	+	+	-
10.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 6 УлГАУ	+	+	-	-
11.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 7УлГАУ	+	+	+	+
12.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 8 УлГАУ	+	+	+	+
13.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 9УлГАУ	-	+	+	-
14.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 11 УлГАУ	-	+	+	-
15.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 12 УлГАУ	-	+	-	+
16.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 14 УлГАУ	+	-	+	-
17.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 15УлГАУ	+	+	+	+
18.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 18 УлГАУ	+	+	+	+
19.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 22 УлГАУ	+	+	-	-
20.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 23 УлГАУ	+	+	-	-
21.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 26УлГАУ	-	+	-	+
22.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 27 УлГАУ	-	+	+	+
23.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 28 УлГАУ	+	+	+	+
24.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 29 УлГАУ	+	+	-	-
25.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 30 УлГАУ	+	+	-	-
26.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 32 УлГАУ	+	+	+	-
27.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 34 УлГАУ	-	+	-	-
28.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 35 УлГАУ	+	+	+	-
29.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 36 УлГАУ	+	+	-	+
30.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 41 УлГАУ	-	-	-	-
31.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 44 УлГАУ	+	+	+	+
32.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 45 УлГАУ	+	+	-	-
33.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 47 УлГАУ	+	+	+	-
34.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 54 УлГАУ	-	+	+	-
35.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 58 УлГАУ	-	+	-	+
36.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 59 УлГАУ	+	+	+	+
37.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 62 УлГАУ	+	+	+	-
38.	<i>Yersinia enterocolitica</i> 63 УлГАУ	-	-	-	-
Количество лизируемых культур		25	34	22	14
Процент лизиса		65,8	89,4	57,9	36,8

Примечание: «+» - положительный результат «-» - отрицательный результат

Бактериофаги активные в отношении *Y. enterocolitica*, обладает спектром литического действия от 36,8% до 89,4%. Совокупный процент лизиса всех 5 фагов составляет 100%.

При исследовании специфичности изучаемых фагов использовали следующие виды и роды бактерий: *Yersinia pseudotuberculosis*, *Providencia spp.*, *Escherichia spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.* Оценку проводили методом Отто. Установлено, что изучаемые ирсиниозные бактериофаги не лизировали ни одну из испытываемых 56 культур бактерий других родов и видов. Исследуемые фаги являются специфичными к бактериям вида *Y. enterocolitica* и не активны в отношении других видов бактерий. Результаты представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Результаты изучения специфичности ирсиниозных фагов

№ пп	Род бактерий	Кол-во штаммов	Бактериофаги			
			У-2 УлГАУ	У-8 УлГАУ	У-9 УлГАУ	У-11 УлГАУ
			Количество лизируемых штаммов			
1	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	2	нл	нл	нл	нл
2	<i>Providencia spp.</i>	2	нл	нл	нл	нл
3	<i>Escherichia spp.</i>	8	нл	нл	нл	нл
4	<i>Citrobacter spp.</i>	3	нл	нл	нл	нл
5	<i>Enterobacter spp.</i>	6	нл	нл	нл	нл
6	<i>Klebsiella spp.</i>	8	нл	нл	нл	нл
7	<i>Salmonella spp.</i>	4	нл	нл	нл	нл
8	<i>Proteus spp.</i>	20	нл	нл	нл	нл
9	<i>Pseudomonas spp.</i>	3	нл	нл	нл	нл

Примечание: "л" - лизис культуры "нл" - отсутствие лизиса.

Изучение устойчивости селекционированных *Yersinia enterocolitica* к воздействию температуры в диапазоне от +45 до +70 °С в течение 30 минут и

трихлорметану в соотношении 1:10 в течение 5-45 минут показало, что все изучаемые изоляты фагов не обладают термостабильностью и обладают вырожденной устойчивостью к трихлорметану.

Для дальнейших работ, посвященных конструированию фагового биопрепарата, было принято решение использовать бактериофаг У-8 УлГАУ, как обладающий наиболее высокими показателями литической активности и спектра литического действия. Полученные результаты в дальнейшем могут быть транслированы и на другие штаммы выделенных бактериофагов при необходимости введения их в состав разрабатываемого биопрепарата.

#### 2.2.2.5 Выделение и изучение биологических свойств бактериофагов активных в отношении *Bacillus cereus*

В результате исследования 44 проб почвы различного хозяйственного назначения Приволжского, Южного и Центрального федеральных округов, по стандартной методике Д.М. Гольдфарба с подращиванием и без него удалось выделить и селекционировать 8 изолятов бактериофагов бактерий *B. cereus*.

При определении морфологии негативных колоний 8 выделенных бактериофагов систематизировали на 2 типа негативных колоний различающихся по размеру, форме и прозрачности (табл.21 и рис.41-42).

Таблица 21 – Морфология бляшкообразующих единиц бактериофагов *Bacillus cereus*

№ п/п	Описание морфологии бляшкообразующих единиц	Название бактериофага <i>Bacillus cereus</i>
1 тип	Прозрачные негативные колонии округлой формы, 1,0±0,5 мм в диаметре	<i>FBc</i> – 202 УлГАУ, <i>FBc</i> – 203 УлГАУ, <i>FBc</i> – 211 УлГАУ, <i>FBc</i> – 217 УлГАУ
2 тип	Прозрачные негативные колонии округлой формы с узкой зоной неполного лизиса 8,5±0,5 мм в диаметре	<i>FBc</i> – 205 УлГАУ, <i>FBc</i> – 208 УлГАУ, <i>FBc</i> – 212 УлГАУ, <i>FBc</i> – 217 УлГАУ

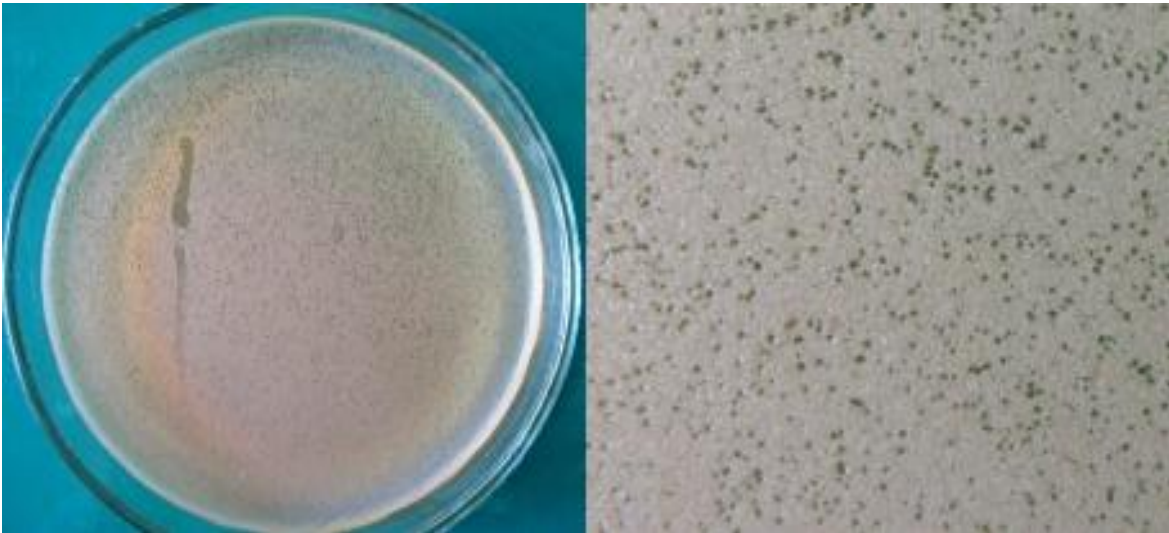


Рисунок 41 - Формирование бляшкообразующих единиц «1 типа» бактериофагом *FBc – 211* УлГАУ на индикаторной культуре – время термостатирования 18 часов при температуре  $36\pm 1$  °С

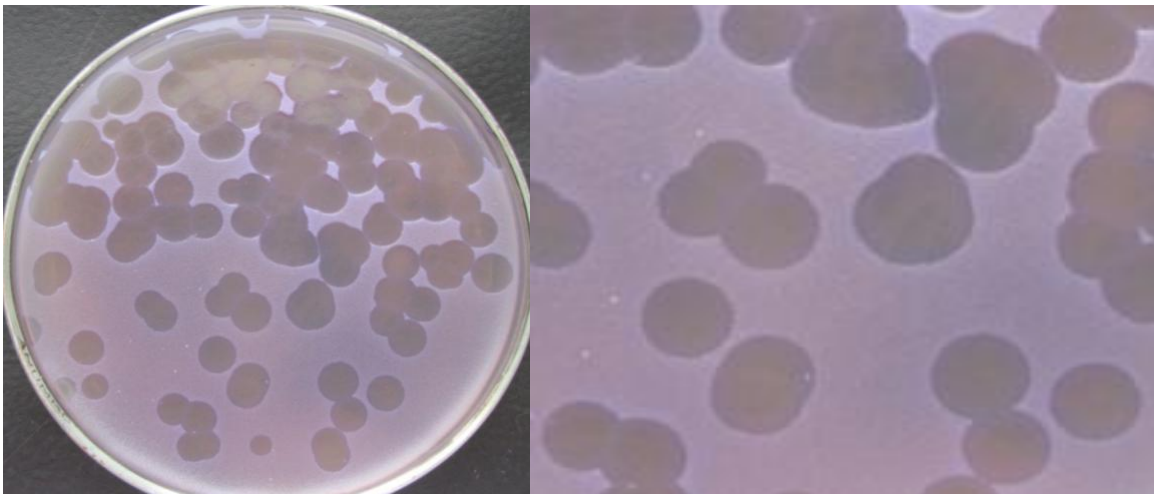


Рисунок 42 – Формирование бляшкообразующих единиц «1 типа» бактериофагом *FBc – 216* УлГАУ на индикаторной культуре – время термостатирования 18 часов при температуре  $36\pm 1$  °С

Литическая активность выделенных фагов находилась в диапазоне от  $10^{-7}$  до  $10^{-11}$  по методу Аппельмана и от  $2,1\pm 0,2 \times 10^8$  до  $3,6\pm 0,1 \times 10^{11}$  БОЕ/мл по методу Грациа (табл. 22).

Для изучения спектра литического действия цереусных фагов использовали 82 штаммов бактерий *V. cereus*, выделенных ранее.



Определение спектра литического действия проводили методом нанесения фага на газон бактериальной культуры по Отто. Установлено, что спектр литического действия бактериофагов *B.cereus* находился в интервале от 12,2 до 89 % от всего количества изучаемых бактериальных штаммов (табл. 23).

Таблица 22 – Литическая активность бактериофагов *Bacillus cereus*

№ п/п	Название бактериофага	Литическая активность (титр)	
		по Аппельману	По Грациа, БОЕ/мл
1.	<i>FBc – 202 УлГАУ</i>	$10^{-10}$	$3,6 \pm 0,1 \times 10^{11}$
2.	<i>FBc – 203 УлГАУ</i>	$10^{-7}$	$2,1 \pm 0,2 \times 10^8$
3.	<i>FBc – 205 УлГАУ</i>	$10^{-8}$	$4,1 \pm 0,7 \times 10^9$
4.	<i>FBc – 208 УлГАУ</i>	$10^{-9}$	$2,1 \pm 0,3 \times 10^{10}$
5.	<i>FBc – 211 УлГАУ</i>	$10^{-7}$	$3,6 \pm 0,5 \times 10^8$
6.	<i>FBc – 212 УлГАУ</i>	$10^{-9}$	$1,5 \pm 0,3 \times 10^{10}$
7.	<i>FBc – 216 УлГАУ</i>	$10^{-10}$	$2,3 \pm 0,2 \times 10^{11}$
8.	<i>FBc – 217 УлГАУ</i>	$10^{-9}$	$3,0 \pm 0,2 \times 10^{10}$

Изучение специфичности 8 выделенных изолятов бактериофагов *B. cereus* проводили на культурах гетерологичных родов и видов (табл. 23). Установлена специфичность бактериофагов строго в пределах вида *B. cereus*.

Изучение устойчивости бактериофагов *Bacillus cereus* к воздействию температуры в диапазоне от +50 до +90 °С в течение 30 минут трихлорметана в соотношении 1:10 в течение 10-40 минут показало, что все изучаемые изоляты фагов устойчивы к воздействию температурного фактора и имеют различную степень устойчивости к трихлорметану.

Для дальнейших работ, посвященных конструированию фагового биопрепарата, было принято решение использовать бактериофаг *FBc – 216 УлГАУ*, как обладающий наиболее высокими показателями спектра литического действия и высокой литической активностью. Полученные результаты в дальнейшем могут быть транслированы и на другие штаммы выделенных бактериофагов при необходимости введения их в состав разрабатываемого биопрепарата.

Таблица 23 – Результаты изучения спектра литической активности и специфичности бактериофагов *Bacillus cereus*

№ п/п	Бактериофаги	Виды бактерий										% лизированных культур
		<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus mesentericus</i>	<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Bacillus anthracis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Paenibacillus polymixa</i>	<i>Paenibacillus larvae</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	
Кол-во испытанных штаммов		82	8	18	12	11	16	3	2	2	3	-
1	<i>FBc – 202</i> УлГАУ	+/10	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	12,2
2	<i>FBc – 203</i> УлГАУ	+/38	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	46,3
3	<i>FBc – 205</i> УлГАУ	+/45	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	58,8
4	<i>FBc – 208</i> УлГАУ	+/12	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	14,6
5	<i>FBc – 211</i> УлГАУ	+/70	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	85,3
6	<i>FBc – 212</i> УлГАУ	+/30	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	36,6
7	<i>FBc – 216</i> УлГАУ	+/73	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	89,0
8	<i>FBc – 217</i> УлГАУ	+/65	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	нл	79,3

Примечание: «л» - зона лизиса, «нл» - отсутствие зоны лизиса

### 2.2.3. Конструирование полифагового биопрепарата на основе отобранных фагов с заданными биологическими свойствами

#### 2.2.3.1 Сохранение показателя литической активности отобранных бактериофагов при хранении

Необходимым этапом при конструировании рецептуры и разработке технологии получения фагового биопрепарата является определение срока годности готовой формы. Изменение литической активности во время хранения определяли ежеквартально в течение 9 месяцев. Все выделенные бактериофаги хранились в виде фаголизата бульонной культуры в закупоренных стеклянных флаконах или в пробирках с резиновой пробкой при температуре 2-4°C. Результаты приведены в таблице 24. Показатель литической активности фагов при хранении определялся по классическим методикам определения активности методом агаровых слоев по Грациа и методом Аппельмана.

Таблица 24 – Стабильность литической активности бактериофага при нормативном хранении

№	Наименования фага	Литическая активность в момент укупоривания		Литическая активность через 3 месяца хранения		Литическая активность через 6 месяца хранения		Литическая активность через 9 месяца хранения	
		по Аппельману	по Грациа	по Аппельману	по Грациа	по Аппельману	по Грациа	по Аппельману	по Грациа
1	7ф-УлГАУ	10 <sup>-9</sup>	1,0±0,1x 10 <sup>9</sup>	10 <sup>-9</sup>	1,0x10 <sup>9</sup>	10 <sup>-9</sup>	1,0x10 <sup>9</sup>	10 <sup>-9</sup>	1,0 x10 <sup>9</sup>
2	FBp 144 УлГАУ	10 <sup>-9</sup>	2,5±0,2x10 <sup>10</sup>	10 <sup>-9</sup>	2,5x10 <sup>10</sup>	10 <sup>-8</sup>	1,9x10 <sup>9</sup>	10 <sup>-8</sup>	1,1x10 <sup>9</sup>
3	B-13 УлГАУ	10 <sup>-9</sup>	2,1±0,1×10 <sup>10</sup>	10 <sup>-9</sup>	2,0x10 <sup>10</sup>	10 <sup>-9</sup>	2,0x10 <sup>10</sup>	10 <sup>-9</sup>	2,0 x10 <sup>10</sup>
4	Y-8 УлГАУ	10 <sup>-9</sup>	1,8±0,1×10 <sup>10</sup>	10 <sup>-9</sup>	1,5x10 <sup>10</sup>	10 <sup>-9</sup>	1,2 x10 <sup>10</sup>	10 <sup>-9</sup>	1,1 x10 <sup>10</sup>
5	FBc – 216 УлГАУ	10 <sup>-10</sup>	2,3±0,2x10 <sup>11</sup>	10 <sup>-10</sup>	1,7x10 <sup>11</sup>	10 <sup>-10</sup>	1,7x10 <sup>11</sup>	10 <sup>-10</sup>	1,7x10 <sup>11</sup>

Опытным путем установлено:

- бактериофаг 7ф-УлГАУ не изменяет свою литическую активность через 9 месяцев хранения;
- бактериофаг FВр 144 УлГАУ, не снижал показатели литической активности в течении 3 месяцев. Через 6 месяцев и 9 месяцев литическая активность снижалась и составила  $1,9 \times 10^9$  и  $1,1 \times 10^9$  БОЕ/мл соответственно. Пассирование фага на исходном штамме бактерий в течение 3 пассажей методом агаровых слоев восстанавливает литическую активность до исходного значения. Изменение литической активности фага FВр 144 УлГАУ в диапазоне 1 порядка не является критическим при конструировании биопрепарата и не отразится на его способности лизировать культуры *Bacillus pumilus*;
- бактериофаг В-13 УлГАУ крайне незначительно изменял свою литическую активность при хранении;
- бактериофаг Y-8 УлГАУ снижал показатель литической активности при хранении на всем сроке хранения до  $1,1 \times 10^{10}$  БОЕ/мл после 9 месяцев хранения. Однократное пассирование фага Y-8 УлГАУ на индикаторном штамме восстанавливало изучаемые показатели до исходных значений;
- бактериофаг FВс – 216 УлГАУ снижал литическую активность в первые 3 месяца хранения до показателя  $1,7 \times 10^{11}$  БОЕ/мл после чего показатель больше не изменялся.

#### 2.2.3.2 Поиск в геноме производственно-перспективных бактериофагов «локусов патогенности»

Всего проанализировано 14 различных факторов патогенности (табл. 25). Основные факторы патогенности *Bacillus cereus* и *Bacillus pumilus* связаны с выделением разрушающих ткани реактивных экзоферментов:

гемолизинов, фосфолипаз, токсина вызывающего рвоту и порообразующих энтеротоксинов (НВL, ННЕ, и цитотоксина К) [496-497].

Основные факторы патогенности *Pseudomonas syringae* связаны с продукцией коронатина (сmaA) и фитотоксина некроза растительной ткани сириногопептина (сурС)) [498].

Основными факторами патогенности *Listeria monocytogenes*, потенциально способными быть переданными с помощью бактериофагов в процессе горизонтального переноса являются - *inlA-inlB* кодируют поверхностные белки интернарины InlA и InlB, участвующие в интернализации патогена нефагоцитарными клетками после связывания с рецепторами клетки-хозяина E-кадгерином и Met. Не менее важными являются гены LPI-1, *hly* и *actA*, необходимые для реализации потенциала вирулентности *Listeria monocytogenes*.

Таблица 25 – Факторы патогенности для выявления «локусов патогенности» в геноме производственно-перспективных бактериофагов

№п/п	Бактериофаг	Индикаторная культура	Факторы патогенности
1	FBc 216 УлГАУ	<i>Bacillus cereus</i>	Гемолизин Энтеротоксин НВL/ННЕ Цитотоксин CytK2
2	FBp 144 УлГАУ	<i>Bacillus pumilus</i>	Гемолизин Энтеротоксин НВL/ННЕ Цитотоксин CytK2
3	7ф УлГАУ	<i>Pseudomonas syringae</i>	Коронатина сmaA Сириногопептин сурС
4	B-13 УлГАУ	<i>Listeria monocytogenes</i>	интернарины InlA интернарины InlB Листерииолизин <i>hly</i>
5	Y-8 УлГАУ	<i>Yersinia enterocolitica</i>	энтеротоксин утхА термостабильный энтеротоксин уstA термостабильный энтеротоксин уstB

Среди основных факторов патогенности, которые способны быть перенесены в геноме специфичных к ним бактериофагов *Yersinia enterocolitica* с помощью горизонтального переноса, особое значение имеют энтеротоксин (*ytxA*), термостабильные энтеротоксины *ystA* и *ystB*.

#### Гемолизин (*Hly*)

В системе NCBI была определена последовательность гена гемолизина для *Bacillus cereus* (рис. 43). Изолированные нами бактериофаги и определенные как кандидатные для бактериофагового препарата потенциально способны передавать данную последовательность с помощью горизонтального переноса генов.

```
>NZ_CP017060.1:c5327787-5327140 Bacillus cereus strain FORC_047 chromosome,
complete genome
ATGAATACTTATGTAAGGGAACCAGTTAACGCATTTACTCACTTAGGTGGAGCGATATTATCATTATTG
CCTTATTAGCTATGCTTGTGAAAGTTTCTATTAAGATGCCATCATTGCTGCAATTACAGCTGTTATTTI
GTTTGGTATTGGAAATGATGGTCCSTTTATACGGCGTCAGCTGTGTATCATAGTGTGTGGCCAAATGAACGT
GTTATTTACTTCTTAGGAAGCTAGATCATTCTATGATTTTATATTAATTGCAGGTACATATGCACCCCT
TTTGCTTGATTACATTAATTCAGCAAGTGGTTTACTATTATTGTGTTAGTCTATGCAACTGCCATTG
TGCCATTGTATTTAAATGTTTTGGT TTAATGTCCAAGATGGTTATCGACAGCAATTTATATTACGATG
GGTTGGTTAATTGT TTTATTCTTTGCACCGTTAGCTGAGAATT TAAGTACAGGAGGCATTATTTCTTAG
TACTTGGAGGCATT TTTTATACAATTGGTGGATTTATTTATGGAACAAAAGCCAAAATGGTTAGAAAT TTA
ATATATGGGGCATCATGAAATTTTTTCATGTTTTTGTATTATTAGGTAGTCTTGCGCATT TTTCTAAGTGA
TATTGTTACGTAAT TTA
```

Рисунок 43 - Нуклеотидная последовательность гена гемолизина *Bacillus cereus*

Далее было выявлено, что последовательность гена, кодирующего гемолизин *Bacillus cereus* как фактор патогенности, имеет полную гомологию с кодирующим аналогичный фактор патогенности геном *Bacillus thuringensis* (рис. 44). Таким образом, определена вероятность горизонтального переноса данной последовательности между этими видами.

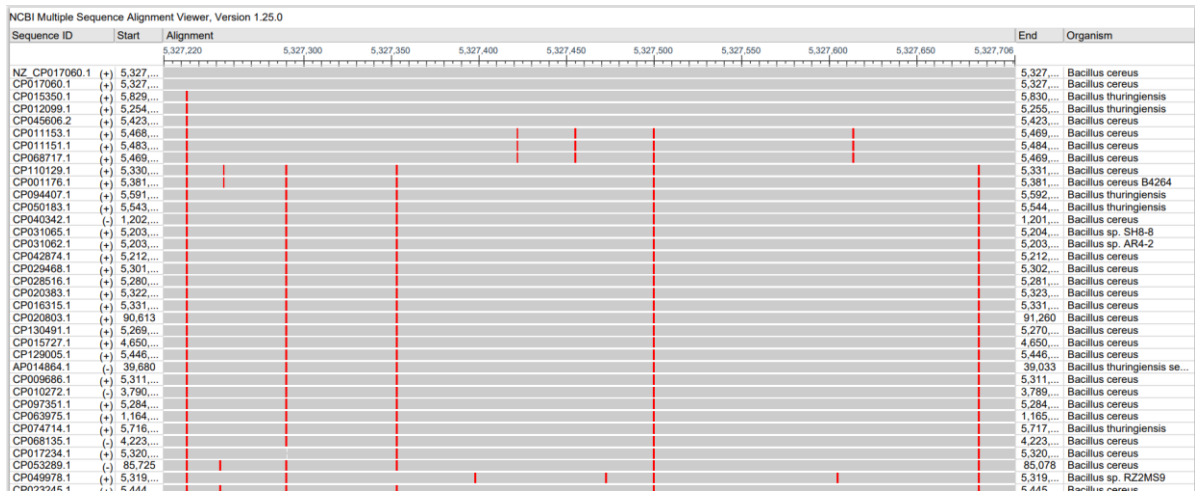


Рисунок 44 - Множественное выравнивание гена гемолизина *Bacillus cereus*

В системе NCBI Primer Blast нами была сконструирована система олигонуклеотидов (праймеров и зонда) (рис. 45-46) для детекции специфической последовательности, характерной для гена гемолизина. В качестве флуоресцентной метки зонда TaqMan для ПЦР в реальном времени был использован краситель FAM с гасителем BHQ-1.

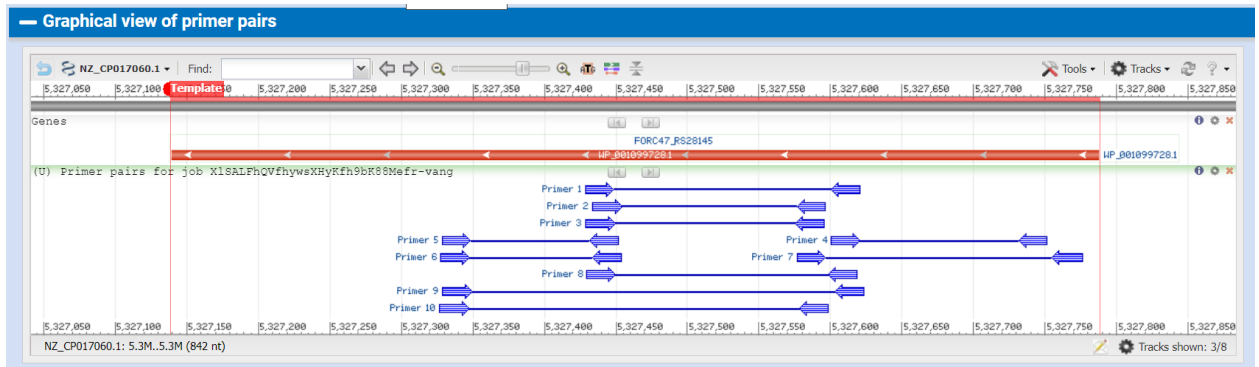


Рисунок 45 - Система олигонуклеотидов для детекции гена гемолизина *Bacillus cereus* (схема фланкирования специфических участков)

### Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ACAATGCCACAAATCGCAGT	Plus	20	5327429	5327448	59.04	45.00	3.00	2.00
Reverse primer	TACGGCGTCAGCTGTGTATC	Minus	20	5327620	5327601	59.90	55.00	6.00	0.00
Internal oligo	ACACGTTTCATTGGCCACAACACT	Plus	23	5327576	5327598	57.67	47.83		
Product length	192								

#### Products on intended targets

>CP130491.1 *Bacillus cereus* strain T chromosome, complete genome

product length = 192

Forward primer 1 ACAATGCCACAAATCGCAGT 20  
 Template 5270225 ..... 5270244

Reverse primer 1 TACGGCGTCAGCTGTGTATC 20  
 Template 5270416 ..... 5270397

>CP135060.1 *Bacillus cereus* strain B126\_1 chromosome, complete genome

product length = 192

Forward primer 1 ACAATGCCACAAATCGCAGT 20  
 Template 39744 ..... 39725

Reverse primer 1 TACGGCGTCAGCTGTGTATC 20  
 Template 39553 ..... 39572

Рисунок 46 - Система олигонуклеотидов для детекции гена гемолизина  
*Bacillus cereus*

### Энтеротоксин (*HBL/NHE enterotoxin family protein*)

В системе NCBI была определена последовательность гена энтеротоксина для *Bacillus cereus* (рис. 47). Изолированные нами бактериофаги и определенные как кандидатные для бактериофагового препарата потенциально способны передавать данную последовательность с помощью горизонтального переноса генов.

```
>NZ_CP017060.1:1781859-1782938 Bacillus cereus strain FORC_047 chromosome,
complete genome
ATGCAGAAAAGTTT TATAAAAAATGTCTTT TAGCGGTAATGATTGCTGGGGTGGCAACGAGTAACGCAT
TCCCTTTACATCCT TTTGCAGCAGAA CAAAA TGTAAGGTGCTACAAGAAAATGTGAAAACTATT CTCT
TGGACCAGCTGGAT TCCAAGATGTAATGGCA CAAACAACATCAAGTATA TTTGCAATGGATTCATATGCA
AAATTAAT TCAAAA TCAACAAGAGACGGATT TAAGTAAAATAAGTT CGA TTAATAGTGAA TTTAAAAGGA
ATATGATT CAGCAT CAAAAGATGCAAAAAGT TAATGCAGCATA TTGGTT AAATAATATGAAGCCTCAAAT
TATGAAAA CGGATCAAAAATA TTATTAATTACAATAACTTTCCAATCT TATTA TAATGACATGTTAATA
GCGATTGA TCAAAA GGATAGCGGAAAAT TAAAAGCGGATTTAGAAAAGT TGTAT GCGGATATTGTAAGA
ATCAAAAAT GAGGTAGATGGA TTATTAGGAAA TTTGAAAGCTTT TCGCGA TAGAA TGCGGAAAGATA CAAA
TAGTTTCAAAGAGGATACAAAATCAGT TAACAGCGATATTGGCAAGTACGAAATGCTGGTAT TCCAGCTCTA
GAGCAACAAATAAA TACATA TAACGATTCAA TTTAAAAGAGTAATGATA TGGTCATTGCTGGTGGCGTAC
TTTGCGTAGCGCTAATAACA TGTCTT GCTGGCGGGCC GATGAT TGCGGT TGCGAAAAAAGATATCGCAA
TGCAGAAA GAGAAA TCGCCAATTTAAAAGAT AGAATTT CAGGAGCACAA GCAGAAAGTCTT AATTTT GACT
GATGTAAAAAATAAAAACAACAACAT GACAGAAACAATTGATGCAGCAA TTACAGCACTA CAAAACATAT
CAAATCAA TGGTAT ACAGTAGGTGCAAAAATAAATAA TTTACT ACAAAA CGTAAAAGGAA TTTACTC CAGA
AGAGTTTACGTTTA TAAAAGAAGATT TACATACAGCGAAAGAT AGCTGGAAAAGATGTAAGGATTATACA
GAAAAATTACATGAAGGTGT GGCAAAAGTAA
```

Рисунок 47 - Нуклеотидная последовательность гена энтеротоксина  
*HBL/NHE Bacillus cereus*



При множественном выравнивании было выявлено, что последовательность гена, кодирующего энтеротоксин *Bacillus cereus* имеет 97% совпадение с аналогичной последовательностью в гноме *Bacillus thuringiensis* (рис. 48). Это объясняется тем, что последний входит в группу близкородственных видов под общим наименованием «cereus».

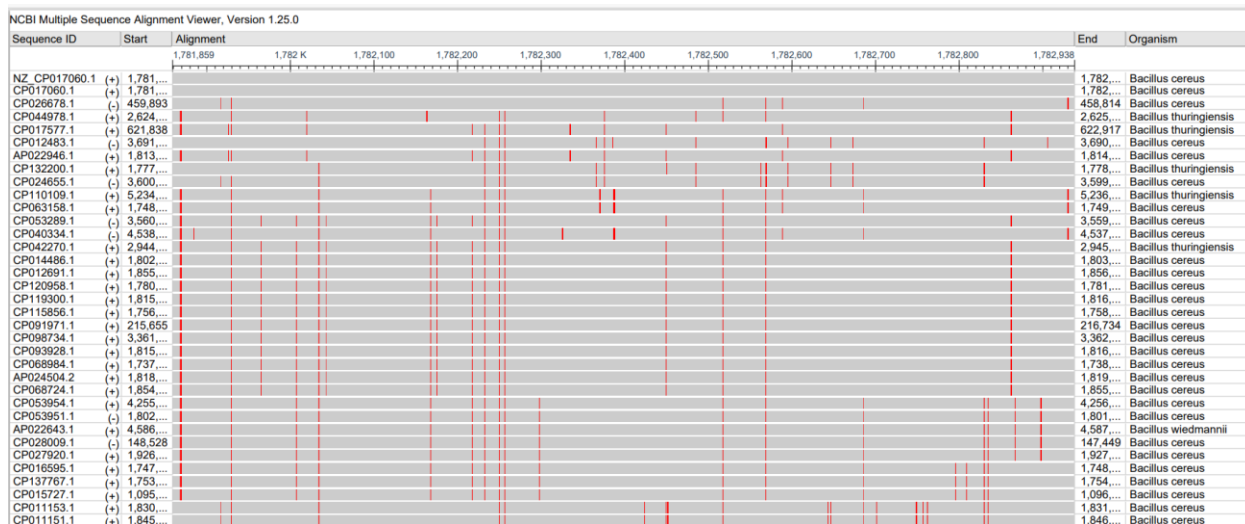


Рисунок 48 - Множественное выравнивание гена энтеротоксина HBL/NHE *Bacillus cereus*

В системе NCBI Primer Blast нами была сконструирована система олигонуклеотидов (праймеров и зонда) (рис. 49-50) для детекции специфической последовательности, характерной для гена энтеротоксина HBL/NHE. В качестве флуоресцентной метки зонда TaqMan для ПЦР в реальном времени был использован краситель VIC с гасителем BHQ-2.

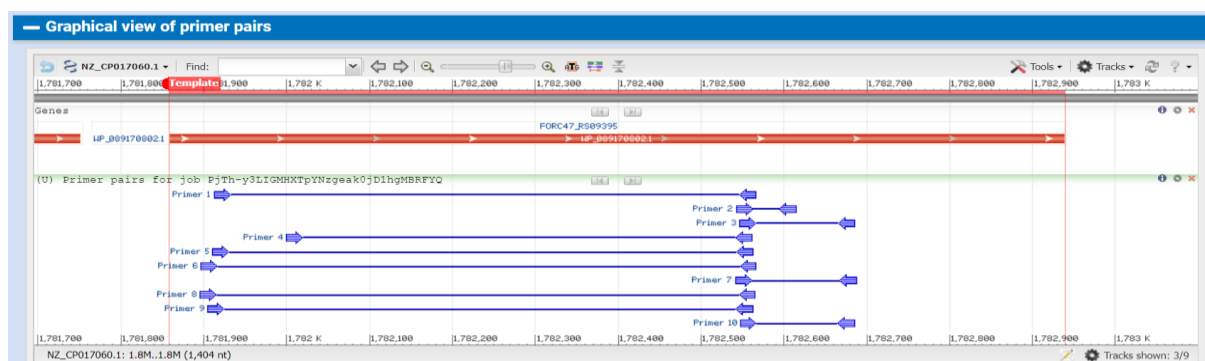


Рисунок 49 - Система олигонуклеотидов для детекции гена энтеротоксина HBL/NHE *Bacillus cereus* (схема фланкирования специфических участков)

#### Primer pair 1

	Sequence (5->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCAACGAGTAACGCATTCCC	Plus	20	1781913	1781932	59.90	55.00	5.00	3.00
Reverse primer	TACGCAAAGTACGCCACCAG	Minus	20	1782566	1782547	60.67	55.00	4.00	1.00
Internal oligo	AGCTTTTCGCGATAGAATGGCGA	Plus	23	1782386	1782408	57.28	47.83		
Product length	654								

#### Products on intended targets

>CP017060.1 *Bacillus cereus* strain FORC\_047, complete genome

product length = 654

Forward primer 1 GCAACGAGTAACGCATTCCC 20  
Template 1781913 ..... 1781932

Reverse primer 1 TACGCAAAGTACGCCACCAG 20  
Template 1782566 ..... 1782547

>CP011153.1 *Bacillus cereus* strain CMCC P0011, complete genome

product length = 654

Forward primer 1 GCAACGAGTAACGCATTCCC 20  
Template 1830324 .....A.....T.. 1830343

Reverse primer 1 TACGCAAAGTACGCCACCAG 20  
Template 1830977 ..... 1830958

Рисунок 50 - Система олигонуклеотидов для детекции гена энтеротоксина  
HBL/NHE *Bacillus cereus*

### Цитотоксин К

В системе NCBI была определена последовательность гена цитотоксина CytK2 для *Bacillus cereus* (рис. 51).

При множественном выравнивании было выявлено, что последовательность гена, кодирующего цитотоксин К имеет аналогию более 96,4% с последовательностью гена цитотоксина ДНК бактерий группы «*cereus*» (рис. 52).

В системе NCBI Primer Blast нами была сконструирована система олигонуклеотидов (праймеров и зонда) (рис. 53-54) для детекции специфической последовательности, характерной для гена CytK2. В качестве флуоресцентной метки зонда TaqMan для ПЦР в реальном времени был использован краситель ROX с гасителем BHQ-2.

```

>NZ_CP017060.1:c1095875-1094865 Bacillus cereus strain FORC_047 chromosome,
complete genome
ATGAATCGTTTCTAAAACATA TTTAAAATGTT TAGCAT TATCCGCTGTTT TTGCTAGTAGCGCTGTAAC TC
TTTCAACACCTGCT GCTTAC GCTCAAACGAC GTCACAAGTTGT AACAGATATCGGACAAAATGCGAAAAC
ACATACGAGCTATAATACAT TTAATAATGAT CAAGCT GATAAT ATGACAATGTC TTTAAAGGTAAC TTTT
ATCGATGACCCCAAGCGCTGA TAAACA GATTG CCGTTA TTAATCAACTGGTAGT TTTCTAAAAGCAATC
CTACTATAAGTGAT GCACCT ATTGAT AACTACCCAAT CCCTGGCGCTAGTGCAACATTAC GTTATCCTTC
ACAATATGATGTTG CATTTAACCTT CAAGATAACAGC GCTCGT TTCTTT AACGTAGCACC TACAAA TGCT
GTAGAAGAAACGAC TGTAACATCTAGCGTAT CTTATCAACTGTGTGGCT CTGTTAAGGCT TCTGTAACGC
CTAATGGACCCGACGGTGAAGCTGGT GCAAC TGGTCAAGTCACT TGGTGGACT CTGTAAGCTATAAACA
AACTAGTTATAAAA CAAATT TAATTGACCAAACAACAAAAACGTAAAA TGGAAACGTATT CTTTAAACGGA
TATAACAATCAAAA CTGGGGTATTTA CACACGTGATT CTTATCATTCTT TATATGAAACCAACTGTTC
TGTA CTCTCGCACA TACCTA TATGAA TCTGATGCAAAAGGTAA TTAATACCGATGGATCAACTCCAGC
ACTAACAAATAGCGGTTTCT CTCTGGTATGATCGCT GTTGT ATCTCT GAAAAAATACAGATCAATCT
AACTTACAAGTCGCTTATACAAAACA CGCCGACGACTACCAACTTCGTC CAGGCTACACATTTGGAAC TG
CAAAC TGGGTTGGAACAACGTAAAA GACGT TGATCAAAAAACATTTAA TAAAT TGTTCACTAGATTG
GAAGAATAAGAAAT TAGTAGAGAAAAATAA

```

Рисунок 51 - Нуклеотидная последовательность гена *CytK2 Bacillus cereus*

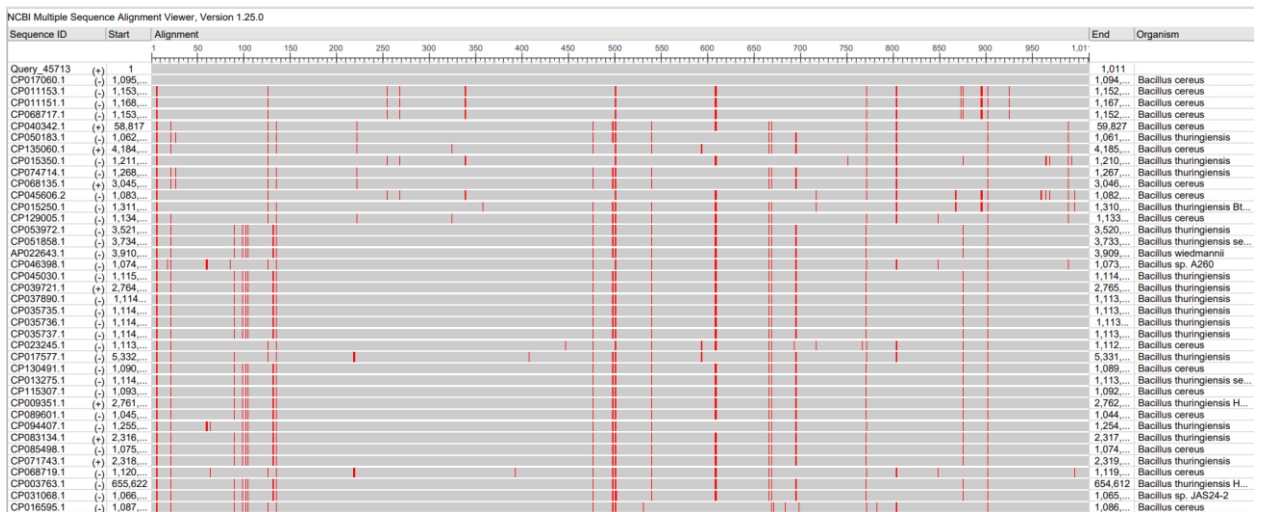


Рисунок 52 - Множественное выравнивание гена *CytK2 Bacillus cereus*

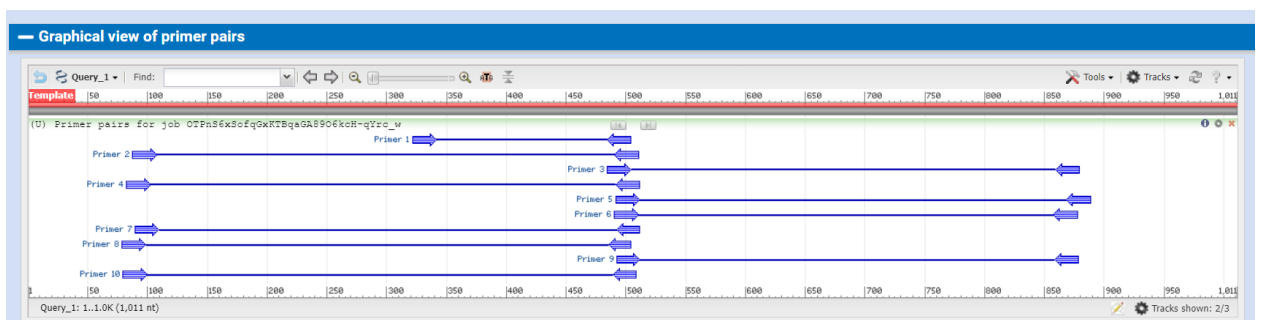


Рисунок 53 - Система олигонуклеотидов для детекции гена *CytK2 Bacillus cereus* (схема фланкирования специфических участков)

**Primer pair 1**

	Sequence (5'->3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGCGTAGTGCAACATTACG	Plus	20	322	341	59.97	55.00	6.00	3.00
Reverse primer	GCTGGGTCCATTAGGCGTTA	Minus	20	504	485	59.82	55.00	4.00	2.00
Internal oligo	GCGCTCGTTTCTTTAACGTAGCACC	Plus	25	386	410	59.20	52.00		
Product length	183								

**Products on intended targets**

>CP017060.1 Bacillus cereus strain FORC\_047, complete genome

product length = 183

Forward primer 1 GCGTAGTGCAACATTACG 20  
 Template 1095554 ..... 1095535

Reverse primer 1 GCTGGGTCCATTAGGCGTTA 20  
 Template 1095372 ..... 1095391

Рисунок 54 - Система олигонуклеотидов для детекции гена CytK2

*Bacillus cereus*

С использованием разработанных праймеров для детекции основных факторов патогенности, которые могут быть в составе генома бактериофагов, специфичных в отношении *Bacillus cereus*, были исследованы геномы кандидатных бактериофагов FBc 216 УлГАУ и FBp 144 УлГАУ (рис. 55-58).

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Ср, Hex	Ср, Rox	
1.	A1	FBc 216 УлГАУ			
2.	A2	FBc 216 УлГАУ			
3.	A3	FBc 216 УлГАУ			
4.	A8	FBp 144 УлГАУ			
5.	A9	FBp 144 УлГАУ			
6.	A10	FBp 144 УлГАУ			
7.	B9	<i>Bacillus cereus</i> (+)	24,0	24,8	25,5
8.	C9	<i>Bacillus cereus</i> (+)	24,1	22,8	
9.	G8	<i>Bacillus cereus</i> (+)	28,3	28,8	

Рисунок 55 - Данные амплификации при детекции гемолизина (FAM),

энтеротоксина HBL/NHE (HEX/VIC), цитотоксина CytK2 (ROX) ДНК

бактериофагов FBc 216 УлГАУ и FBp 144 УлГАУ, специфичных в отношении

*Bacillus cereus* и *Bacillus pumilus* соответственно

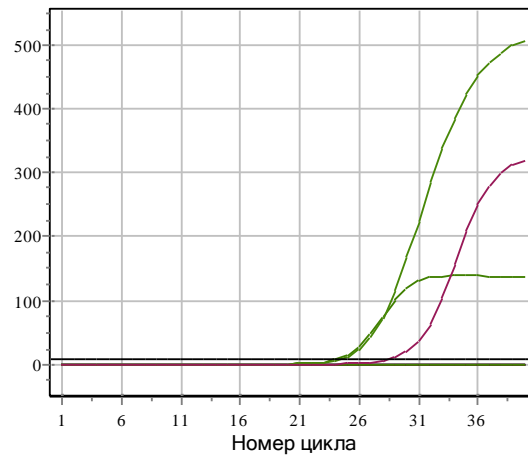


Рисунок 56 - Данные амплификации при детекции гемолизина (FAM), ДНК бактериофагов FBc 216 УЛГАУ и FBp 144 УЛГАУ, специфичных в отношении *Bacillus cereus* и *Bacillus pumilus* соответственно

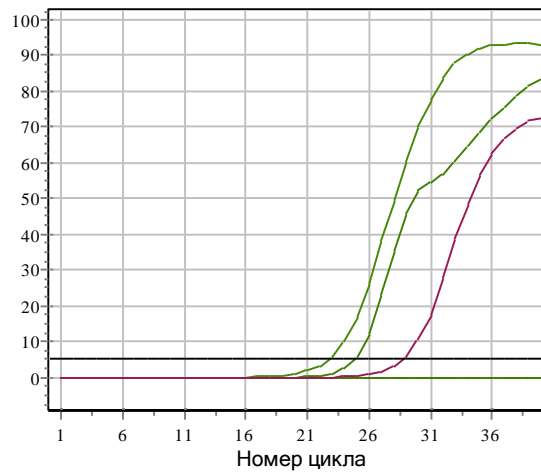


Рисунок 57 - Данные амплификации при детекции энтеротоксина HBL/NHE (HEX/VIC) бактериофагов FBc 216 УЛГАУ и FBp 144 УЛГАУ, специфичных в отношении *Bacillus cereus* и *Bacillus pumilus* соответственно

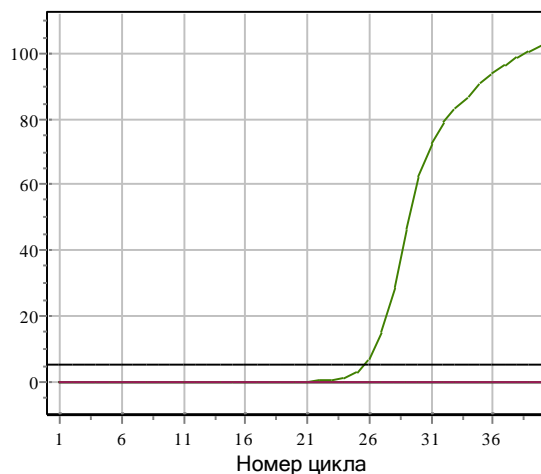


Рисунок 58 - Данные амплификации при детекции цитотоксина CytK2 (ROX) ДНК бактериофагов FBc 216 УлГАУ и FBp 144 УлГАУ, специфичных в отношении *Bacillus cereus* и *Bacillus pumilus* соответственно

В результате экспериментов в геномах бактериофагов FBc 216 УлГАУ и FBp 144 УлГАУ, специфичных в отношении *Bacillus cereus* и *Bacillus pumilus*, фрагментов генов гемолизина, энтеротоксина HBL/NHE и цитотоксина CytK2 не выявлено.

В отношении *Pseudomonas syringae* для детекции специфичных фрагментов генов, кодирующих потенциальные факторы патогенности (коронатина (стаА) и кластер генов, кодирующих фитотоксин некроза растительной ткани сирингопептина (сурС)) были использованы последовательности праймеров, разработанных ранее нашей исследовательской группой [498].

*Для детекции фрагмента гена Коронатина стаА*

Прямой СААТТGCАТСТCGTCGGCTG

Обратный АТТАСАAGCGGCTAACGCCT

Зонд ВНQ-1-ACCACACGACGGCTTTCAGCC-Fam

*Для детекции фрагмента гена Сирингопептина сурС*

Прямой СТТGCАGТTCGТGАТCCAGC

Обратный ТТGCАТCGGТTCGТCCAGTC

Зонд ВНQ-2- TGCGCACTGCАCTGGTCTGG-VIC

Нами были проведены исследования по детекции вышеуказанных генов, кодирующих потенциальные факторы патогенности *Pseudomonas syringae* в геноме бактериофага, отобранного в качестве кандидата для биопрепарата (рис. 59-61).

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Ср, Hex
1	A1	Phage 7ф УлГАУ	
2	A2	Phage 7ф УлГАУ	
3	A3	Phage 7ф УлГАУ	
4	A4	Phage 7ф УлГАУ	
5	A4	Phage 7ф УлГАУ	
6	C1	<i>Pseudomonas syringae</i> (+)	16,2    17,7
7	C2	<i>Pseudomonas syringae</i> (+)	23,0    17,4

Рисунок 59- Данные амплификации при детекции коронатина (стаА) (FAM) и сириногопептина (сурС) (HEX/VIC) ДНК бактериофага Phage 7ф УлГАУ, специфичного в отношении *Pseudomonas syringae*

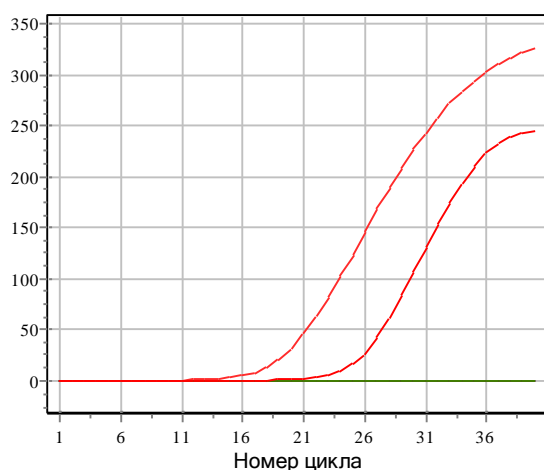


Рисунок 60 - Данные амплификации при детекции коронатина (стаА) (FAM) ДНК бактериофага Phage 7ф УлГАУ, специфичного в отношении *Pseudomonas syringae*

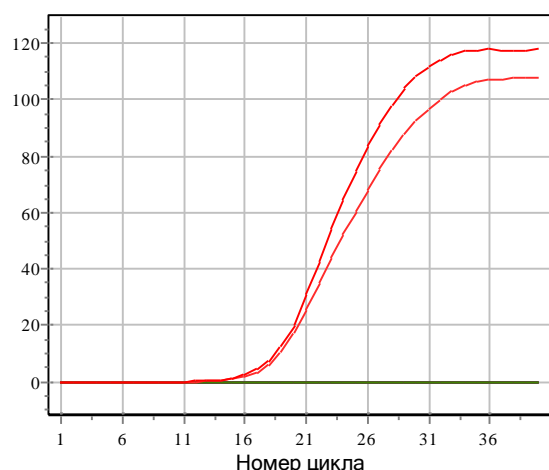


Рисунок 61 - Данные амплификации при детекции сириногопептина (сурС) (HEX/VIC) ДНК бактериофага Phage 7ф УлГАУ, специфичного в отношении *Pseudomonas syringae*

По результатам проведенных экспериментов фрагментов генов коронатина (стаА) и сириногопептина (сурС), кодирующих основные факторы патогенности *Pseudomonas syringae* в геноме изолированных и определенных



нами в качестве кандидатных для разрабатываемого биопрепарата методом ПЦР в реальном времени не выявлено.

### *интерналины inlA*

В системе NCBI нами была определена нуклеотидная последовательность гена *inlA* (рис. 62).

```
>NC_003210.1:454534-456936 Listeria monocytogenes EGD-e chromosome, complete genome
GTGAGAAAAAACGATATGTATGGTTGAAAAGTATACTAGTAGCAATATAGTATTTGGCAGCGGAGTAT
GGATTAACACGAGTAACGGGACAAATGCTCAGGCAGCTACAAT TACACAAGATACTCCTATTAATCAGAT
TTTTACAGATACAGCTCTAGCGGAAAAAATGAAGACGGTCTTAGGAAAAACGAA TGTAAACAGACACGGTC
TCACAAAACAGATCTAGACCAAGTTACACCGCTTCAGGCGGATA GATTAGGGATAAAAATCTATCGATGGAG
TGGAATACCTTGAACAATTTAACACAAATAAA TTTGAGCAATAATCAACTTACGGACATAACGCCACTTAA
AAATTTAACTAAGT TAGTTGATATTTGATGAATAATAATCAAATAGCAGATATAACTCCGCTAGCTAAT
TTGACGAACTCTAACTGGTTT GACTTTGTCAACAATCAGATAACGGATA TAGACCCGCTTAAAAATCTAA
CAAATTTAAATCGGCTAGAACTATCCAGTAA CACGAT TAGTGATATTAGTGCGCTTTTCAGGTTTAACTAG
TCTACAGCAATTATCTTTTGGTAATCAAGTGACAGAT TAAAAACATTAGCTAATTTAACAACTAGAA
CGACTAGATATTTCAAGTAA TAAGGTGTCGGATATTAAGTGTTC TGGCTAAATTAACCAATTTAGAAAGTC
TTATCGCTACTAACAAACAAATAAGT GATATACTCCACTTGGGATTTTAAACAAATTTGGACGAAT TATC
CTTAAATGTAACCAGTTAAAAGATA TAGGCACATTGCGGAGT TTAACAAACCTTACAGATTTAGATTTA
GCAATAAACCAAT TAGTAACTAGCACCAC TGTCGGGTCTAA CAAAACTAACTGAGTTAAAACTTGGAG
CTAACCAATAAGT AACATCAGTCCC TAGCAGGTTTAAACCGCACTCAC TAACTTAGAGCTTAATGAAAA
TCAGCTGGAAGATA TTAGCCCAATTTCTAACCTGAAAAATCTCACATAT TTAACTTTGTACTTTAAATAAT
ATAAGTGATATAAGCCCAGT TTCTAGTTTAA CAAAGCTTCAAAGATTAT TTTTCTATAAT AACAAAGTAA
GTGACGTAAGCTCACTTGCGAACTTAA CAAAATTAATTTGGCTTTCAGCTGGGCATAACCAAAATTAGCGA
TCTTACACCATTTGGCTAATT TAACAA GAATCACCCAACTAGGGTTGAAT GATCAAGCATGGACAAA TGCA
CCAGTAAACTACAAAGCAAA TGTATCATTCCAAAACCGGTGAAAAATGTGACTGGCGCT TTAATTCAC
CAGCTACTATTAGCGATGGCGGTAGT TACACAGAGCC TGATATAACATGGAACTTACCTAGTTATACAAA
TGAAGTAA GCTATACTTTAGCCAAC CTGTCACTATTGGAAAA GGAACGACAACATTTAGTGAACCGTG
ACGACGCCACTTAA GGCAT TTTTAA TGTTAAGTTTCATGTGGACGGCAAAGAAACAACCAAGAA GTGG
AAGCTGGGAATTTATTGACT GAACCACTAAGCCCGTAAAAGAAGGTCA CACATTTGTTGTTGGT TTGA
TGCCCAAA CAGGCGGAAC TAAATGGAATTT CAGTACGGATAAAAATGCCGACAAA TGACATCAATTTATAT
GCACAATTTAGTAT TAACAGCTACACAGCAACCTTTGATAATGACGGGTGTAACAACATCTCAAACAGTAG
ATTATCAAGGCTTGT TACAAGAACCTACGGCACCAACAAAAGAAGGTTA TACTTTTAAAGGCTGGTATGA
CGCAAAAACTGGTGTGACAAGTGGGATTT CGCAACTAGCAAAAATGCCTGCTAAAAACATCACCTTATAT
GCCAATA TAGCGC CAATAGCTATACAGCAACGTTTGATGTTGATGGAAAATCAACGACTCAAGCAGTAG
ACTATCAAGGACTTCTAAAA GAACCAAGGCACCAACGAAAGC GGGATA TACTTTCAAAGGCTGGTATGA
CGAAAAAA CAGATGGGAAAAAATGGGATTTT GCGACGGATAAAAATGCCAGCAAA TGACAT TACGCTGTAC
GCTCAATT TACGAAAAATCC TGTGGCACCACCAACAACTGGAGGGAACA CACCGCCTACAACAAAATAACG
GCGGGAATACTACA CCACCTTCCGCAAAATAT ACCTGGAAGCGACACATC TAACA CATCAA CTGGGAATTC
AGCCAGCA SAACAA GTACAA TGAACGCTTAT GACCCCTATAAT TCAAAA GAAGCTTCACTCCCTACAAC
GGCGATAGCGATAATGCGCTCTACCT TTTGT TAGGGTATTAGCAGTAGGAACTGCAATGGCTCTTACTA
AAAAAGCACGTGCTAGTAAATAG
```

Рисунок 62 - Нуклеотидная последовательность гена *inlA* *Listeria monocytogenes*

При множественном выравнивании выявлено полное соответствие только виду *L. monocytogenes* (рис. 63). Также на основании данного выравнивания были определены консервативные участки данной



последовательности и был выполнен подбор олигонуклеотидных праймеров зондов для реализации детекции методом ПЦР (рис. 64).

### интерналыны *InlB*

В системе NCBI нами была определена нуклеотидная последовательность гена *inlB* (рис. 65).



Рисунок 63 - Множественное выравнивание гена *inlA* *Listeria monocytogenes*

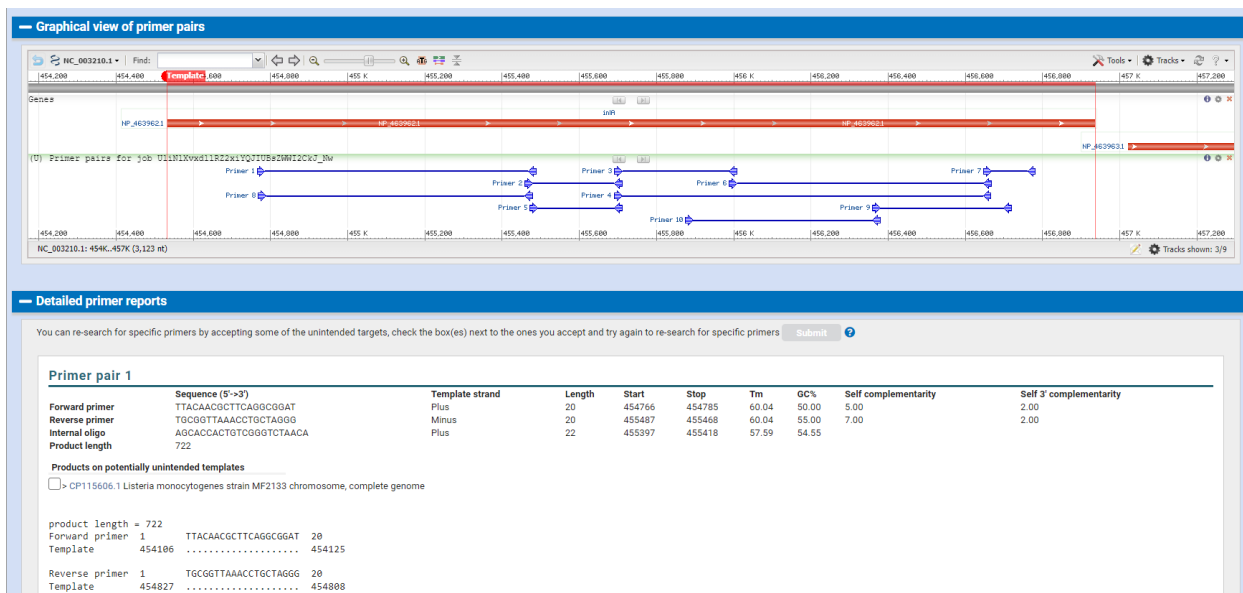


Рисунок 64 - Система олигонуклеотидов для детекции гена *inlA* *Listeria monocytogenes* (схема фланкирования специфичных участков)

>NC\_003210.1:457021-458913 *Listeria monocytogenes* EGD-e chromosome, complete genome

GTGAAAAGAAAAGCAACCCCAAGAAGGAAGTATTGTTTAAATCTCAGGTTTAGCTATTATTTTTAGTTTAT  
GGATAATTATTGAAACGGGGCGAAAGTACAAGCGGAGACTATCACCGTGCCAAAGCCAAATCAAGCAAAT  
TTTTTCAGATGATGCTTTTGCAGAAAACAATCAAAGCAATTTAAAGAAAAAAGTGTGACAGATGCAGTG  
ACACAAAATGAATAAATAGTATAGATCAAATCATTCGGAATAATAGTGATATTAATCCGTTCAAGGAA  
TTTCAGTATTTACCCAATGTGACAAAGTATTTTTAAACGGGAATAAACTAACAGATATAAAGCCCTTAGC  
AAACTTGAAAAATTTAGGATGGCTTTTTTTAGACGAAAATAAAGTTAAGGACCTAAGTTCGCTCAAGGAT  
TTAAAAAATTTAAATCACTTTCTTTGGAGCATAAATGGTATAAGTGATATAAACGGACTTGTTCATTTAC  
CACAGCTGGAAGTTTGTATTGGGAAATAATAAATAACGGATATAACGGTTCTTTCACGTTTAACTAA  
ACTGGATACTTTGTCTCTCGAAGATAACCAATTTAGTGATATTTGTGCCACTTGCCAGTTTAACTAAATG  
CAGAACCTATATTTAAGTAAAAATCACATAAGCGATTTAAGAGCATTAGCAGGACTTAAAAATCTAGATG  
TTTTAGAATTATTTAGCCAAGAAATGTCTTAATAAGCCTATTAATCATCAATCTAATTTGGTTGTTCCGAA  
TACAGTGAAAAACACTGATGGGTGCTTAGTGACTCCAGAAATAAATAGTGATGATGGCGATTATGAAAA  
CCTAATGTTAAATGGCAATTTACCAAGATTTACAAATGAAGTGAATTTTTATTTCTATCAGCCAGTCACTA  
TTGGAAAAGCAAAAAGCAAGATTTTCATGGGAGGTAACCCCAACCCTGAAAGAGGTTTACACAGTAAGTTA  
TGATGTTGATGGAAACGGTAATAAAAAAAAAGTAGAAGCAGGGACGGGATAACTGCACCTAAACCTCCG  
ACTAAACAAGGCTATGTTTTTAAAGGATGGTACTGAAAAAATGGTGGGCATGAGTGGAAATTTAATA  
CGGATATATGTCGGAAATGATTTTACTTTGTACGCGATTTAAAGCGGAAACGACCGAAAAAGCAGT  
CAACTTAACCCGCTATGTCAAATATATTGCGGGAAATGCAGGCTACTACAAACTTCCACGAGAAGATAAC  
TCGCTTAAACAAGAACTCTAGCCTCGCACCGCTGTAAAGCTCTAAGTGTGATAGAGAAGCCCGAAATG  
GCGGAAAATTTAGTACAGGTTAAAAAATATTGGCTGGACTAAAGCGGAAAACCTTTCTTAGACCGATA  
CGATAAAATGGAATATGACAAAGGGTTACCGCTTATGCAAGAGTGAGAAATGCGTCTGGAAATTCGGTT  
TGGACAAAACCTCAACAACAGCCGGCGCTAAACACGTGAATAAGCTATCGGTCTACCAAGGTAATAATA  
TGCGTATCTTGGCGGAAGCCAAAACCAATTAATCATGATGATCAATTTAGCATTTGGTGGTAAAGTAAAT  
TGTTGGGTGATACCCGAGCACTTAACACATTTCTACAAACAAAGCATGGAAAAGCCAAACCGTTTAACT  
CGTTATGTCAGCGCCAATAAAGCTGGCGAATCGTACTATAAAGTCCCGGTAGCAGATAATCCAGTCAAAA  
GGGGTACTTTAGCCAAGTATAAAAATCAAAAGTAAATTTGTTGATGTCAGCAACCATCGAAGGTCAACT  
TTGGTACCGAATAAGGACTAGTTCACCTTTTATTGGTTGGACGAAAGCAGCTAATTTAAGGACACAGAAA  
TAA

Рисунок 65 - Нуклеотидная последовательность гена *inlB* *Listeria monocytogenes*

На рисунке 66 представлены результаты множественного выравнивания гена *inlB*. Определены консервативные участки, а также их потенциальная возможность использования для разработки системы детекции данного гена методом ПЦР.

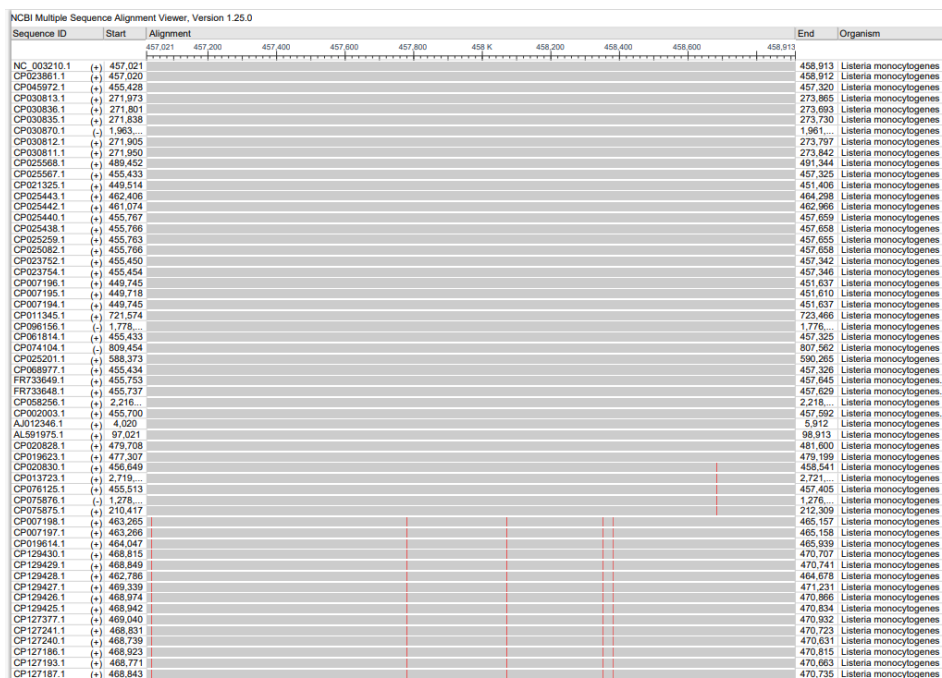


Рисунок 66 - Множественное выравнивание гена *inlB* *Listeria monocytogenes*

Далее был проведен дизайн олигонуклеотидов (праймеров и зондов) (рис. 67).

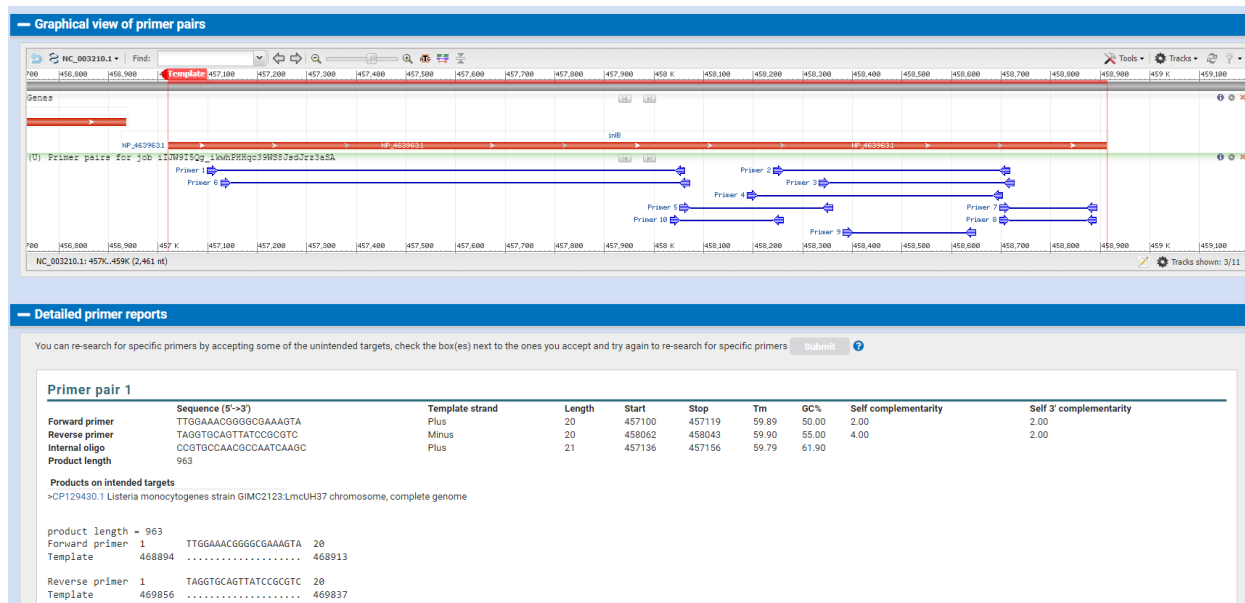


Рисунок 67 - Система олигонуклеотидов для детекции гена *inlB* *Listeria monocytogenes* (схема фланкирования специфичных участков)

### Листеролизин *hly*

В системе NCBI была определена полная нуклеотидная последовательность гена *hly* *Listeria monocytogenes* (рис. 68).

```
>NC_003210.1:205819-207408 Listeria monocytogenes EGD-e chromosome, complete genome
ATGAAAAAAAAAATAGCTAGTTTTTATTACACTTATATTAGTTAGTCTACCAATTGCGCAACAAACTGAAG
CAAAGGATGCATCTGCATTCAATAAAGAAAATTCAAATTCATCCATGGCACCACCAGCATCTCCGCTGC
AAGTCCSTAAGACGCCAATCGAAAAGAAACACGCGGATGAAATCGATAAGTATATACAAGGATTGGATTAC
AATAAAAACCAATGTATTAGTATACCACGGAGATGCAGTGACAAAATGTGCCGCCAAGAAAAGGTTACAAAG
ATGGAAATGAATATATTGTTGTGGAGAAAAAGAAGAAATCCATCAATCAAAAATAATGCAGACATTCAAGT
TGTGAATGCAATTCGAGCCTAACCTATCCAGGTGCTCTCGTAAAAGCGAATTCGGAATTAGTAGAAAAT
CAACCGAGATGTTCTCCCTGTA AAAACGTGATTCATTAACACTCAGCATTGATTTGCCAGGTATGACTAATC
AAGACAATAAAAATCGTTGTA AAAAATGCCACTAAATCAAACGTTAACAAACGCAGTAAATACATTAGTGGA
AAGATGGAATGAAAAATATGCTCAAGCTTATCCTCAATGTAAGTGCAAAAATTTGATTATGATGACGAAATG
GCTTACAGTGAATCACAATTAATGCGAAATTTGGTACAGCATTAAAGCTGTAATAATAGCTTGAATG
TAAACTTCGGCGCAATCAGTGAAGGGAAAAATGCAAGAAGAAGTCATTAGTTTTAAACAAATTTACTATAA
CGTGAATGTTAATGAACCTACAGACCTTCCAGATTTTCGGCAAAGCTGTTACTAAAGAGCAGTTGCAA
CGCTTGGAGTGAATGCAGAAAAATCCTCCTGCATATATCTCAAGTGTGGCGTATGGCCGTCAAGTTTATT
TGAAATATCAACTAATCCCATAGTACTAAAAGTAAAAGCTGCTTTTGATGCTGCCGTAAGCGGAAAAATC
TGTCTCAGGTGATGTAGAACTAACAAATATCATCAAAAATTTCTCCTTCAAAGCCGTAATTTACGGAGGT
TCCGCAAAAGATGAAGTTCAAATCATCGACGGCAACCTCGGAGACTTACGCGATATTTGAAAAAGGCG
CTACTTTTAAATCGAGAAACACCAGGAGTCCCATTGCTTATACAACAAACTTCTAAAAGACAATGAATT
AGCTGTTATTA AAAACAACCTCAGAATATATTGAAAACAACCTCAAAGCTTATACAGATGGA AAAAATTAAC
ATCGATCACTCTGGAGGATACGTTGCTCAATTCACATTTCTGGGATGAAGTAAATATGATCCTGAAG
GTAAACGAAATGTTCAACATAAAAACCTGGAGCGAAAACAATAAAGCAAGCTAGCTCATTTCACATCGTC
CATCTATTTGCCAGGTAACGCGAGAAAATATTAATGTTTACGTA AAGAAATGCACCTGGTTTAGCTTGGGAA
TGGTGGAGAACGGTAATGATGACCGGAACTTACCACCTGTGAAAAATAGAAAATATCTCCATCTGGGGCA
CCACGCTTTATCCGAAATATAGTAATAAAGTAGATAATCCAATCGAATAA
```

Рисунок 68- Нуклеотидная последовательность гена *hly* *Listeria monocytogenes*

Затем было выполнено его множественное выравнивание (рис. 69). Были определены консервативные участки, которые являются потенциальными мишенями для разработки системы детекции данного гена в ПЦР.

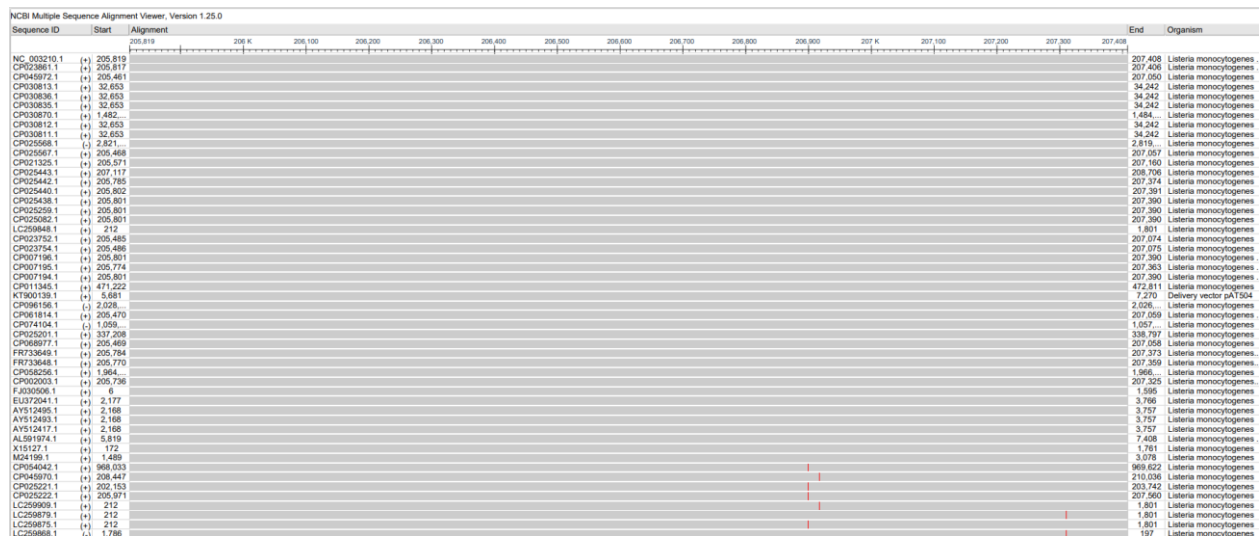


Рисунок 69 - Множественное выравнивание гена *hly* *Listeria monocytogenes*

Далее был проведен подбор и дизайн олигонуклеотидов для детекции данного гена методом ПЦР в реальном времени (рис. 70).

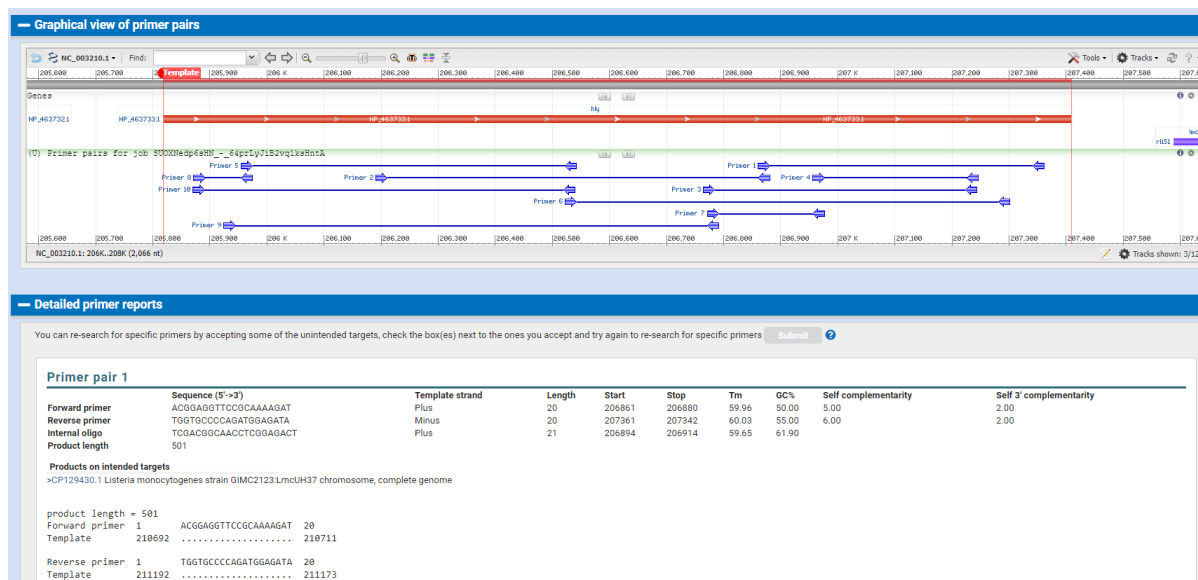


Рисунок 70 - Система олигонуклеотидов для детекции гена *hly* *Listeria monocytogenes* (схема фланкирования специфичных участков)

После синтеза олигонуклеотидов нами были проведены исследования по детекции фрагментов генов *inlA*, *inlB* и *hly* в геноме бактериофага В-13 УлГАУ, активного в отношении *Listeria monocytogenes* (рис. 71-74).

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Ср, Hex	Ср, Rox	
1.	A1	Phage В-13 УлГАУ			
2.	A2	Phage В-13 УлГАУ			
3.	A3	Phage В-13 УлГАУ			
4.	B1	Phage В-13 УлГАУ			
5.	B2	<i>Listeria monocytogenes</i>	23,2	24,2	25,6
6.	B3	<i>Listeria monocytogenes</i>	30,5	18,2	
7.	B4	<i>Listeria monocytogenes</i>	20,5	13,3	

Рисунок 71 - Данные амплификации при детекции *inlA* (FAM), *inlB* (HEX/VIC) и *hly* (ROX) ДНК бактериофага Phage В-13 УлГАУ, специфичного в отношении *Listeria monocytogenes*

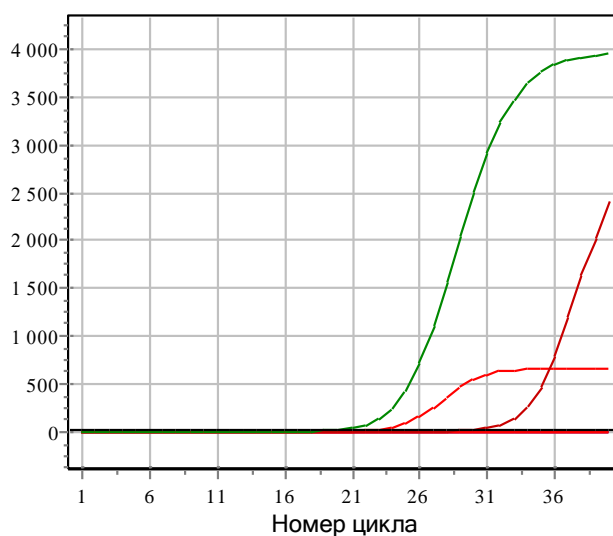


Рисунок 72 - Данные амплификации при детекции *inlA* (FAM) ДНК бактериофага Phage В-13 УлГАУ, специфичного в отношении *Listeria monocytogenes*

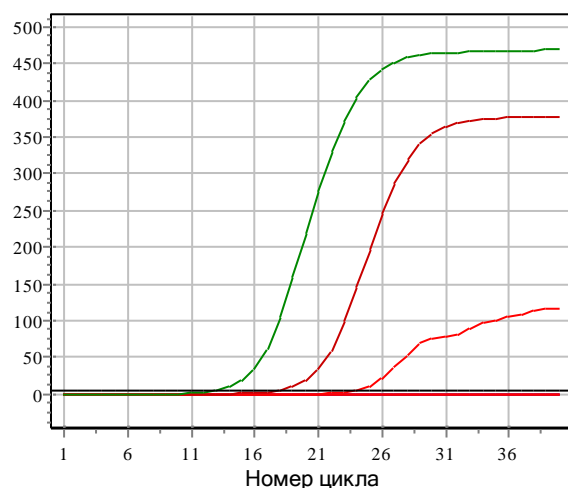


Рисунок 73 - Данные амплификации при детекции *inlB* (HEX/VIC) ДНК бактериофага Phage В-13 УлГАУ, специфичного в отношении *Listeria monocytogenes*

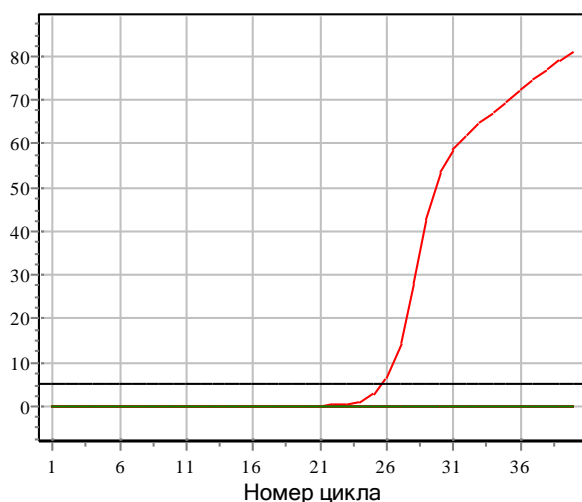


Рисунок 74 - Данные амплификации при детекции *hly* (ROX) ДНК бактериофага Phage В-13 УлГАУ, специфичного в отношении *Listeria monocytogenes*

В результате проведенных исследований в геноме бактериофага В-13 УлГАУ, специфичного в отношении *Listeria monocytogenes*, фрагментов генов, кодирующих основные факторы патогенности *inlA*, *inlB* и *hly* не выявлено.



## энтеротоксин *utxA*

В системе NCBI была определена полная нуклеотидная последовательность гена *utxA* (рис. 75). Затем было проведено множественное выравнивание данного фрагмента генома *Yersinia enterocolitica* (рис. 76). В системе Primer Blast NCBI были сконструированы праймеры и зонд для детекции гена *utxA* методом ПЦР в реальном времени (рис. 77). В качестве флуоресцентной метки определен FAM с гасителем BHQ-1.

```
>NZ_CP107102.1:1912294-1913067 Yersinia enterocolitica strain NW56 chromosome
ATGGGCCGATGTCAGTTAATGATTTTATTGCTTACTTTATGCCTGATAAATTTTAAATAGTAGGGCTAAAC
CACCTGATATTGTCTGGCGTGTGATACTCGTGACCATCATGAAATATTTCAGTCAGGGTTTTTATTCTTC
AGGTGACAATGATCTGGTGCTAGAACACCTTAGTGGTAGAAGCTGCCGTAGTAATATTTACCAACTCGCA
GATAGTGCATTTATTTCTACTACGGCCGACAGAAGTTTTGCTTACGATTATTTAGAAAAGAGTGTTGAAA
ATATAAAAAACGACAATGACCACTGGTCCAAAGGCGTATATTTATCAGATACGAGCTGATACTAATATGTA
TAGTGCAGATCATACCCTGGATTTTTTATTACGACTGGGGGCCAGTGAGATTCAACAGGAGATTTCATCGT
ATTTTTCGTTATGCACCCTACTTATCAGAATGGATGGCCCATCGCAGAGTTTTAGCGGAACAGGTCATGT
CAGCAACTTCATATTTATTGCATCAGGGCAACGTTCTGTTTAAATGGATATATTCCCAACCCTTTCTATCA
ACAAAACCGTTCGAGTGCCAGTATGAATCCTTATCATAGCGCTTTTATTGTGCCTTCAGCGCTGAATATG
ATGCGAACCTGGATGTTAAGAATGGGAATAAGACCTATGATTAGGGCTTGTTTTGGCAGTATGGATTCAA
TAAGTTTCAAACGAAGTCTGGATTCAATTTATAGCGGTTCATGGGAAAATGTTTAAAGCTAGTGGCTATTTT
ATAA
```

Рисунок 75 - Нуклеотидная последовательность гена *utxA* *Yersinia enterocolitica*

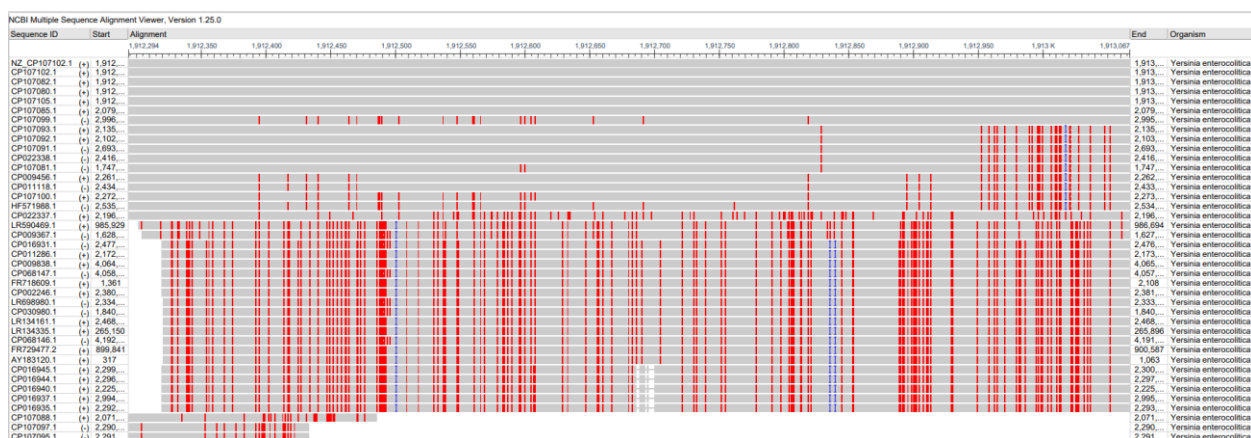


Рисунок 76 - Множественное выравнивание гена *utxA* *Yersinia enterocolitica*

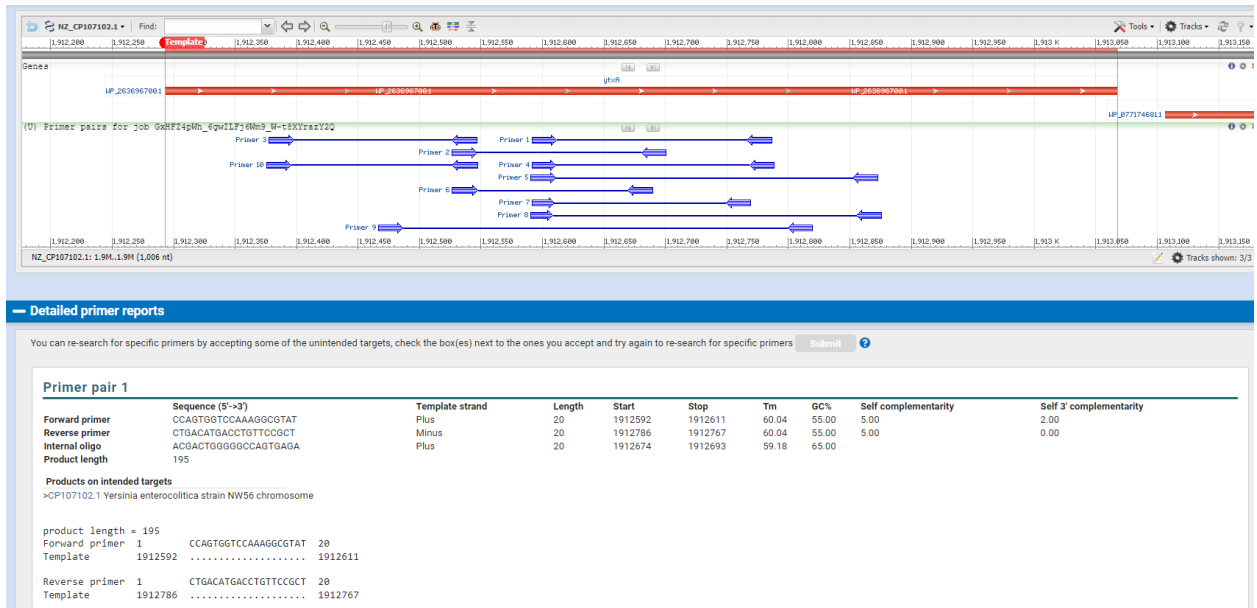


Рисунок 77 - Система олигонуклеотидов для детекции гена *ytxA* *Yersinia enterocolitica* (схема фланкирования специфичных участков)

Относительно гена термостабильного энтеротоксина *ystA* *Yersinia enterocolitica* в системе NCBI была определена его нуклеотидная последовательность (рис. 78) и проведено множественное выравнивание для определения консервативных участков (рис. 79).

```
>CP068146.1:3791415-3791548 Yersinia enterocolitica strain FDAARGOS_1082
chromosome, complete genome
GTCTTCATTGGAGCATTTCGGCCAAGAAACAGTTTCAGGGCAGTTTCAGTGATGCATTATCGACACCAATA
ACCGCTGAGGTATACAAGCAAGCTTGTGATCCTCCGTCGCCACCAGCCGAAGTCAGTAGTGATT
```

Рисунок 78 - Нуклеотидная последовательность гена *ystA* *Yersinia enterocolitica*

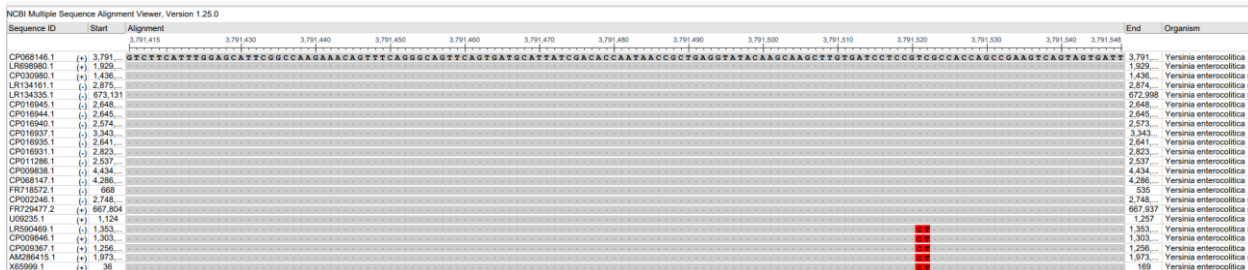


Рисунок 79 - Множественное выравнивание гена *ystA* *Yersinia enterocolitica*



Были сконструированы праймеры (рис. 80) и зонд с флуоресцентной меткой VIC с гасителем BHQ-2.

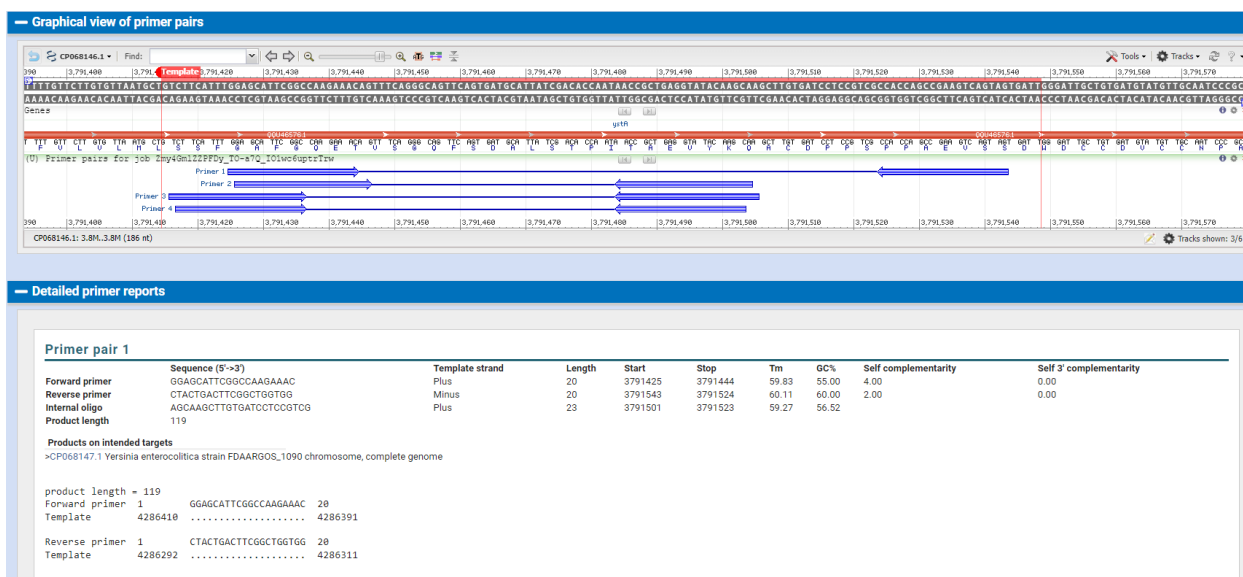


Рисунок 80 - Система олигонуклеотидов для детекции гена *ystA* *Yersinia enterocolitica* (схема фланкирования специфичных участков)

Аналогичные манипуляции были проведены относительно гена *ystB* *Yersinia enterocolitica* (рис. 81-83). В качестве флуоресцентной метки для зонда *ystB* был определен краситель ROX.

```
>NZ_CP107102.1:3247357-3247572 Yersinia enterocolitica strain NW56 chromosome
ATGAAAAAGATAAATATGGCTCTGGTATTAATGCTGTTTTTCATTTTGTACATTAGGCCAAGAGACGGCTT
CAATGCATCTTGATGATACATTATCGGCACCAATAGCCGCTGATATAAACAGAAAAGCGTGCGATACTCA
GACCCCATCGCCTTCAGAAGAAAAATGATGATTGGTGTGTGAGGATGTTGCAATCCTGCCTGTGCGGGT
TGCTAG
```

Рисунок 81 - Нуклеотидная последовательность гена *ystB* *Yersinia enterocolitica*

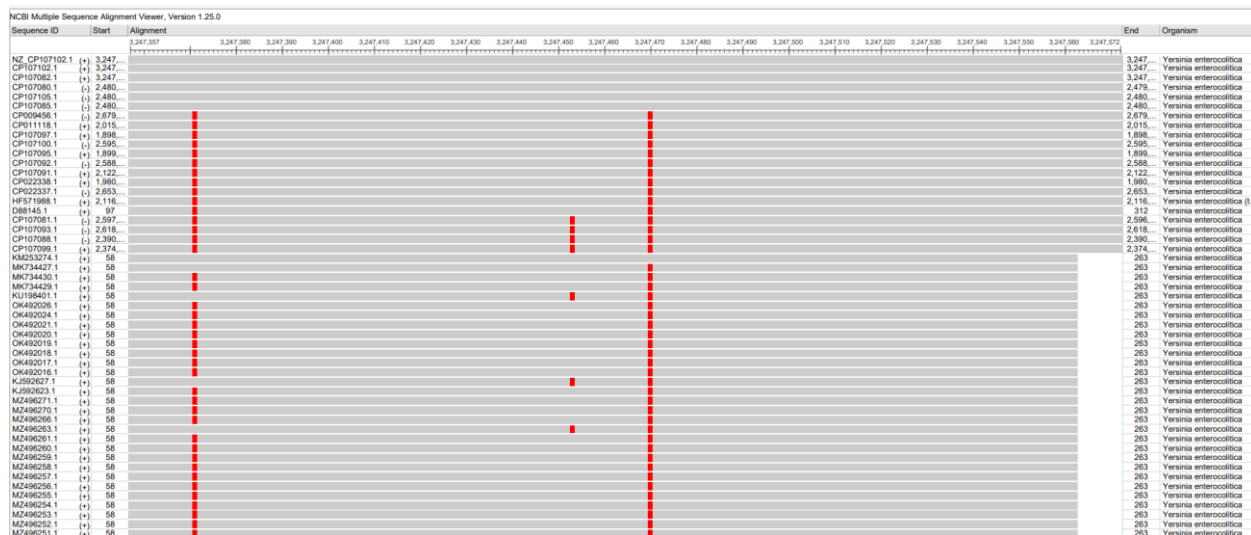


Рисунок 82 - Множественное выравнивание гена *ystB* *Yersinia enterocolitica*

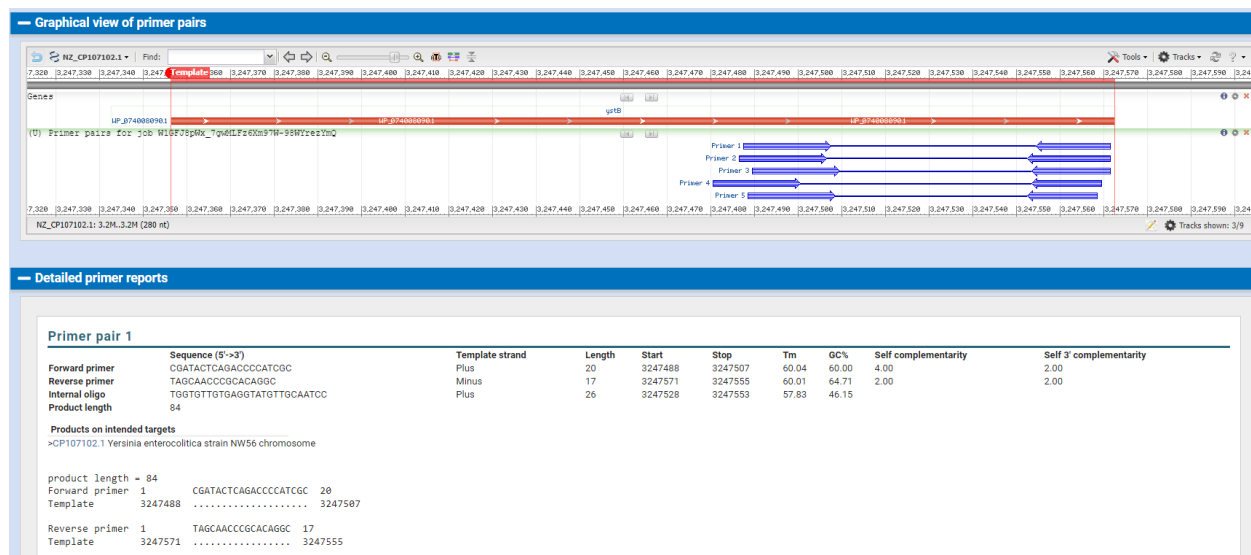


Рисунок 83 - Система олигонуклеотидов для детекции гена *ystB* *Yersinia enterocolitica* (схема фланкирования специфичных участков)

После синтеза и оптимизации праймеров в мультиплексной системе ПЦР в реальном времени нами были проведены эксперименты по детекции специфичных фрагментов генов *ytxA*, *ystA* и *ystB* в геноме изолированного нами бактериофага Y-8 УлГАУ (рис. 84-87), специфичного в отношении *Yersinia enterocolitica* и являющегося кандидатным для разработки комплексного бактериофагового препарата.

Номер лунки	Идентификатор пробирки	Ср, Fam	Ср, Hex	Ср, Rox
1.	A1	Phage Y-8 УлГАУ		
2.	A2	Phage Y-8 УлГАУ		
3.	A3	Phage Y-8 УлГАУ		
4.	A4	Phage Y-8 УлГАУ		
5.	B1	Phage Y-8 УлГАУ		
6.	B2	<i>Yersinia enterocolitica</i> (+ytxA, ystA)	15,1	26,3
7.	B3	<i>Yersinia enterocolitica</i> (+ytxA, ystA)	21,1	29,6
8.	C4	<i>Yersinia enterocolitica</i> (+ystB)		27,4

Рисунок 84 - Данные амплификации при детекции *ytxA* (FAM), *ystA* (HEX/VIC) и *ystB* (ROX) ДНК бактериофага Phage Y-8 УлГАУ, специфичного в отношении *Yersinia enterocolitica*

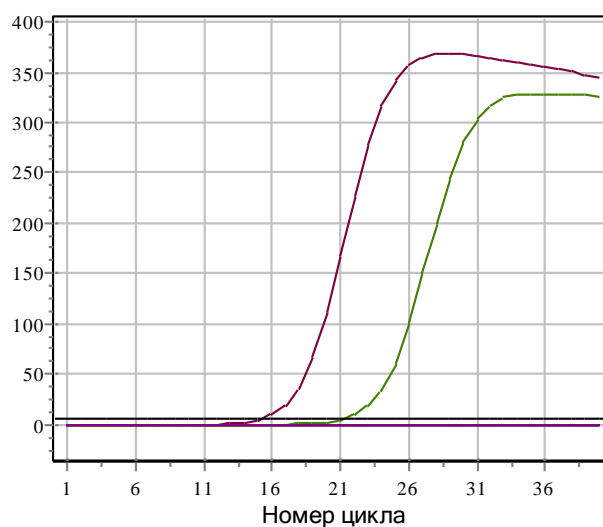


Рисунок 85 - Данные амплификации при детекции *ytxA* (FAM) ДНК бактериофага Phage Y-8 УлГАУ, специфичного в отношении *Yersinia enterocolitica*

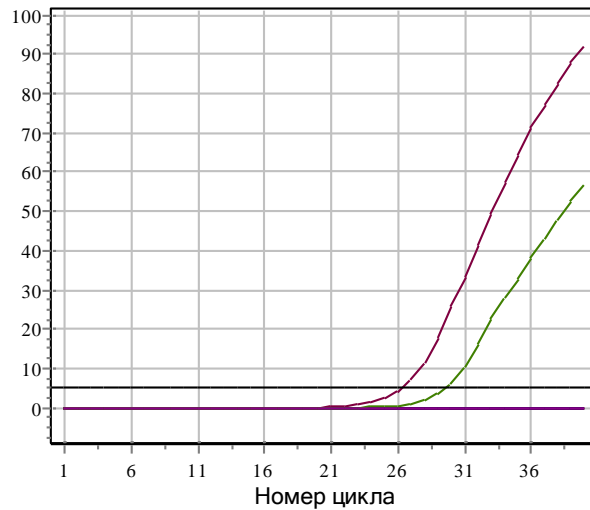


Рисунок 86 - Данные амплификации при детекции *ystA* (HEX/VIC) ДНК бактериофага Phage Y-8 УлГАУ, специфичного в отношении *Yersinia enterocolitica*

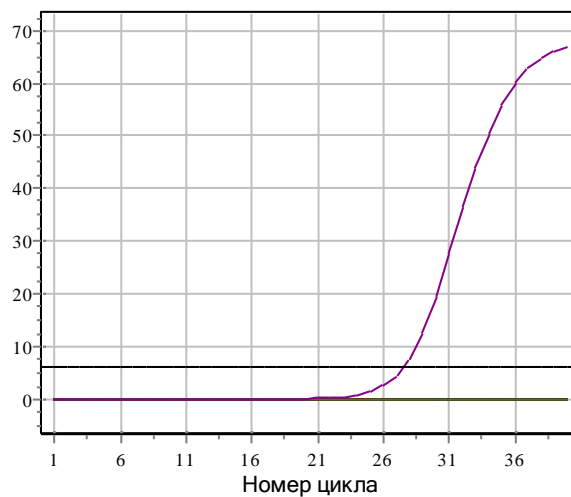


Рисунок 87 - Данные амплификации при детекции *ystB* (ROX) ДНК бактериофага Phage Y-8 УлГАУ, специфичного в отношении *Yersinia enterocolitica*

В результате экспериментов в селектированном бактериофаге Y-8 УлГАУ, специфичном в отношении *Yersinia enterocolitica* специфичных фрагментов, кодирующих основные факторы патогенности *uxtA*, *ystA* и *ystB*, не выявлено.

#### ***2.2.4 Подбор технологических параметров изготовления биопрепарата на основе бактериофагов***

Среди основных свойств бактериофагов, необходимых для их применения в промышленных целях, отмечаются такие показатели, как способ очистки бактериофага от производственной культуры бактерий без изменения его основных биологических свойств, количественное соотношение бактериальной культуры и фага, оптимальное соотношение между активностью фага и временем пассажа, температура культивирования.

Для подбора наилучшего метода очистки бактериофага от производственной культуры с целью конструирования биопрепарата было проведено сравнительное изучение влияния различных методов инактивации бактерий на литическую активность бактериофагов в сравнении с методом фильтрации через мембранные фильтры с величиной пор 0,1 мкм и 0,22 мкм. Отметим, что от использования мембранных фильтров с величиной пор 0,45 мкм было принято решение отказаться, поскольку в проведенных экспериментах после фильтрации был отмечен рост бактериальной культуры.

Для проведения эксперимента в пробирку, содержащую 4,5 мл МПБ, засевали исследуемый бактериофаг (0,2 мл) с исследуемым штаммом бактерий (0,2 мл) и культивировали при оптимальной температуре в течение 24 часов. После чего проводили обработку суспензии трихлорметаном и температурой, в соответствии с ранее полученными оптимальными параметрами и отдельно проводили фильтрацию изучаемой суспензии через мембранные фильтры с величиной пор 0,1 и 0,22 мкм. Далее определяли литическую активность изучаемого бактериофага методом агаровых слоев. Результаты проведенных опытов представлены в таблице 26.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что наиболее предпочтительным методом очистки суспензии от бактериальных клеток является фильтрация через мембранные фильтры с величиной пор 0,22 мкм, поскольку это позволяет сохранить наивысший уровень литической активности. Так, при использовании фильтров с величиной пор 0,1 мкм,

происходит значительное снижение литической активности исследуемых бактериофагов. Возможно, причиной данного явления считаем более быстрое засорение пор, что в итоге приводило к снижению пропускной способности фильтров.

Таблица 26 - Литическая активность бактериофагов после очистки суспензии от бактерий различными методами (БОЕ/мл)

Метод очистки	Штамм бактерий				
	7ф УлГАУ	FBp 144 УлГАУ	B-13 УлГАУ	У-8 УлГАУ	FBc - 216 УлГАУ
Обработка трихлорметаном (1/10, 30 мин)	$1,0 \pm 0,1 \times 10^9$	$2,4 \pm 0,2 \times 10^{10}$	$1,7 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$1,3 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$1,3 \pm 0,2 \times 10^{11}$
Обработка температурой (62 °С, 30 мин)	$2,2 \pm 0,1 \times 10^7$	$2,2 \pm 0,1 \times 10^8$	$1,6 \pm 0,1 \times 10^9$	$2,7 \pm 0,1 \times 10^9$	$2,1 \pm 0,2 \times 10^{10}$
Фильтрация (величина пор 0,1 мкм)	$2,0 \pm 0,2 \times 10^8$	$1,4 \pm 0,1 \times 10^9$	$3,3 \pm 0,1 \times 10^9$	$1,3 \pm 0,1 \times 10^8$	$1,2 \pm 0,2 \times 10^9$
Фильтрация (величина пор 0,22 мкм)	$1,0 \pm 0,1 \times 10^9$	$2,5 \pm 0,2 \times 10^{10}$	$2,1 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$1,8 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$2,2 \pm 0,2 \times 10^{11}$

Обработка температурой также оказала негативное влияние на литическую активность. Наиболее близкие к фильтрации (величина пор 0,22 мкм) показатели литической активности были зафиксированы после обработки суспензий трихлорметаном. В связи с этим в качестве наиболее приемлемого способа очистки суспензии от бактериальных клеток считаем фильтрацию с использованием мембранных фильтров с величиной пор 0,22 мкм, которая позволила добиться наилучшего показателя литической активности исследуемых бактериофагов. Данный метод считаем оптимальным в качестве параметра изготовления фагового биопрепарата.

Следующий этап наших исследований был посвящен определению оптимального соотношения между активностью бактериофага и временем пассажа, для чего в пробирки с МПБ в объеме 4,5 мл добавляли по 0,2 мл

производственной культуры бактерий и 0,2 мл исследуемого бактериофага. Одновременно с этим ставились контрольные пробирки производственной культуры бактерий и отдельно бактериофага. Культивирование проводили в термостате при оптимальной температуре. Время экспозиции подбирали опытным путем начиная с середины экспоненциальной фазы роста бактерий с шагом в 4 ч. После культивирования полученные суспензии, содержащие бактериофаг, фильтровали с применением мембранных фильтров с величиной пор 0,22 мкм и определяли литическую активность по методу Грациа. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 27.

Таблица 27 - Изменение титра бактериофагов с увеличением времени пассирования

Наименование бактериофага	Время пассажа, часы	Литическая активность бактериофага по Грациа, БОЕ/мл
7ф-УлГАУ	8	$1,1 \pm 0,1 \times 10^4$
	12	$1,2 \pm 0,1 \times 10^6$
	16	$1,1 \pm 0,1 \times 10^7$
	20	$1,2 \pm 0,1 \times 10^8$
	24	<b><math>2,4 \pm 0,1 \times 10^9</math></b>
	28	$1,4 \pm 0,1 \times 10^9$
FBp 144 УлГАУ	4	$2,8 \pm 0,2 \times 10^3$
	8	$3,3 \pm 0,2 \times 10^6$
	12	$1,4 \pm 0,2 \times 10^7$
	16	$3,4 \pm 0,2 \times 10^8$
	20	<b><math>2,5 \pm 0,2 \times 10^{10}</math></b>
	24	$2,2 \pm 0,2 \times 10^{10}$
	28	$4,0 \pm 0,2 \times 10^9$
B-13 УлГАУ	6	$1,1 \pm 0,1 \times 10^4$
	10	$2,8 \pm 0,1 \times 10^6$
	14	$4,2 \pm 0,1 \times 10^8$
	18	$3,3 \pm 0,1 \times 10^9$
	22	<b><math>2,1 \pm 0,1 \times 10^{10}</math></b>

	26	$1,8 \pm 0,1 \times 10^{10}$
У-8 УлГАУ	4	$3,9 \pm 0,1 \times 10^4$
	8	$2,8 \pm 0,1 \times 10^6$
	12	$5,1 \pm 0,1 \times 10^7$
	16	$3,2 \pm 0,1 \times 10^9$
	20	$1,7 \pm 0,1 \times 10^{10}$
	24	<b><math>1,8 \pm 0,1 \times 10^{10}</math></b>
	28	$1,2 \pm 0,1 \times 10^{10}$
FBc – 216 УлГАУ	4	$3,3 \pm 0,2 \times 10^5$
	8	$4,8 \pm 0,2 \times 10^7$
	12	$2,4 \pm 0,2 \times 10^8$
	16	$1,1 \pm 0,2 \times 10^9$
	20	$2,2 \pm 0,2 \times 10^{11}$
	24	<b><math>2,3 \pm 0,2 \times 10^{11}</math></b>
	28	$2,0 \pm 0,2 \times 10^{11}$

По результатам проведенных исследований установлено, что оптимальное время культивирования исследуемых бактериофагов при оптимальной температуре находится в пределах 20-24 часов, поскольку в данном диапазоне достигается наивысшая концентрация бактериофага и значительного изменения литической активности не происходит. В связи с эти оптимальным в качестве технологического параметра для изготовления фагового препарата считаем время пассажа 24 ч.

Для определения количественного соотношения фага и производственной культуры в отдельные пробирки с МПБ в объеме 4,5 мл вносили по 0,2 мл исследуемого бактериофага (всего 5 пробирок). После этого в пробирки вносили производственную культуру бактерий при концентрации  $10^7$ - $10^8$  м.к./мл в объеме от 0,2 до 1 мл с шагом 0,2 мл (параметры подбирались экспериментальным путем). Параллельно с этим ставился контроль бактериофага и производственной культуры бактерий. Далее пробирки культивировали в термостате при оптимальной температуре в течение 24 часов. После культивирования содержимое пробирок



фильтровали с применением мембранных фильтров с величиной пор 0,22 мкм и определяли литическую активность по методу Грациа (табл. 28).

Таблица 28 - Зависимость титра бактериофагов от количества производственной культуры бактерий

Количество внесенной индикаторной культуры, мл на 0,2 мл фага	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
Титр бактериофага 7ф-УлГАУ, БОЕ/мл	$1,6 \pm 0,1 \times 10^9$	$1,1 \pm 0,1 \times 10^9$	$1,3 \pm 0,3 \times 10^8$	$2,1 \pm 0,1 \times 10^8$	$1,3 \pm 0,1 \times 10^6$
Титр бактериофага FВр 144 УлГАУ БОЕ/мл	$2,5 \pm 0,2 \times 10^{10}$	$2,4 \pm 0,2 \times 10^{10}$	$2,2 \pm 0,2 \times 10^9$	$1,3 \pm 0,2 \times 10^8$	$2,7 \pm 0,2 \times 10^7$
Титр бактериофага В-13 УлГАУ, БОЕ/мл	$2,1 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$2,0 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$4,1 \pm 0,1 \times 10^9$	$3,2 \pm 0,1 \times 10^7$	$2,7 \pm 0,1 \times 10^7$
Титр бактериофага У-8 УлГАУ, БОЕ/мл	$1,8 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$1,4 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$1,9 \pm 0,1 \times 10^9$	$1,6 \pm 0,1 \times 10^8$	$2,8 \pm 0,1 \times 10^7$
Титр бактериофага FВс – 216 УлГАУ, БОЕ/мл	$2,3 \pm 0,2 \times 10^{11}$	$2,2 \pm 0,2 \times 10^{11}$	$3,1 \pm 0,2 \times 10^{10}$	$4,4 \pm 0,2 \times 10^9$	$2,7 \pm 0,2 \times 10^8$

По результатам проведенных исследований установлено, что наиболее оптимальным соотношением фага и производственной культуры бактерий для исследуемых бактериофагов являются 1:1 и 1:2, о чем свидетельствуют представленные в таблице 28 данные. При данных соотношениях фага и бактериальной культуры были получены очень близкие результаты. В качестве оптимального производственного параметра было выбрано соотношение фага и бактериальной культуры 1:1, поскольку при получении схожих результатов данное соотношение позволяет сэкономить затрачиваемые ресурсы (количество питательной среды).

В дальнейшем для определения оптимальных температурных показателей культивирования исследуемых бактериофагов в пробирки с МПБ

в объеме 4,5 мл отдельно вносили 0,2 мл исследуемого бактериофага и по 0,2 мл культуры бактерий в концентрации  $10^7$ - $10^8$  м.к./мл. Параллельно с этим ставили контрольные пробы производственной культуры и отдельно каждого из бактериофагов. Посевы культивировали в термостате в течение суток при различных температурных режимах от 16 °С до 36 °С с шагом 4 °С (параметры подбирались экспериментально). Результаты проведенных исследований представлены в таблице 29. Наличие лизиса определяли по отсутствию помутнения среды с индикаторной культурой бактерий.

Таблица 29 - Оптимальные температурные показатели культивирования бактериофагов в течение 24 часов

Фаг	Температура культивирования фага					
	16 °С	20 °С	24 °С	28 °С	32 °С	36 °С
	Наличие лизиса					
7ф-УлГАУ	$1,3 \pm 0,1 \times 10^6$	$4,3 \pm 0,3 \times 10^8$	$2,1 \pm 0,1 \times 10^9$	<b><math>2,5 \pm 0,1 \times 10^9</math></b>	$2,2 \pm 0,1 \times 10^8$	$3,3 \pm 0,1 \times 10^6$
FBp 144 УлГАУ	$2,4 \pm 0,2 \times 10^7$	$2,7 \pm 0,2 \times 10^7$	$1,3 \pm 0,2 \times 10^8$	$2,9 \pm 0,2 \times 10^8$	$2,1 \pm 0,2 \times 10^{10}$	<b><math>2,3 \pm 0,2 \times 10^{10}</math></b>
В-13 УлГАУ	$3,1 \pm 0,1 \times 10^7$	$3,1 \pm 0,1 \times 10^9$	<b><math>2,2 \pm 0,1 \times 10^{10}</math></b>	$2,0 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$4,3 \pm 0,1 \times 10^9$	$1,2 \pm 0,1 \times 10^7$
У-8 УлГАУ	$1,7 \pm 0,1 \times 10^8$	$2,9 \pm 0,1 \times 10^9$	$3,2 \pm 0,1 \times 10^9$	$1,5 \pm 0,1 \times 10^{10}$	$1,6 \pm 0,1 \times 10^{10}$	<b><math>1,8 \pm 0,1 \times 10^{10}</math></b>
<i>FBc</i> – 216 УлГАУ	$2,1 \pm 0,2 \times 10^8$	$2,6 \pm 0,2 \times 10^9$	$1,4 \pm 0,2 \times 10^{10}$	$4,2 \pm 0,2 \times 10^{10}$	$1,8 \pm 0,2 \times 10^{11}$	<b><math>2,3 \pm 0,2 \times 10^{11}</math></b>

Проведенные исследования показали, что диапазон оптимальной температуры культивирования исследуемых бактериофагов различается и находится в пределах 24-36°С.

Таким образом, установлены ключевые технологические параметры изготовления биопрепарата на основе бактериофагов 7ф-УлГАУ, FBp 144 УлГАУ, В-13 УлГАУ, У-8 УлГАУ, *FBc* – 216 УлГАУ.

Наилучшим методом очистки суспензии от бактериальных клеток является фильтрация через мембранные фильтры с величиной пор 0,22 мкм.

В качестве оптимального времени пассажа при изготовлении фагового препарата считаем 24 ч, поскольку установлено, что данный параметр отражает оптимальное соотношение полученного результата (литическая активность бактериофага) и затраченного времени на культивирование.

В качестве оптимального соотношения фага и бактериальной культуры принято соотношение 1:1, поскольку при данном параметре получено наилучшее соотношение титра бактериофагов к затрачиваемым на проведение опыта ресурсам.

Оптимальная температура культивирования для изучаемых бактериофагов подбиралась индивидуально и составляет от 24 до 36°C. Подобранные параметры направлены на сохранение активности бактериофагов, что доказано проведенными исследованиями.

Приведенные технологические параметры считаем оптимальными для изготовления дезинфицирующего средства для холодильных камер при хранении томатов и огурцов (разработка современного метода и средства от целевых вредителей, болезней и микроорганизмов).

Действующим веществом биопрепарата является смесь стерильных фильтратов фаголизатов, активных в отношении *Pseudomonas syringae*, *Bacillus pumilus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*. Содержание видоспецифических активных бактериофагов в готовой форме продукта составляет  $10^9$  -  $10^{11}$  БОЕ/мл. Концентрация бактериофаговых частиц подобрана на основании данных научной литературы, собственных исследований, экономической целесообразности с учетом последующего разведения для осуществления эффективной дезинфекции в условиях холодильника. В качестве вспомогательного компонента рецептуры был использован Equilibration Buffer, используемый для смыва фаговых частиц с матраса (табл. 30).

Таблица 30 – Рецепт дезинфицирующего средства для холодильных камер при хранении томатов и огурцов на основе фагов бактерий

Наименование компонента	Частей
Equilibration Buffer	2
Коктейль бактериофагов	3

#### **2.2.4.1 Разработка технологической схемы наработки экспериментальной партии биопрепарата**

Согласно разработанной рецептуре, в процессе получения экспериментально-производственных партий дезинфицирующего средства была отработана пилотная технология производства (табл. 31).

Таблица 31 – Параметры изготовления дезинфицирующего средства

Этап	Процесс
Подготовка стартерных культур системы фаг/бактерия	Лиофилизация штаммов фагов и индикаторных культур с использованием подобранных криопротекторов
Подготовка помещения и оборудования	Проверка работоспособности оборудования и вентиляции, мытье и дезинфекция боксовых помещений, включая обработку воздуха с помощью УФ. Дезинфекция (стерилизация) оборудования.
Подготовка материалов	Мойка и при необходимости стерилизация лабораторной посуды (автоклавирование, сухой жар)
Приготовление питательных сред и растворов	Приготовление общих питательных сред (МПБ, МПА, 0,7% МПА), приготовление специальных питательных сред (контроль стерильности), приготовление растворов (физиологический раствор, буфер). Стерилизация питательных сред при необходимости (в соответствии с инструкцией)
Приготовление и стерилизация	Наслаивание на подложку из плотной питательной среды (МПА) расплавленного полужидкого агара

фаголизатов бактериофагов	(0,7%) с инокулированной в него системой фаг/бактерия в соотношении 1:1. Инкубирование застывших чашек при оптимальной для каждой системы температуре в течении оптимального времени. Смыв верхнего слоя с помощью физиологического раствора (расход 5 мл на 10 см <sup>2</sup> ), центрифугирование и очищение фаголизата с помощью бактериальных фильтров. Проверка титра по методу Грация.
Сведение компонентов биопрепарата	Смешивание полученных отдельно бактериофагов в равных объемах. Приготовление буфера. Смешивание фагового коктейля с буфером в соотношении 3\2.
Розлив и маркировка	Розлив и укупорка биопрепарата в асептических условиях. Маркирование включающее сведения: наименование и местонахождение изготовителя, объем, дату изготовления и дату упаковывания, срок годности и условия хранения, номер партии
Контроль стерильности	Контроль микробиологической чистоты каждой партии биопрепарата на показатели: КМАФАнМ, БГКП, Сальмонеллы, <i>E. Coli</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>

### **2.2.5 Изучение эффективности применения сконструированного полифагового биопрепарата в лабораторных условиях**

В исследованиях эффективности разработанного дезинфицирующего средства использовали, 3 холодильных камеры (Nordfrost), которые ранее не были в эксплуатации. Каждая из холодильных камер использовалась в своем температурном режиме - 4°, 7°C, 25°C. Внутренние поверхности холодильных камер экспериментально контаминировали индикаторными штаммами бактерий *Pseudomonas syringae* Pss3, *Bacillus pumilus* 4, *Listeria monocytogenes* 56, *Yersinia enterocolitica* 7 УлГАУ, *Bacillus cereus* 18 (участок размером 15 на 15 см). После очистки дезинфекции поверхностей 70% этанолом и промывки деионизированной водой их обрабатывали смесью бактерий в концентрации  $10^8$ КОЕ/мл.

Дезинфицирующее средство наносили на поверхности, контаминированные смесью бактериальных культур с помощью распылителя, предварительно откалиброванного для обеспечения заданного объема (120 мкл) при однократном нажатии. Количество дезинфицирующего средства, нанесенного на единицу площади контаминированной поверхности, составило 4 мкл/см.

В качестве контроля использовали контаминированные бактериальными культурами поверхности холодильных камер не обработанные дезинфицирующим средством. В опыте использовали контаминированные бактериальными культурами поверхности холодильных камер обработанные дезинфицирующим средством с концентрацией бактериофагов  $10^8$ БОЕ/мл.

Концентрацию бактерий на опытных и контрольных поверхностях определяли ежедневно в течении 5 суток. Для определения каждой бактериальной культуры отдельно пробы высевали на селективные питательные среды (Кинг В, МYP-агар, PALCAM агар, CIN агар).

Концентрацию клеток определяли путем последовательного 10-ти кратного разведения отобранных смывов участка поверхности. В первую пробирку с 4,5 мл МПБ вносили 0,5 мл смыва с поверхности анализируемого

участка. Далее, во 2 пробирку, также содержащую 4,5 мл МПБ, вносили 0,5 мл содержимого 1 пробирки. Процесс повторяли до 10-ой пробирки, после чего удаляли из нее 0,5 мл для сравнения объемов. Далее 20 мкл каждого разведения в трех повторностях на селективные питательные среды в виде капель. После чего чашки перемещали в термостат и культивировали при соответствующих температурных режимах в течение 24 часов. По истечению суток производился подсчет выросших колоний. Пробирки с разведениями в течении суток сохраняли в условиях холодильника при температуре +2+4°C.

Результаты проведенных исследований представлены на рисунке 88.

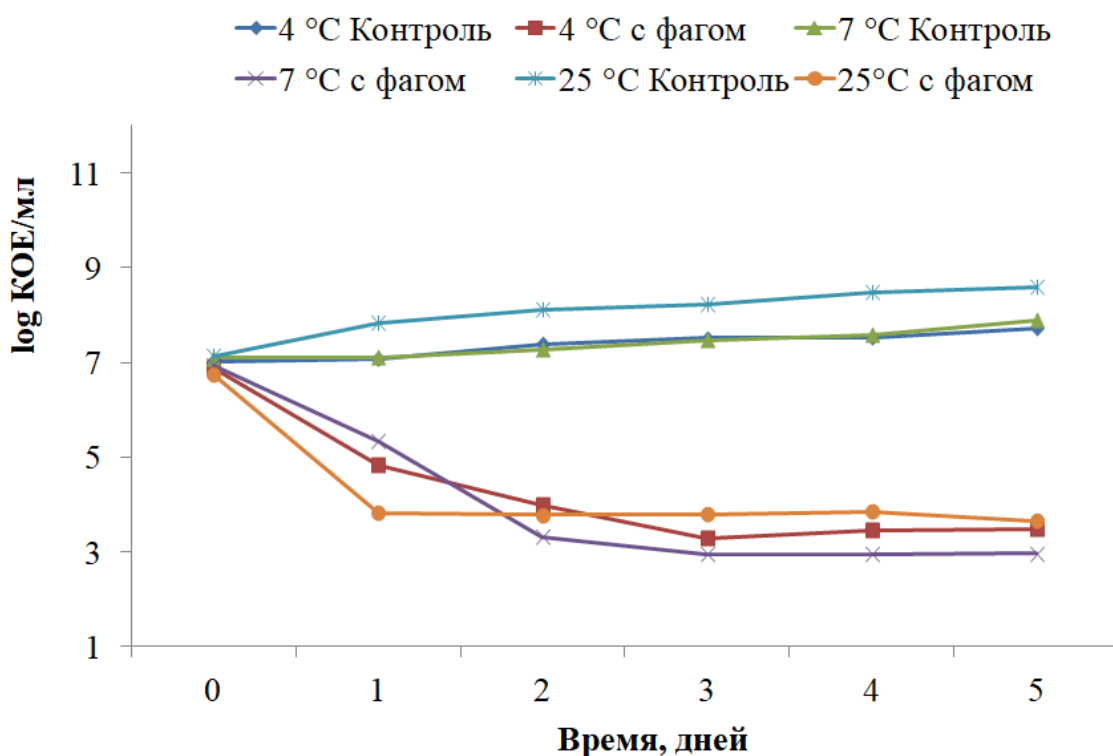


Рисунок 88 - Эффективность дезинфицирующего средства в отношении искусственно контаминированных поверхностей холодильных камер. Образцы инкубировали при 4°C, 7°C и 25°C и *титр* бактериальных культур *Pseudomonas syringae*, *Bacillus pumilus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus* подсчитывали ежедневно. Результаты представлены в виде средних значений.

Установлено, что снижение микробной нагрузки целевых патогенов после обработки дезинфицирующим средством за 5 дней при температуре 4°C происходит на 4,24 log, при 7°C на 5,13 log, при 25°C на 4,95 log, что подтверждает высокую эффективность применения фагового биопрепарата в качестве дезинфицирующего для холодильных камер.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дезинфицирующие средства - это противомикробные средства, которые наносятся на неживые объекты для уничтожения микроорганизмов, процесс которых известен как дезинфекция. Дезинфекция определяется как: очистка изделия от некоторых или всех патогенных организмов, которые могут вызвать инфекцию. Идеальное дезинфицирующее средство также обеспечивало бы полную стерилизацию, не нанося вреда другим формам жизни, было бы недорогим и не вызывало коррозии. К сожалению, идеальных дезинфицирующих средств не существует.

Большинство дезинфицирующих средств также по самой своей природе потенциально вредны (даже токсичны) для человека или животные. К ним следует относиться с надлежащей осторожностью.

Современные дезинфицирующие средства широкого спектра действия относятся к одной из нескольких химических групп: спирты, альдегиды, галогены, окислители, фенолы или четвертичные аммониевые соединения. Было показано, что эти соединения в различной степени являются легковоспламеняющийся, светочувствительными, канцерогенными, вызывающими коррозию металлов, раздражающими слизистые оболочки и/или токсичными для домашнего скота и людей. Кроме того, многие факторы, которые часто связаны с уборкой помещений или мойкой оборудования (например, жесткая вода, органические загрязнения или моющие средства), могут снизить или даже вовсе свести на нет эффективность химических дезинфицирующих средств. Важно отметить, что исследования показали, что эти широко используемые дезинфицирующие средства могут способствовать образованию мутантных штаммов бактерий со сниженной чувствительностью к биоцидам и антибиотикам без ущерба для вирулентности. Однако в настоящее время очень мало работ направленных на оценку эффективности бактериофагов как средств для биологической дезинфекции при производстве и хранении пищевых продуктов.

В ходе проведенного исследования было проанализировано 473 пробы почвы, воды, кормов растительного и животного происхождения, молочной, мясной и растительной продукции. Выделено и идентифицировано 217 штаммов бактерий, включая *Pseudomonas syringae* – 12, *Bacillus cereus* – 82 штамма, *Bacillus pumilus* – 74, *Listeria monocytogenes* – 16, *Yersinia enterocolitica* – 33. Получены данные о степени распространения искомым бактерий в объектах внешней среды. Установлено, что совокупный процент контаминации растительной продукции (томаты, огурцы, цуккини, картофель, салаты, злаковые, бобовые, специи) составил 70%.

Из различных объектов санитарно-эпидемиологического надзора выделено и селекционировано 26 вирулентных бактериофагов активных в отношении *Pseudomonas syringae* – 7, *Bacillus cereus* – 8 штамма, *Bacillus pumilus* – 4, *Listeria monocytogenes* – 3, *Yersinia enterocolitica* – 4 и изучены их биологические свойства литическая активность, спектр литического действия, специфичность, влияние факторов внешней среды, урожайность.

По результатам проведенных экспериментов отобрано 5 бактериофагов: 7ф УлГАУ, FВр 144 УлГАУ, В-13 УлГАУ, Y-8 УлГАУ, FВс - 216 УлГАУ с заданными биологическими свойствами – 100 % специфичность, максимально высокий титр литической активности, широкий спектр литического действия, сохранение показателя литической активности при хранении, отсутствие в геноме производственно-перспективных бактериофагов «локусов патогенности».

Подбораны технологические параметры изготовления биопрепарата на основе бактериофагов 7ф УлГАУ, FВр 144 УлГАУ, В-13 УлГАУ, Y-8 УлГАУ, FВс - 216 УлГАУ. Установлено оптимальное соотношение фага и индикаторной культуры, время культивирования, оптимальный температурный режим, способ очистки бактериофага от бактериальной культуры индивидуально для каждого бактериофага. На основании полученных данных разработана рецептура дезинфицирующего средства и технологическая схема наработки его экспериментальной партии.

Изучена эффективность разработанного дезинфицирующего средства в отношении искусственно контаминированных поверхностей холодильных камер при различных температурных режимах 4°C, 7°C и 25°C. Установлено, что снижение микробной нагрузки целевых патогенов после обработки дезинфицирующим средством за 5 дней при температуре 4°C происходит на 4,24 log, при 7°C на 5,13 log, при 25°C на 4,95 log, что подтверждает высокую эффективность применения фагового биопрепарата в качестве дезинфицирующего средства для холодильных камер.

Разработаны «Методические рекомендации по изготовлению фагового биопрепарата (*Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*) для биологической дезинфекции холодильных камер при хранении овощей (томаты, огурцы)» и «Методические рекомендации по применению фагового биопрепарата (*Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*) для биологической дезинфекции холодильных камер при хранении овощей (томаты, огурцы)».

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ЛИТЕРАТУРНЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Hendrix, R. W. Bacteriophages: Evolution of the Majority / R. W. Hendrix // *Theoretical Population Biology*. – 2002. – Vol. 61, No. 4. – P. 471-480. – DOI 10.1006/tpbi.2002.1590. – EDN LYWJEJ.
2. Hendrix R. W. et al. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage // *Horizontal gene transfer*. – Academic Press, 2002. – С. 133-VI. – DOI 10.1016/B978-012680126-2/50016-5.
3. Mushegian A. R. Are there 10<sup>31</sup> virus particles on earth, or more, or fewer? // *Journal of bacteriology*. – 2020. – Т. 202. – №. 9. – DOI 10.1128/jb.00052-20.
4. Casjens, S. The diverse and dynamic structure of bacterial genomes / S. Casjens // *Annual Review of Genetics*. – 1998. – Vol. 32. – P. 339-377. – DOI 10.1146/annurev.genet.32.1.339. – EDN LMPUMT.
5. Изучение эффективности и безопасности применения антимикробных средств / В. В. Багаева, В. М. Попова, Г. С. Пашкова [и др.] // *Исследования и практика в медицине*. – 2015. – Т. 2, № 3. – С. 35-42. – DOI 10.17709/2409-2231-2015-2-3-35-42. – EDN UJDPPH.
6. Габрелян, П. И. Применение «Фагодерма» в клинической практике / П. И. Габрелян, А. А. Моисеев // *Week of Russian science (WeRuS-2023)* : Сборник материалов XII Всероссийской недели науки с международным участием, посвященной Году педагога и наставника, Саратов, 18–21 апреля 2023 года / Редколлегия: Н.А. Наволокин, А.М. Мыльников, А.С. Федонников. – Саратов: Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского, 2023. – С. 347. – EDN HOZURA.

7. López-Cuevas O. et al. Bacteriophage applications for fresh produce food safety //International Journal of Environmental Health Research. – 2021. – T. 31. – №. 6. – C. 687-702. – DOI 10.1080/09603123.2019.1680819
8. Garvey M. Bacteriophages and Food Production: Biocontrol and Bio-Preservation Options for Food Safety //Antibiotics. – 2022. – T. 11. – №. 10. – C. 1324. – DOI 10.3390/antibiotics11101324
9. Jun J. W. et al. Eating oysters without risk of vibriosis: application of a bacteriophage against *Vibrio parahaemolyticus* in oysters //International journal of food microbiology. – 2014. – T. 188. – C. 31-35. – DOI 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.007
10. Swift S. M. et al. Thermophile lytic enzyme fusion proteins that target *Clostridium perfringens* //Antibiotics. – 2019. – T. 8. – №. 4. – C. 214. – DOI 10.3390/antibiotics8040214.
11. Gutierrez D. et al. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5 //PloS one. – 2014. – T. 9. – №. 9. – C. e107307. – DOI 10.1371/journal.pone.0107307.
12. Issabekov S. S. et al. Prospects of bacteriophage collections in disinfectant applications //Veterinary World. – 2022. – T. 15. – №. 1. – C. 220. - DOI 10.14202/vetworld.2022.220-231.
13. Almeida R. P. P. Emerging plant disease epidemics: Biological research is key but not enough //PLoS biology. – 2018. – T. 16. – №. 8. – C. e2007020.
14. Almeida R. P. P. Emerging plant disease epidemics: Biological research is key but not enough //PLoS biology. – 2018. – T. 16. – №. 8. – C. e2007020.

15. Bernardo P. et al. Geometagenomics illuminates the impact of agriculture on the distribution and prevalence of plant viruses at the ecosystem scale //The ISME journal. – 2018. – T. 12. – №. 1. – C. 173-184.
16. Cacciola S. O., Gullino M. L. Emerging and re-emerging fungus and oomycete soil-borne plant diseases in Italy //Phytopathologia Mediterranea. – 2019. – T. 58. – №. 3. – C. 451-472.
17. Castro-Moretti F. R. et al. Metabolomics as an emerging tool for the study of plant–pathogen interactions //Metabolites. – 2020. – T. 10. – №. 2. – C. 52.
18. Filipiak A. et al. Molecular variation among virulent and avirulent strains of the quarantine nematode *Bursaphelenchus xylophilus* //Molecular Genetics and Genomics. – 2021. – T. 296. – №. 2. – C. 259-269.
19. Fones H. N. et al. Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens //Nature Food. – 2020. – T. 1. – №. 6. – C. 332-342.
20. Mansfield J. et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology //Molecular plant pathology. – 2012. – T. 13. – №. 6. – C. 614-629.
21. Mitra D. Emerging plant diseases: research status and challenges //Emerging trends in plant pathology. – 2021. – C. 1-17.
22. Ristaino J. B. et al. The persistent threat of emerging plant disease pandemics to global food security //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2021. – T. 118. – №. 23. – C. e2022239118.
23. Subbarao K. V., Sundin G. W., Klosterman S. J. Focus issue articles on emerging and re-emerging plant diseases //Phytopathology. – 2015. – T. 105. – №. 7. – C. 852-854.
24. Buttmer C. et al. Bacteriophages and bacterial plant diseases //Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 34.

25. Chandra H. et al. Antimicrobial resistance and the alternative resources with special emphasis on plant-based antimicrobials—a review //Plants. – 2017. – T. 6. – №. 2. – C. 16.
26. Glibota N. et al. Copper tolerance and antibiotic resistance in soil bacteria from olive tree agricultural fields routinely treated with copper compounds //Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2019. – T. 99. – №. 10. – C. 4677-4685.
27. Ishikawa K. et al. Bacterial effector modulation of host E3 ligase activity suppresses PAMP-triggered immunity in rice //Nature communications. – 2014. – T. 5. – №. 1. – C. 5430.
28. La Torre A., Iovino V., Caradonia F. Copper in plant protection: Current situation and prospects //Phytopathologia Mediterranea. – 2018. – T. 57. – №. 2. – C. 201-236.
29. Shidore T. et al. The effector AvrRxo1 phosphorylates NAD in planta //PLoS Pathogens. – 2017. – T. 13. – №. 6. – C. e1006442.
30. Sundin G. W., Wang N. Antibiotic resistance in plant-pathogenic bacteria //Annual Review of phytopathology. – 2018. – T. 56. – C. 161-180.
31. Kortright K. E. et al. Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria //Cell host & microbe. – 2019. – T. 25. – №. 2. – C. 219-232.
32. Hyun J. W. et al. Mode of action of streptomycin resistance in the citrus canker pathogen (*Xanthomonas smithii* subsp. *citri*) in Jeju Island //The Plant Pathology Journal. – 2012. – T. 28. – №. 2. – C. 207-211.
33. Lee J. H. et al. Comparative analysis of Korean and Japanese strains of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* causing bacterial canker of kiwifruit //The plant pathology Journal. – 2005. – T. 21. – №. 2. – C. 119-126.

34. Tancos K. A., Cox K. D. Exploring diversity and origins of streptomycin-resistant *Erwinia amylovora* isolates in New York through CRISPR spacer arrays //Plant Disease. – 2016. – T. 100. – №. 7. – C. 1307-1313.
35. Xu Y., Luo Q., Zhou M. Identification and characterization of integron-mediated antibiotic resistance in the phytopathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* //PloS one. – 2013. – T. 8. – №. 2. – C. e55962.
36. Adrees M. et al. The effect of excess copper on growth and physiology of important food crops: a review //Environmental Science and Pollution Research. – 2015. – T. 22. – C. 8148-8162.
37. Costa M. B. et al. Accumulation and effects of copper on aquatic macrophytes *Potamogeton pectinatus* L.: Potential application to environmental monitoring and phytoremediation //Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2018. – T. 155. – C. 117-124.
38. Keller A. A. et al. Comparative environmental fate and toxicity of copper nanomaterials //NanoImpact. – 2017. – T. 7. – C. 28-40.
39. Lamichhane J. R. et al. Thirteen decades of antimicrobial copper compounds applied in agriculture. A review //Agronomy for Sustainable Development. – 2018. – T. 38. – C. 1-18.
40. Lushchak V. I. et al. Pesticide toxicity: a mechanistic approach //EXCLI journal. – 2018. – T. 17. – C. 1101.
41. Yadav H., Kumar R., Sankhla M. S. Residues of pesticides and heavy metals in crops resulting in toxic effects on living organism //J. Seybold Rep. – 2020. – T. 1533. – C. 9211.
42. Brewer G. J. Copper toxicity in Alzheimer's disease: cognitive loss from ingestion of inorganic copper //Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2012. – T. 26. – №. 2-3. – C. 89-92.



43. Keenan J. et al. Copper toxicity of inflection point in human intestinal cell line Caco-2 dissected: Influence of temporal expression patterns //In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal. – 2021. – T. 57. – C. 359-371.
44. Roychoudhury S. et al. Copper-induced changes in reproductive functions: in vivo and in vitro effects //Physiological research. – 2016. – T. 65. – №. 1.
45. Tang H. et al. Effects and mechanism of nano-copper exposure on hepatic cytochrome P450 enzymes in rats //International Journal of Molecular Sciences. – 2018. – T. 19. – №. 7. – C. 2140.
46. Abolaji A. O. et al. Curcumin attenuates copper-induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster* //Toxicology reports. – 2020. – T. 7. – C. 261-268.
47. Halmenschelager P. T., da Rocha J. B. T. Biochemical CuSO<sub>4</sub> Toxicity in *Drosophila melanogaster* depends on sex and developmental stage of exposure //Biological trace element research. – 2019. – T. 189. – C. 574-585.
48. Nikolić T. V. et al. Laboratory bioassays on the response of honey bee (*Apis mellifera* L.) glutathione S-transferase and acetylcholinesterase to the oral exposure to copper, cadmium, and lead //Environmental Science and Pollution Research. – 2019. – T. 26. – C. 6890-6897.
49. Cao Q. et al. Combined toxicity of microcystin-LR and copper on lettuce (*Lactuca sativa* L.) //Chemosphere. – 2018. – T. 206. – C. 474-482.
50. Lin M. Z., Jin M. F. Soil Cu contamination destroys the photosynthetic systems and hampers the growth of green vegetables //Photosynthetica. – 2018. – T. 56. – C. 1336-1345.
51. Rajput V. et al. Toxicity of copper oxide nanoparticles on spring barley (*Hordeum sativum distichum*) //Science of the Total Environment. – 2018. – T. 645. – C. 1103-1113.

52. Tahjib-Ul-Arif M. et al. Comparative effects of ascobin and glutathione on copper homeostasis and oxidative stress metabolism in mitigation of copper toxicity in rice //Plant Biology. – 2021. – T. 23. – C. 162-169.

53. Griffin K. et al. Copper-tolerance in *Pseudomonas syringae* pv. tomato and *Xanthomonas* spp. and the control of diseases associated with these pathogens in tomato and pepper. A systematic literature review //Crop Protection. – 2017. – T. 96. – C. 144-150.

54. Behlau F. et al. Copper resistance genes from different xanthomonads and citrus epiphytic bacteria confer resistance to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* //European Journal of Plant Pathology. – 2012. – T. 133. – C. 949-963.

55. Colombi E. et al. Evolution of copper resistance in the kiwifruit pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* through acquisition of integrative conjugative elements and plasmids //Environmental Microbiology. – 2017. – T. 19. – №. 2. – C. 819-832.

56. Richard D. et al. Adaptation of genetically monomorphic bacteria: evolution of copper resistance through multiple horizontal gene transfers of complex and versatile mobile genetic elements //Molecular Ecology. – 2017. – T. 26. – №. 7. – C. 2131-2149.

57. Richard D. et al. First report of copper-resistant *Xanthomonas citri* pv. *citri* pathotype A causing Asiatic citrus canker in Réunion, France //Plant Disease. – 2017. – T. 101. – №. 3. – C. 503.

58. Zhang S. et al. Assessment of copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, the pathogen of halo blight on snap bean //Crop Protection. – 2017. – T. 98. – C. 8-15.

59. Álvarez B., López M. M., Biosca E. G. Biocontrol of the major plant pathogen *Ralstonia solanacearum* in irrigation water and host plants by novel

waterborne lytic bacteriophages //Frontiers in Microbiology. – 2019. – T. 10. – C. 2813.

60. Dy R. L., Rigano L. A., Fineran P. C. Phage-based biocontrol strategies and their application in agriculture and aquaculture //Biochemical Society Transactions. – 2018. – T. 46. – №. 6. – C. 1605-1613.

61. Holtappels D. et al. The future of phage biocontrol in integrated plant protection for sustainable crop production //Current Opinion in Biotechnology. – 2021. – T. 68. – C. 60-71.

62. Nakayinga R. et al. Xanthomonas bacteriophages: A review of their biology and biocontrol applications in agriculture //BMC microbiology. – 2021. – T. 21. – №. 1. – C. 1-20.

63. Svircev A., Roach D., Castle A. Framing the future with bacteriophages in agriculture //Viruses. – 2018. – T. 10. – №. 5. – C. 218.

64. Vu N. T., Oh C. S. Bacteriophage usage for bacterial disease management and diagnosis in plants //The Plant Pathology Journal. – 2020. – T. 36. – №. 3. – C. 204.

65. Kennelly M. M. et al. Pseudomonas syringae diseases of fruit trees: progress toward understanding and control //Plant disease. – 2007. – T. 91. – №. 1. – C. 4-17.

66. Buttimer C. et al. Bacteriophages and bacterial plant diseases //Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 34.

67. Hirano S. S., Upper C. D. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on Pseudomonas syringae—a pathogen, ice nucleus, and epiphyte //Microbiology and molecular biology reviews. – 2000. – T. 64. – №. 3. – C. 624-653.

68. Monteil C. L. et al. Population-genomic insights into emergence, crop adaptation and dissemination of *Pseudomonas syringae* pathogens //Microbial genomics. – 2016. – T. 2. – №. 10.
69. Monteil C. L. et al. Nonagricultural reservoirs contribute to emergence and evolution of *Pseudomonas syringae* crop pathogens //New Phytologist. – 2013. – T. 199. – №. 3. – C. 800-811.
70. Ruinelli M. et al. Comparative genomics and pathogenicity potential of members of the *Pseudomonas syringae* species complex on *Prunus* spp //BMC genomics. – 2019. – T. 20. – №. 1. – C. 1-16.
71. Vanneste J. L. et al. Survival of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in the environment //I International Symposium on Bacterial Canker of Kiwifruit 1095. – 2013. – C. 105-110.
72. Pscheidt, J.W.; Moore, L.W. Diseases Caused by *Pseudomonas syringae*. Available online: <https://pnwhandbooks.org/plantdisease/pathogen-articles/pathogens-common-many-plants/bacteria-other-prokaryotes/diseases> (accessed on 22 May 2023).
73. Donati I. et al. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: Ecology, infection dynamics and disease epidemiology //Microbial ecology. – 2020. – T. 80. – C. 81-102.
74. Córdova P. et al. Phytopathogenic *Pseudomonas syringae* as a Threat to Agriculture: Perspectives of a Promising Biological Control Using Bacteriophages and Microorganisms //Horticulturae. – 2023. – T. 9. – №. 6. – C. 712.
75. Krasnovskaya O. et al. Copper coordination compounds as biologically active agents //International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – T. 21. – №. 11. – C. 3965.

76. Baker-Austin C. et al. Co-selection of antibiotic and metal resistance //Trends in microbiology. – 2006. – T. 14. – №. 4. – C. 176-182.
77. Seiler C., Berendonk T. U. Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture //Frontiers in microbiology. – 2012. – T. 3. – C. 399.
78. Dy R. L., Rigano L. A., Fineran P. C. Phage-based biocontrol strategies and their application in agriculture and aquaculture //Biochemical Society Transactions. – 2018. – T. 46. – №. 6. – C. 1605-1613.
79. Svircev A., Roach D., Castle A. Framing the future with bacteriophages in agriculture //Viruses. – 2018. – T. 10. – №. 5. – C. 218.
80. Eilenberg J., Hajek A., Lomer C. Suggestions for unifying the terminology in biological control //BioControl. – 2001. – T. 46. – C. 387-400.
81. Jones J. B. et al. Considerations for using bacteriophages for plant disease control //Bacteriophage. – 2012. – T. 2. – №. 4. – C. e23857.
82. ANASAC Baciforte. Available online: <https://www.anasac.cl/agropecuario/productos/baciforte/> (accessed on 31 May 2023).
83. Bionativa Nacillus. Available online: <http://www.bionativa.cl/web/productos/nacillus-pro-wp/#toggle-id-3> (accessed on 31 May 2023).
84. BAYER Serenade® Max. Available online: <https://www.cropscience.bayer.es/Hidden-Pages/Productos/Biologicos/Serenade-Max> (accessed on 31 May 2023).
85. James S. L. et al. Isolation, characterisation and experimental evolution of phage that infect the horse chestnut tree pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* //Current microbiology. – 2020. – T. 77. – C. 1438-1447.

86. Cuppels D. A. Isolation and characterization of phages useful for identifying *Pseudomonas syringae* pv. tomato //Phytopathology. – 1983. – T. 73. – №. 10. – C. 1376-1381.
87. Frampton R. A. et al. Identification of bacteriophages for biocontrol of the kiwifruit canker phytopathogen *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae //Applied and Environmental Microbiology. – 2014. – T. 80. – №. 7. – C. 2216-2228.
88. Rombouts S. et al. Characterization of novel bacteriophages for biocontrol of bacterial blight in leek caused by *Pseudomonas syringae* pv. porri //Frontiers in microbiology. – 2016. – T. 7. – C. 279.
89. Amarillas L. et al. Complete genome sequence of Phobos: A novel bacteriophage with unusual genomic features that infects *Pseudomonas syringae* //Archives of Virology. – 2020. – T. 165. – №. 6. – C. 1485-1488.
90. Flores O. et al. Characterization of bacteriophages against *Pseudomonas syringae* pv. actinidiae with potential use as natural antimicrobials in kiwifruit plants //Microorganisms. – 2020. – T. 8. – №. 7. – C. 974.
91. Young J. M. Pathogenicity and identification of the lilac pathogen, *Pseudomonas syringae* pv. syringae van Hall 1902 //Annals of applied biology. – 1991. – T. 118. – №. 2. – C. 283-298.
92. Morris C. E. et al. The life history of the plant pathogen *Pseudomonas syringae* is linked to the water cycle //The ISME journal. – 2008. – T. 2. – №. 3. – C. 321-334.
93. Paula Wilkie J., Dye D. W. *Pseudomonas cichorii* causing tomato and celery diseases in New Zealand //New Zealand Journal of Agricultural Research. – 1974. – T. 17. – №. 2. – C. 123-130.
94. Zhang S. et al. Assessment of copper resistance in *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola, the pathogen of halo blight on snap bean //Crop Protection. – 2017. – T. 98. – C. 8-15.

95. Robbs C. F. Uma nova doença bacteriana do mamoeiro (*Carica papaya* L.) //Revista da Sociedade Brasileira de Agronomia. – 1956. – T. 12. – C. 73-76.
96. Psallidas P. G., CG P. A new bacteriosis of almond caused by *Pseudomonas amygdali* sp. nov. – 1975.
97. Ogimi C. Studies on bacterial gall of chinaberry (*Melia Azedarach* Lin.), caused by *Pseudomonas meliae* n. sp //Science Bulletin of the College of Agriculture-University of the Ryukyu (Japan). – 1977.
98. GOTO M. *Pseudomonas ficuserectae* sp. nov., the Causal Agent of Bacterial Leaf Spot of *Ficus erecta* Thunb //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1983. – T. 33. – №. 3. – C. 546-550.
99. Janse J. D. et al. Reclassification of *Pseudomonas syringae* pv. *avellanae* as *Pseudomonas avellanae* (spec. nov, the Bacterium Causing Canker of Hazelnut (*Corylus avellana* L.) //Systematic and Applied Microbiology. – 1996. – T. 19. – №. 4. – C. 589-595.
100. Gardan L. et al. DNA relatedness among the pathovars of *Pseudomonas syringae* and description of *Pseudomonas tremae* sp. nov. and *Pseudomonas cannabina* sp. nov.(ex Sutic and Dowson 1959). – 1999.
101. Behrendt U., Ulrich A., Schumann P. Fluorescent pseudomonads associated with the phyllosphere of grasses; *Pseudomonas trivialis* sp. nov., *Pseudomonas poae* sp. nov. and *Pseudomonas congelans* sp. nov //International journal of systematic and evolutionary microbiology. – 2003. – T. 53. – №. 5. – C. 1461-1469.
102. González A. J. et al. *Pseudomonas asturiensis* sp. nov., isolated from soybean and weeds //Systematic and Applied Microbiology. – 2013. – T. 36. – №. 5. – C. 320-324.

103. Kałużna M. et al. *Pseudomonas cerasi* sp. nov.(non Griffin, 1911) isolated from diseased tissue of cherry //Systematic and applied microbiology. – 2016. – T. 39. – №. 6. – C. 370-377.

104. Busquets A. et al. *Pseudomonas caspiana* sp. nov., a citrus pathogen in the *Pseudomonas syringae* phylogenetic group //Systematic and Applied Microbiology. – 2017. – T. 40. – №. 5. – C. 266-273.

105. Schaad N. W., Cunfer B. M. Synonymy of *Pseudomonas coronafaciens*, *Pseudomonas coronafaciens* pathovar *zeae*, *Pseudomonas coronafaciens* subsp. *atropurpurea*, and *Pseudomonas striafaciens* //International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 1979. – T. 29. – №. 3. – C. 213-221.

106. Gomila M. et al. Clarification of taxonomic status within the *Pseudomonas syringae* species group based on a phylogenomic analysis //Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 2422.

107. Bull C. T. et al. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007 //Journal of Plant Pathology. – 2010. – C. 551-592.

108. Berge O. et al. A user's guide to a data base of the diversity of *Pseudomonas syringae* and its application to classifying strains in this phylogenetic complex //PloS one. – 2014. – T. 9. – №. 9. – C. e105547.

109. Dell'Olmo E., Tiberini A., Sigillo L. Leguminous Seedborne Pathogens: Seed Health and Sustainable Crop Management //Plants. – 2023. – T. 12. – №. 10. – C. 2040.

110. Lamichhane J. R. et al. Disease and frost damage of woody plants caused by *Pseudomonas syringae*: seeing the forest for the trees //Advances in agronomy. – 2014. – T. 126. – C. 235-295.

111. Lamichhane J. R., Messéan A., Morris C. E. Insights into epidemiology and control of diseases of annual plants caused by the *Pseudomonas*



syringae species complex //Journal of general plant pathology. – 2015. – T. 81. – №. 5. – C. 331-350.

112. Hulin M. T. et al. Characterization of the pathogenicity of strains of *Pseudomonas syringae* towards cherry and plum //Plant Pathology. – 2018. – T. 67. – №. 5. – C. 1177-1193.

113. Bultreys A., Kaluzna M. Bacterial cankers caused by *Pseudomonas syringae* on stone fruit species with special emphasis on the pathovars *syringae* and *morsprunorum* race 1 and race 2 //Journal of Plant Pathology. – 2010. – C. S21-S33.

114. Ivanović Ž. et al. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, causal agent of citrus blast of mandarin in Montenegro //The plant pathology journal. – 2017. – T. 33. – №. 1. – C. 21.

115. Aiello D. et al. Characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* isolated from mango in Sicily and occurrence of copper-resistant strains //J. Plant Pathol. – 2015. – T. 97. – C. 273-282.

116. Naqvi S. A. H. et al. Outbreak of bacterial apical necrosis of mango in Multan, Punjab, Pakistan //Pakistan Journal of Phytopathology. – 2016. – T. 28. – №. 1. – C. 107-113.

117. Mazzaglia A. et al. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* (PSA) isolates from recent bacterial canker of kiwifruit outbreaks belong to the same genetic lineage //PloS one. – 2012. – T. 7. – №. 5. – C. e36518.

118. Scortichini M. et al. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*: a re-emerging, multi-faceted, pandemic pathogen //Molecular plant pathology. – 2012. – T. 13. – №. 7. – C. 631-640.

119. Cameron A., Zoysa G. H. D., Sarojini V. Antimicrobial peptides against *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* and *Erwinia amylovora*: Chemical

synthesis, secondary structure, efficacy, and mechanistic investigations //Peptide Science. – 2014. – T. 102. – №. 1. – C. 88-96.

120. Gallelli A. et al. Real-time and qualitative PCR for detecting *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolates causing recent outbreaks of kiwifruit bacterial canker //Plant Pathology. – 2014. – T. 63. – №. 2. – C. 264-276.

121. Vanneste J. L. et al. Multiplication and movement of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* in kiwifruit plants //I International Symposium on Bacterial Canker of Kiwifruit 1095. – 2013. – C. 117-122.

122. Prencipe S., Gullino M. L., Spadaro D. *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* isolated from *Actinidia chinensis* Var. *deliciosa* in Northern Italy: Genetic diversity and virulence //European journal of plant pathology. – 2018. – T. 150. – C. 191-204.

123. Ferrante P., Scortichini M. Redefining the global populations of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* based on pathogenic, molecular and phenotypic characteristics //Plant Pathology. – 2015. – T. 64. – №. 1. – C. 51-62.

124. Morris C. E., Monteil C. L., Berge O. The life history of *Pseudomonas syringae*: linking agriculture to earth system processes //Annual review of phytopathology. – 2013. – T. 51. – C. 85-104.

125. Basim H. et al. An outbreak of bacterial speck caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* on tomato transplants grown in commercial seedling companies located in the Western Mediterranean Region of Turkey //Plant Disease. – 2004. – T. 88. – №. 9. – C. 1050-1050.

126. Cruz L. et al. First report of bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* race 1 in Portugal //Plant disease. – 2010. – T. 94. – №. 12. – C. 1504-1504.

127. Takikawa Y., Takahashi F. Bacterial leaf spot and blight of crucifer plants (Brassicaceae) caused by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* and *P.*

cannabina pv. alisalensis //Journal of general plant pathology. – 2014. – T. 80. – №. 6. – C. 466-474.

128. Shila S. J. et al. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* associated with the seeds of cucurbits //Universal Journal of Agricultural Research. – 2013. – T. 1. – №. 1. – C. 1-8.

129. Newberry E. A. et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* causing bacterial leaf spot of watermelon and squash in Florida //Plant disease. – 2018. – T. 102. – №. 3. – C. 511-518.

130. Martín-Sanz A. et al. Genetic, biochemical and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *lisi* strains //Plant pathology. – 2012. – T. 61. – №. 6. – C. 1063-1072.

131. Xin X. F., Kvitko B., He S. Y. *Pseudomonas syringae*: what it takes to be a pathogen //Nature Reviews Microbiology. – 2018. – T. 16. – №. 5. – C. 316-328.

132. Warneke B. W., Nackley L. L., Pscheidt J. W. Management of grape powdery mildew with an intelligent sprayer and sulfur //Plant Disease. – 2022. – T. 106. – №. 7. – C. 1837-1844.

133. Miteluț A. C. et al. Latest developments in edible coatings on minimally processed fruits and vegetables: A review //Foods. – 2021. – T. 10. – №. 11. – C. 2821.

134. Hassan B. et al. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review //International journal of biological macromolecules. – 2018. – T. 109. – C. 1095-1107.

135. Agriopoulou S. et al. Lactic acid bacteria as antibacterial agents to extend the shelf life of fresh and minimally processed fruits and vegetables: Quality and safety aspects //Microorganisms. – 2020. – T. 8. – №. 6. – C. 952.

136. Anaya-Esparza L. M. et al. Effects of minimal processing technologies on jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) quality parameters //Food and Bioprocess Technology. – 2018. – T. 11. – C. 1761-1774.

137. Zhang Z. H. et al. Non-thermal technologies and its current and future application in the food industry: a review //International Journal of Food Science & Technology. – 2019. – T. 54. – №. 1. – C. 1-13.

138. Deng L. Z. et al. Chemical and physical pretreatments of fruits and vegetables: Effects on drying characteristics and quality attributes—a comprehensive review //Critical reviews in food science and nutrition. – 2019. – T. 59. – №. 9. – C. 1408-1432.

139. Nicolau-Lapeña I. et al. Ultrasound processing alone or in combination with other chemical or physical treatments as a safety and quality preservation strategy of fresh and processed fruits and vegetables: a review //Food and Bioprocess Technology. – 2019. – T. 12. – C. 1452-1471.

140. Bansal V. et al. Effect of high pressure processing (HPP) on microbial safety, physicochemical properties, and bioactive compounds of whey-based sweet lime (whey-lime) beverage //Journal of Food Measurement and Characterization. – 2019. – T. 13. – C. 454-465.

141. Soni M. et al. Nanoencapsulation strategies for improving nutritional functionality, safety and delivery of plant-based foods: Recent updates and future opportunities //Plant Nano Biology. – 2022. – T. 1. – C. 100004.

142. De Corato U. Improving the shelf-life and quality of fresh and minimally-processed fruits and vegetables for a modern food industry: A comprehensive critical review from the traditional technologies into the most promising advancements //Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2020. – T. 60. – №. 6. – C. 940-975.

143. Leneveu-Jenvrin C. et al. Role of biological control agents and physical treatments in maintaining the quality of fresh and minimally-processed fruit and vegetables //Critical reviews in food science and nutrition. – 2020. – T. 60. – №. 17. – C. 2837-2855.
144. Ikbal A. et al. Cook-Chill Technique in Seafood Packaging //heat treatment. – 2021. – T. 3. – №. 7. – C. 566-569.
145. Porębska I. et al. Treatment with high hydrostatic pressure and supercritical carbon dioxide to control Alicyclobacillus acidoterrestris spores in apple juice //Food Control. – 2017. – T. 73. – C. 24-30.
146. Sourri P. et al. The Effect of Temperature-Assisted High Hydrostatic Pressure on the Survival of Alicyclobacillus acidoterrestris Inoculated in Orange Juice throughout Storage at Different Isothermal Conditions //Fermentation. – 2022. – T. 8. – №. 7. – C. 308.
147. Sourri P. et al. Fruit juice spoilage by Alicyclobacillus: Detection and control methods—A comprehensive review //Foods. – 2022. – T. 11. – №. 5. – C. 747.
148. Sourri P. et al. Alicyclobacillus acidoterrestris strain variability in the inactivation kinetics of spores in orange juice by temperature-assisted high hydrostatic pressure //Applied Sciences. – 2020. – T. 10. – №. 21. – C. 7542.
149. Yamamoto K. et al. Bacterial injury induced by high hydrostatic pressure //Food Engineering Reviews. – 2021. – C. 1-12.
150. Christie G., Setlow P. Bacillus spore germination: Knowns, unknowns and what we need to learn //Cellular Signalling. – 2020. – T. 74. – C. 109729.
151. Wang Q. Novel Antimicrobial Treatments Based on the Interaction of Gallic Acid and UV Light: Characterization, Investigation of Antimicrobial Mechanism, and Application on Fresh Produce : дис. – 2018.

152. Wójcicki M. et al. Characterization and Genome Study of Novel Lytic Bacteriophages against Prevailing Saprophytic Bacterial Microflora of Minimally Processed Plant-Based Food Products //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – T. 22. – №. 22. – C. 12460.

153. Gientka I. et al. Use of phage cocktail for improving the overall microbiological quality of sprouts—Two methods of application //Applied Microbiology. – 2021. – T. 1. – №. 2. – C. 289-303.

154. Żuwalski A. et al. The use of bacteriophages against saprophytic mesophilic bacteria in minimally processed food //Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria. – 2021. – T. 20. – №. 4. – C. 473-484.

155. Ohshima T. et al. Mechanism of pulsed electric field enzyme activity change and pulsed discharge permeabilization of agricultural products //Japanese Journal of Applied Physics. – 2021. – T. 60. – №. 6. – C. 060501.

156. Soltanzadeh M. et al. Quality aspects and safety of pulsed electric field (PEF) processing on dairy products: A comprehensive review //Food Reviews International. – 2022. – T. 38. – №. sup1. – C. 96-117.

157. Takaki K. et al. Pulsed power applications for protein conformational change and the permeabilization of agricultural products //Molecules. – 2021. – T. 26. – №. 20. – C. 6288.

158. Koukounaras A. et al. Active modified atmosphere package induced a new physiological disorder of minimally processed romaine lettuce leaves //Food Packaging and Shelf Life. – 2019. – T. 22. – C. 100411.

159. Haque M. A. et al. High carbon-di-oxide modified atmospheric packaging on quality of ready-to-eat minimally processed fresh-cut iceberg lettuce //Food Science and Biotechnology. – 2021. – T. 30. – C. 413-421.

160. Firouz M. S. et al. Effect of modified atmosphere packaging on the mechanical properties of lettuce during shelf life in cold storage //Information Processing in Agriculture. – 2021. – T. 8. – №. 4. – C. 485-493.
161. Wójcicki M. et al. The concept of using bacteriophages to improve the microbiological quality of minimally processed foods //Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria. – 2019. – T. 18. – №. 4. – C. 373-383.
162. Asare P. T. et al. Decontamination of minimally-processed fresh lettuce using reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* //Frontiers in microbiology. – 2018. – T. 9. – C. 1421.
163. Tumbariski Y. et al. Biopreservation of fresh strawberries by carboxymethyl cellulose edible coatings enriched with a bacteriocin from *Bacillus methylotrophicus* BM47 //Food technology and biotechnology. – 2019. – T. 57. – №. 2. – C. 230-237.
164. Cieślik M. et al. Two Newly Isolated Enterobacter-Specific Bacteriophages: Biological Properties and Stability Studies //Viruses. – 2022. – T. 14. – №. 7. – C. 1518.
165. Lewis R., Hill C. Overcoming barriers to phage application in food and feed //Current opinion in biotechnology. – 2020. – T. 61. – C. 38-44.
166. Zinno P. et al. Bacteriophage P22 to challenge *Salmonella* in foods //International Journal of Food Microbiology. – 2014. – T. 191. – C. 69-74.
167. Połaska M., Sokołowska B. Bacteriophages—a new hope or a huge problem in the food industry //AIMS microbiology. – 2019. – T. 5. – №. 4. – C. 324.
168. Fernández L. et al. Application of bacteriophages in the agro-food sector: A long way toward approval //Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2018. – T. 8. – C. 296.

169. Osei E. K., Mahony J., Kenny J. G. From Farm to Fork: Streptococcus suis as a Model for the Development of Novel Phage-Based Biocontrol Agents //Viruses. – 2022. – T. 14. – №. 9. – C. 1996.

170. Moye Z. D., Woolston J., Sulakvelidze A. Bacteriophage applications for food production and processing //Viruses. – 2018. – T. 10. – №. 4. – C. 205.

171. Svircev A., Roach D., Castle A. Framing the future with bacteriophages in agriculture //Viruses. – 2018. – T. 10. – №. 5. – C. 218.

172. Jakobsen R. R. et al. A bacteriophage cocktail significantly reduces *Listeria monocytogenes* without deleterious impact on the commensal gut microbiota under simulated gastrointestinal conditions //Viruses. – 2022. – T. 14. – №. 2. – C. 190.

173. Kahn L. H. et al. From farm management to bacteriophage therapy: Strategies to reduce antibiotic use in animal agriculture //Annals of the New York Academy of Sciences. – 2019. – T. 1441. – №. 1. – C. 31-39.

174. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Evaluation of the safety and efficacy of Listex™ P100 for reduction of pathogens on different ready-to-eat (RTE) food products //EFSA Journal. – 2016. – T. 14. – №. 8. – C. e04565.

175. Lewis R. et al. The effect of a commercially available bacteriophage and bacteriocin on. – 2019.

176. Guenther S. et al. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods //Applied and environmental microbiology. – 2009. – T. 75. – №. 1. – C. 93-100.

177. Rodriguez-Melcon C. et al. Effects of bacteriophage P100 at different concentrations on the structural parameters of *Listeria monocytogenes* biofilms //Journal of food protection. – 2018. – T. 81. – №. 12. – C. 2040-2044.



178. Şanlıbaba P., Buzrul S. Control of *Listeria monocytogenes* in milk by using phage cocktail // *Scientia Agropecuaria*. – 2022. – T. 13. – №. 1. – C. 7-14.
179. Liao N. et al. Prevalence of  $\beta$ -lactam drug-resistance genes in *Escherichia coli* contaminating ready-to-eat lettuce // *Foodborne Pathogens and Disease*. – 2020. – T. 17. – №. 12. – C. 739-742.
180. Alexa E. A. et al. Dairy products and dairy-processing environments as a reservoir of antibiotic resistance and quorum-quenching determinants as revealed through functional metagenomics // *MSystems*. – 2020. – T. 5. – №. 1. – C. 10.1128/msystems.00723-19.
181. Lykov I. N. et al. Research of antibiotic resistance of microorganisms isolated from fruits and vegetables // *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. – IOP Publishing, 2021. – T. 839. – №. 4. – C. 042003.
182. Oniciuc E. A. et al. The present and future of whole genome sequencing (WGS) and whole metagenome sequencing (WMS) for surveillance of antimicrobial resistant microorganisms and antimicrobial resistance genes across the food chain // *Genes*. – 2018. – T. 9. – №. 5. – C. 268.
183. Bhattacharya S. (ed.). *Conventional and advanced food processing technologies*. – John Wiley & Sons, 2014.
184. Alves D. et al. Bacteriophage  $\phi$ IBB-PF7A loaded on sodium alginate-based films to prevent microbial meat spoilage // *International journal of food microbiology*. – 2019. – T. 291. – C. 121-127.
185. World Health Organization *Foodborne Diseases*. Available online: [https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/foodborne-diseases#tab=tab_1) (accessed on 13 February 2023).
186. Cagri A., Ustunol Z., Ryser E. T. Antimicrobial edible films and coatings // *Journal of food protection*. – 2004. – T. 67. – №. 4. – C. 833-848.

187. López-Cuevas O. et al. Bacteriophage applications for fresh produce food safety //International Journal of Environmental Health Research. – 2021. – T. 31. – №. 6. – C. 687-702.

188. Costa M. J. et al. Bacteriophage delivery systems for food applications: Opportunities and perspectives //Viruses. – 2023. – T. 15. – №. 6. – C. 1271.

189. Hussain W. et al. Bacteriophage-based advanced bacterial detection: Concept, mechanisms, and applications //Biosensors and Bioelectronics. – 2021. – T. 177. – C. 112973.

190. Aliakbar Ahovan Z. et al. Bacteriophage based biosensors: Trends, outcomes and challenges //Nanomaterials. – 2020. – T. 10. – №. 3. – C. 501.

191. Koutsoumanis K., Angelidis A. S. Probabilistic modeling approach for evaluating the compliance of ready-to-eat foods with new European Union safety criteria for *Listeria monocytogenes* //Applied and environmental microbiology. – 2007. – T. 73. – №. 15. – C. 4996-5004.

192. Costa M. J. et al. Bacteriophage delivery systems for food applications: Opportunities and perspectives //Viruses. – 2023. – T. 15. – №. 6. – C. 1271.

193. Costa M. J. et al. Bacteriophage delivery systems for food applications: Opportunities and perspectives //Viruses. – 2023. – T. 15. – №. 6. – C. 1271.

194. Costa M. J. et al. Bacteriophage delivery systems for food applications: Opportunities and perspectives //Viruses. – 2023. – T. 15. – №. 6. – C. 1271.

195. Costa M. J. et al. Bacteriophage delivery systems for food applications: Opportunities and perspectives //Viruses. – 2023. – T. 15. – №. 6. – C. 1271.

196. Costa M. J. et al. Bacteriophage delivery systems for food applications: Opportunities and perspectives //Viruses. – 2023. – T. 15. – №. 6. – C. 1271.
197. Australian National University the Annual Cost of Foodborne Illness in Australia Final Report. Available online: [https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/ANU\\_Foodborne\\_Disease\\_Final\\_Report.pdf](https://www.foodstandards.gov.au/publications/Documents/ANU_Foodborne_Disease_Final_Report.pdf) (accessed on 6 October 2023).
198. Bhattacharya S. and Advanced Food Processing Technologies.
199. Dilbato Dinbiso T. et al. Antimicrobial Activity of Selected Ethnoveterinary Medicinal Plants of Southern Region, Ethiopia //Infection and Drug Resistance. – 2022. – C. 6225-6235.
200. Featherstone S. (ed.). A complete course in canning and related processes: Volume 3 Processing Procedures for Canned Food Products. – Woodhead Publishing, 2015.
201. Moye Z. D., Woolston J., Sulakvelidze A. Bacteriophage applications for food production and processing //Viruses. – 2018. – T. 10. – №. 4. – C. 205.
202. Leung V. et al. Long-term preservation of bacteriophage antimicrobials using sugar glasses //ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2017. – T. 4. – №. 11. – C. 3802-3808.
203. Royer S., Morais A. P., da Fonseca Batistão D. W. Phage therapy as strategy to face post-antibiotic era: a guide to beginners and experts //Archives of microbiology. – 2021. – T. 203. – C. 1271-1279.
204. Aziz M., Karboune S. Natural antimicrobial/antioxidant agents in meat and poultry products as well as fruits and vegetables: A review //Critical reviews in food science and nutrition. – 2018. – T. 58. – №. 3. – C. 486-511.

205. Taylor T. M. Natural food antimicrobials: recent trends in their use, limitations, and opportunities for their applications in food preservation //Natural and bio-based antimicrobials for food applications. – 2018. – C. 25-43.

206. Irkin R., Esmer O. K. Novel food packaging systems with natural antimicrobial agents //Journal of food science and technology. – 2015. – T. 52. – C. 6095-6111.

207. Martínez B., García P., Rodríguez A. Swapping the roles of bacteriocins and bacteriophages in food biotechnology //Current opinion in biotechnology. – 2019. – T. 56. – C. 1-6.

208. Kaur R., Kaur L. Encapsulated natural antimicrobials: A promising way to reduce microbial growth in different food systems //Food Control. – 2021. – T. 123. – C. 107678.

209. Vonasek E., Le P., Nitin N. Encapsulation of bacteriophages in whey protein films for extended storage and release //Food hydrocolloids. – 2014. – T. 37. – C. 7-13.

210. García-Anaya M. C. et al. The role of food compounds and emerging technologies on phage stability //Innovative Food Science & Emerging Technologies. – 2020. – T. 64. – C. 102436.

211. Long M. et al. Release characteristic of JS25 phage microcapsules and biological control effect on liquid food //Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering. – 2018. – T. 34. – №. 1. – C. 294-300.

212. Amarillas L. et al. The antibacterial effect of chitosan-based edible coating incorporated with a lytic bacteriophage against Escherichia coli O157: H7 on the surface of tomatoes //Journal of Food Safety. – 2018. – T. 38. – №. 6. – C. e12571.

213. Faour-Klingbeil D., CD Todd E. Prevention and control of foodborne diseases in Middle-East North African countries: Review of national control

systems //International journal of environmental research and public health. – 2020. – T. 17. – №. 1. – C. 70.

214. Akkina R. C., Payala V., Maganti S. S. Tools for Rapid Detection and Control of Foodborne Microbial Pathogens. – 2022.

215. Moi I. M. et al. Properties of Foodborne Pathogens and Their Diseases //Foodborne Pathogens-Recent Advances in Control and Detection. – 2022.

216. Martinović T. et al. Foodborne pathogens and their toxins //Journal of proteomics. – 2016. – T. 147. – C. 226-235.

217. Carstens C. K., Salazar J. K., Darkoh C. Multistate outbreaks of foodborne illness in the United States associated with fresh produce from 2010 to 2017 //Frontiers in microbiology. – 2019. – T. 10. – C. 2667.

218. Ling Y. et al. Rapid method for detection of Staphylococcus aureus in feces //Journal of Biomedical Nanotechnology. – 2019. – T. 15. – №. 6. – C. 1290-1298.

219. Akter R. et al. Novel coronavirus pathogen in humans and animals: an overview on its social impact, economic impact, and potential treatments //Environmental Science and Pollution Research. – 2021. – C. 1-19.

220. Prata J. C. et al. A One Health perspective of the impacts of microplastics on animal, human and environmental health //Science of the Total Environment. – 2021. – T. 777. – C. 146094.

221. Qiu H. et al. Donepezil ameliorates pulmonary arterial hypertension by inhibiting M2-macrophage activation //Frontiers in Cardiovascular Medicine. – 2021. – T. 8. – C. 639541.

222. Scallan Walter E. J., McLean H. Q., Griffin P. M. Hospital discharge data underascertain enteric bacterial infections among children //Foodborne Pathogens and Disease. – 2020. – T. 17. – №. 9. – C. 530-532.

223. Belina D. et al. Prevalence and epidemiological distribution of selected foodborne pathogens in human and different environmental samples in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis //One health outlook. – 2021. – T. 3. – №. 1. – C. 1-30.

224. Van Puyvelde L. et al. Bioassay-guided isolation of antibacterial compounds from the leaves of Tetradenia riparia with potential bactericidal effects on food-borne pathogens //Journal of Ethnopharmacology. – 2021. – T. 273. – C. 113956.

225. Hoffmann S., Scallan Walter E. Acute complications and sequelae from foodborne infections: Informing priorities for cost of foodborne illness estimates //Foodborne Pathogens and Disease. – 2020. – T. 17. – №. 3. – C. 172-177.

226. Hoffmann S., Ashton L., Ahn J. W. Food safety: A policy history and introduction to avenues for economic research //Applied Economic Perspectives and Policy. – 2021. – T. 43. – №. 2. – C. 680-700.

227. Ge H., Wang Y., Zhao X. Research on the drug resistance mechanism of foodborne pathogens //Microbial Pathogenesis. – 2022. – T. 162. – C. 105306.

228. Ishaq A. R. et al. Prospect of microbial food borne diseases in Pakistan: a review //Brazilian Journal of Biology. – 2021. – T. 81. – C. 940-953.

229. Jahan N. A., Lindsey L. L., Larsen P. A. The role of peridomestic rodents as reservoirs for zoonotic foodborne pathogens //Vector-Borne and Zoonotic Diseases. – 2021. – T. 21. – №. 3. – C. 133-148.

230. Saravanan A. et al. Methods of detection of food-borne pathogens: a review //Environmental Chemistry Letters. – 2021. – T. 19. – C. 189-207.

231. Zarkani A. A., Schikora A. Mechanisms adopted by Salmonella to colonize plant hosts //Food Microbiology. – 2021. – T. 99. – C. 103833.

232. Sharif M. K., Javed K., Nasir A. Foodborne illness: threats and control //Foodborne diseases. – Academic Press, 2018. – C. 501-523.
233. Schirone M. et al. Biological hazards in food //Frontiers in Microbiology. – 2017. – T. 7. – C. 2154.
234. Elbehiry A. et al. Application of MALDI-TOF MS fingerprinting as a quick tool for identification and clustering of foodborne pathogens isolated from food products //New Microbiol. – 2017. – T. 40. – №. 4. – C. 269-278.
235. Söderqvist K. et al. Fate of *Listeria monocytogenes*, pathogenic *Yersinia enterocolitica*, and *Escherichia coli* O157: H7 gfp+ in ready-to-eat salad during cold storage: What is the risk to consumers? //Journal of food protection. – 2017. – T. 80. – №. 2. – C. 204-212.
236. Graikini D. et al. Bioactivity of Fucoidan-Rich Extracts from *Fucus vesiculosus* against Rotavirus and Foodborne Pathogens //Marine Drugs. – 2023. – T. 21. – №. 9. – C. 478.
237. Switaj T. L., Winter K. J., Christensen S. R. Diagnosis and management of foodborne illness //American family physician. – 2015. – T. 92. – №. 5. – C. 358-365.
238. Panwar S. et al. Advanced diagnostic methods for identification of bacterial foodborne pathogens: Contemporary and upcoming challenges //Critical Reviews in Biotechnology. – 2023. – T. 43. – №. 7. – C. 982-1000.
239. Heredia N., García S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review //Animal nutrition. – 2018. – T. 4. – №. 3. – C. 250-255.
240. Abebe E. et al. Review on major food-borne zoonotic bacterial pathogens //Journal of tropical medicine. – 2020. – T. 2020.
241. Aik J. et al. Evaluating food safety management systems in Singapore: A controlled interrupted time-series analysis of foodborne disease outbreak reports //Food control. – 2020. – T. 117. – C. 107324.

242. Myintzaw P., Jaiswal A. K., Jaiswal S. A review on campylobacteriosis associated with poultry meat consumption //Food Reviews International. – 2023. – T. 39. – №. 4. – C. 2107-2121.

243. Sun F. et al. Quantum dot biosensor combined with antibody and aptamer for tracing food-borne pathogens //Food Quality and Safety. – 2021. – T. 5. – C. fyab019.

244. Janekrongtham C. et al. Outbreak of seafood-related food poisoning from undetectable *Vibrio parahaemolyticus*-like pathogen, Chiang Mai Province, Thailand, December 2020 //Tropical Medicine & International Health. – 2022. – T. 27. – №. 1. – C. 92-98.

245. Rajkovic A. et al. Detection of toxins involved in foodborne diseases caused by Gram-positive bacteria //Comprehensive reviews in food science and food safety. – 2020. – T. 19. – №. 4. – C. 1605-1657.

246. Sharma P. C. et al. Recent advances in microbial toxin-related strategies to combat cancer //Seminars in cancer biology. – Academic Press, 2022. – T. 86. – C. 753-768.

247. Gallo M. et al. Relationships between food and diseases: What to know to ensure food safety //Food Research International. – 2020. – T. 137. – C. 109414.

248. Jang H. J. et al. Comparative analysis of detection methods for food-borne pathogens in fresh-cut agricultural materials //생명과학회지. – 2021. – T. 31. – №. 1. – C. 10-16.

249. Augustin J. C. et al. Contribution of foods and poor food-handling practices to the burden of foodborne infectious diseases in France //Foods. – 2020. – T. 9. – №. 11. – C. 1644.



250. Scallan Walter E. J. et al. Estimating the number of illnesses caused by agents transmitted commonly through food: a scoping review //Foodborne Pathogens and Disease. – 2021. – T. 18. – №. 12. – C. 841-858.

251. Leon Madrazo A., Segura Campos M. R. Review of antimicrobial peptides as promoters of food safety: Limitations and possibilities within the food industry //Journal of Food Safety. – 2020. – T. 40. – №. 6. – C. e12854.

252. Visciano P., Schirone M. Food frauds: Global incidents and misleading situations //Trends in Food Science & Technology. – 2021. – T. 114. – C. 424-442.

253. Singha S. et al. Foodborne illnesses of Escherichia coli O157origin and its control measures //Journal of Food Science and Technology. – 2023. – T. 60. – №. 4. – C. 1274-1283.

254. Mi F. et al. Application of lectin-based biosensor technology in the detection of foodborne pathogenic bacteria: A review //Analyst. – 2021. – T. 146. – №. 2. – C. 429-443.

255. Wan J. et al. Development of a rapid detection method for real-time fluorescent quantitative PCR of Salmonella spp. and Salmonella Enteritidis in ready-to-eat fruits and vegetables //LWT. – 2021. – T. 149. – C. 111837.

256. Han X. et al. Microfluidic devices for multiplexed detection of foodborne pathogens //Food Research International. – 2021. – T. 143. – C. 110246.

257. Vidyadharani G. et al. Present and pioneer methods of early detection of food borne pathogens //Journal of Food Science and Technology. – 2022. – T. 59. – №. 6. – C. 2087-2107.

258. Nassarawa S. S., Luo Z., Lu Y. Conventional and emerging techniques for detection of foodborne pathogens in horticulture crops: A leap to food safety //Food and Bioprocess Technology. – 2022. – T. 15. – №. 6. – C. 1248-1267.

259. Huang L. et al. A new quality control method for lateral flow assay //Chinese Chemical Letters. – 2018. – T. 29. – №. 12. – C. 1853-1856.

260. Xu Y. et al. The point-of-care-testing of nucleic acids by chip, cartridge and paper sensors //Chinese Chemical Letters. – 2021. – T. 32. – №. 12. – C. 3675-3686.

261. Kyaw K. S. et al. Toward in-process technology-aided automation for enhanced microbial food safety and quality assurance in milk and beverages processing //Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2022. – C. 1-21.

262. Law J. W. F. et al. Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations //Frontiers in microbiology. – 2015. – T. 5. – C. 770.

263. Elbehiry A. et al. Acinetobacter baumannii as a community foodborne pathogen: Peptide mass fingerprinting analysis, genotypic of biofilm formation and phenotypic pattern of antimicrobial resistance //Saudi Journal of Biological Sciences. – 2021. – T. 28. – №. 1. – C. 1158-1166.

264. Sahoo M., Panigrahi C., Aradwad P. Management strategies emphasizing advanced food processing approaches to mitigate food borne zoonotic pathogens in food system //Food Frontiers. – 2022. – T. 3. – №. 4. – C. 641-665.

265. Bolton D. J. et al. Zoonotic transfer of pathogens from animals to farm products //Global safety of fresh produce. – Woodhead Publishing, 2014. – C. 52-67.

266. Villa T. G. et al. Resistant and emergent pathogens in food products //Antimicrobial food packaging. – Academic Press, 2016. – C. 11-34.

267. Lee J. C. et al. Implementation of food safety management systems along with other management tools (HAZOP, FMEA, Ishikawa, Pareto). The case study of Listeria monocytogenes and correlation with microbiological criteria //Foods. – 2021. – T. 10. – №. 9. – C. 2169.

268. Kafetzopoulos D. P., Psomas E. L., Kafetzopoulos P. D. Measuring the effectiveness of the HACCP food safety management system //Food control. – 2013. – T. 33. – №. 2. – C. 505-513.
269. Sillankorva S. M., Oliveira H., Azeredo J. Bacteriophages and their role in food safety //International journal of microbiology. – 2012. – T. 2012.
270. Hyla K., Dusza I., Skaradzińska A. Recent Advances in the Application of Bacteriophages against Common Foodborne Pathogens //Antibiotics. – 2022. – T. 11. – №. 11. – C. 1536.
271. Garcia P. et al. Bacteriophages and their application in food safety //Letters in applied microbiology. – 2008. – T. 47. – №. 6. – C. 479-485.
272. Van Giau V., An S. S. A., Hulme J. Recent advances in the treatment of pathogenic infections using antibiotics and nano-drug delivery vehicles //Drug design, development and therapy. – 2019. – C. 327-343.
273. Colavecchio A. et al. Bacteriophages contribute to the spread of antibiotic resistance genes among foodborne pathogens of the Enterobacteriaceae family—a review //Frontiers in microbiology. – 2017. – T. 8. – C. 1108.
274. Alomari M. M. M., Dec M., Urban-Chmiel R. Bacteriophages as an Alternative Method for Control of Zoonotic and Foodborne Pathogens. Viruses 2021, 13, 2348. – 2021.
275. Żbikowska K., Michalczyk M., Dolka B. The use of bacteriophages in the poultry industry //Animals. – 2020. – T. 10. – №. 5. – C. 872.
276. Shchaslyvyi A. Y. et al. Current state of human gene therapy: approved products and vectors //Pharmaceuticals. – 2023. – T. 16. – №. 10. – C. 1416.
277. Edwards R. A. et al. Computational approaches to predict bacteriophage–host relationships //FEMS microbiology reviews. – 2016. – T. 40. – №. 2. – C. 258-272.

278. Ishaq A. et al. Employing list-shield bacteriophage as a bio-control intervention for *Listeria monocytogenes* from raw beef surface and maintain meat quality during refrigeration storage //Lwt. – 2020. – T. 132. – C. 109784.

279. Thung T. Y. et al. Evaluation of a lytic bacteriophage for bio-control of *Salmonella Typhimurium* in different food matrices //LWT. – 2019. – T. 105. – C. 211-214.

280. Li C. et al. A novel method to create efficient phage cocktails via use of phage-resistant bacteria //Applied and environmental microbiology. – 2022. – T. 88. – №. 6. – C. e02323-21.

281. Ramos-Vivas J. et al. Phages and enzybiotics in food biopreservation //Molecules. – 2021. – T. 26. – №. 17. – C. 5138.

282. Ferguson S. et al. Lytic bacteriophages reduce *Escherichia coli* O157:H7 on fresh cut lettuce introduced through cross-contamination //Bacteriophage. – 2013. – T. 3. – №. 1. – C. e24323.

283. Kang H. W. et al. wksl3, a New biocontrol agent for *Salmonella enterica* serovars enteritidis and typhimurium in foods: characterization, application, sequence analysis, and oral acute toxicity study //Applied and environmental microbiology. – 2013. – T. 79. – №. 6. – C. 1956-1968.

284. Abdelhamid A. G., El-Dougdoug N. K. Controlling foodborne pathogens with natural antimicrobials by biological control and antivirulence strategies //Heliyon. – 2020. – T. 6. – №. 9.

285. Huang Z. et al. Phages and their lysins: Toolkits in the battle against foodborne pathogens in the postantibiotic era //Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. – 2021. – T. 20. – №. 4. – C. 3319-3343.

286. Khan F. et al. Antibiotics application strategies to control biofilm formation in pathogenic bacteria //Current pharmaceutical biotechnology. – 2020. – T. 21. – №. 4. – C. 270-286.

287. Amankwah S., Abdella K., Kassa T. Bacterial biofilm destruction: A focused review on the recent use of phage-based strategies with other antibiofilm agents //Nanotechnology, Science and Applications. – 2021. – C. 161-177.
288. Jamal M. et al. Bacterial biofilm and associated infections //Journal of the chinese medical association. – 2018. – T. 81. – №. 1. – C. 7-11.
289. Vishwakarma A. et al. Peptidomimetic polyurethanes inhibit bacterial biofilm formation and disrupt surface established biofilms //Journal of the American Chemical Society. – 2021. – T. 143. – №. 25. – C. 9440-9449.
290. Wu Y. et al. Enhanced bacterial killing by vancomycin in staphylococcal biofilms disrupted by novel, DMMA-modified carbon dots depends on EPS production //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2020. – T. 193. – C. 111114.
291. Larsen J. et al. Emergence of methicillin resistance predates the clinical use of antibiotics //Nature. – 2022. – T. 602. – №. 7895. – C. 135-141.
292. Szafranski S. P., Slots J., Stiesch M. The human oral phageome //Periodontology 2000. – 2021. – T. 86. – №. 1. – C. 79-96.
293. Lin Y. W. et al. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of antipseudomonal bacteriophage therapy in rats: a proof-of-concept study //Clinical Microbiology and Infection. – 2020. – T. 26. – №. 9. – C. 1229-1235.
294. Reuter M., Kruger D. H. Approaches to optimize therapeutic bacteriophage and bacteriophage-derived products to combat bacterial infections //Virus Genes. – 2020. – T. 56. – №. 2. – C. 136-149.
295. Guo D. et al. Genetic and Chemical Engineering of Phages for Controlling Multidrug-Resistant Bacteria. Antibiotics 2021, 10, 202. – 2021.
296. Uruén C. et al. Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. Antibiotics 2021, 10, 3 //New Insights on Biofilm Antimicrobial Strategies. – 2021. – C. 5.

297. Chou K. T. et al. A segmentation clock patterns cellular differentiation in a bacterial biofilm //Biophysical Journal. – 2023. – T. 122. – №. 3. – C. 412a.
298. Flemming H. C., Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. – 2010.
299. Karygianni L. et al. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities //Trends in microbiology. – 2020. – T. 28. – №. 8. – C. 668-681.
300. Siddik A., Satheesh S. Characterization and assessment of barnacle larval settlement-inducing activity of extracellular polymeric substances isolated from marine biofilm bacteria //Scientific reports. – 2019. – T. 9. – №. 1. – C. 17849.
301. Low K. E., Howell P. L. Gram-negative synthase-dependent exopolysaccharide biosynthetic machines //Current Opinion in Structural Biology. – 2018. – T. 53. – C. 32-44.
302. Steiger E. L. et al. Effect of divalent ions on cariogenic biofilm formation //BMC microbiology. – 2020. – T. 20. – №. 1. – C. 1-11.

303. Devaraj A. et al. The extracellular innate-immune effector HMGB1 limits pathogenic bacterial biofilm proliferation //The Journal of Clinical Investigation. – 2021. – T. 131. – №. 16.
304. Paharik A. E., Horswill A. R. The staphylococcal biofilm: adhesins, regulation, and host response //Virulence mechanisms of bacterial pathogens. – 2016. – C. 529-566.
305. Kaplan E. et al. Insights into bacterial lipoprotein trafficking from a structure of LolA bound to the LolC periplasmic domain //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2018. – T. 115. – №. 31. – C. E7389-E7397.
306. Campoccia D., Montanaro L., Arciola C. R. Extracellular DNA (eDNA). A major ubiquitous element of the bacterial biofilm architecture //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – T. 22. – №. 16. – C. 9100.
307. Kavanaugh J. S. et al. Identification of extracellular DNA-binding proteins in the biofilm matrix //MBio. – 2019. – T. 10. – №. 3. – C. 10.1128/mbio.01137-19.
308. Wang J. et al. In-situ monitoring AHL-mediated quorum-sensing regulation of the initial phase of wastewater biofilm formation //Environment international. – 2020. – T. 135. – C. 105326.
309. Renner L. D., Weibel D. B. Physicochemical regulation of biofilm formation //MRS bulletin. – 2011. – T. 36. – №. 5. – C. 347-355.
310. Berne C., Brun Y. V. The two chemotaxis clusters in *Caulobacter crescentus* play different roles in chemotaxis and biofilm regulation //Journal of Bacteriology. – 2019. – T. 201. – №. 18. – C. 10.1128/jb.00071-19.
311. Toyofuku M. et al. Environmental factors that shape biofilm formation //Bioscience, biotechnology, and biochemistry. – 2016. – T. 80. – №. 1. – C. 7-12.

312. McCall A. D., Kumar R., Edgerton M. *Candida albicans* Sfl1/Sfl2 regulatory network drives the formation of pathogenic microcolonies //PLoS pathogens. – 2018. – T. 14. – №. 9. – C. e1007316.

313. Nassar R. et al. Microbial metabolic genes crucial for *S. aureus* biofilms: An insight from re-analysis of publicly available microarray datasets //Frontiers in Microbiology. – 2021. – T. 11. – C. 607002.

314. Nishikawa M., Kobayashi K. Calcium prevents biofilm dispersion in *Bacillus subtilis* //Journal of Bacteriology. – 2021. – T. 203. – №. 14. – C. 10.1128/jb.00114-21.

315. Wang T. et al. Sodium houthuyfonate in vitro inhibits biofilm dispersion and expression of *bdlA* in *Pseudomonas aeruginosa* //Molecular biology reports. – 2019. – T. 46. – C. 471-477.

316. Batinovic S. et al. Bacteriophages in natural and artificial environments //Pathogens. – 2019. – T. 8. – №. 3. – C. 100.

317. Nair A., Ghugare G. S., Khairnar K. An appraisal of bacteriophage isolation techniques from environment //Microbial ecology. – 2022. – C. 1-17.

318. Vlassov V. V., Tikunova N. V., Morozova V. V. Bacteriophages as therapeutic preparations: What restricts their application in medicine //Biochemistry (Moscow). – 2020. – T. 85. – C. 1350-1361.

319. Salmond G. P. C., Fineran P. C. A century of the phage: past, present and future //Nature Reviews Microbiology. – 2015. – T. 13. – №. 12. – C. 777-786.

320. Giri N. Bacteriophage structure, classification, assembly and phage therapy //Biosciences Biotechnology Research Asia. – 2021. – T. 18. – №. 2. – C. 239-250.

321. Ramirez-Chamorro L., Boulanger P., Rossier O. Strategies for bacteriophage T5 mutagenesis: expanding the toolbox for phage genome engineering //Frontiers in microbiology. – 2021. – T. 12. – C. 667332.



322. Maghsoodi A. et al. How the phage T4 injection machinery works including energetics, forces, and dynamic pathway //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2019. – T. 116. – №. 50. – C. 25097-25105.

323. Swanson N. A. et al. Expression and purification of phage T7 ejection proteins for cryo-EM analysis //STAR protocols. – 2021. – T. 2. – №. 4. – C. 100960.

324. Abdulrahman Ashy R., Agustí S. Low host abundance and high temperature determine switching from lytic to lysogenic cycles in planktonic microbial communities in a tropical sea (Red Sea) //Viruses. – 2020. – T. 12. – №. 7. – C. 761.

325. Wang Q. et al. Structural basis of the arbitrium peptide–AimR communication system in the phage lysis–lysogeny decision //Nature microbiology. – 2018. – T. 3. – №. 11. – C. 1266-1273.

326. Elahi Y., Nowroozi J., Fard R. M. N. Isolation and characterization of bacteriophages from wastewater sources on Enterococcus spp. isolated from clinical samples //Iranian Journal of Microbiology. – 2021. – T. 13. – №. 5. – C. 671.

327. Pires D. P. et al. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications //Applied microbiology and biotechnology. – 2016. – T. 100. – C. 2141-2151.

328. Lubowska N., Piechowicz L. Staphylococcus aureus biofilm and the role of bacteriophages in its eradication //POSTĘPY HIGIENY I MEDYCYNY DOSWIADCZALNEJ. – 2018. – T. 72. – C. 101-107.

329. Topka-Bielecka G. et al. Bacteriophage-derived depolymerases against bacterial biofilm //Antibiotics. – 2021. – T. 10. – №. 2. – C. 175.

330. Vázquez R., García P. Synergy between two chimeric lysins to kill Streptococcus pneumoniae //Frontiers in Microbiology. – 2019. – T. 10. – C. 1251.

331. Castillo D. et al. Phage defense mechanisms and their genomic and phenotypic implications in the fish pathogen *Vibrio anguillarum* //FEMS microbiology ecology. – 2019. – T. 95. – №. 3. – C. fiz004.
332. Reyes-Robles T. et al. *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection //Journal of bacteriology. – 2018. – T. 200. – №. 15. – C. 10.1128/jb.00792-17.
333. Harvey H. et al. *Pseudomonas aeruginosa* defends against phages through type IV pilus glycosylation //Nature microbiology. – 2018. – T. 3. – №. 1. – C. 47-52.
334. Biggs K. R. H. et al. Ecological approach to understanding superinfection inhibition in bacteriophage //Viruses. – 2021. – T. 13. – №. 7. – C. 1389.
335. Shi K. et al. Structural basis of superinfection exclusion by bacteriophage T4 Spackle //Communications biology. – 2020. – T. 3. – №. 1. – C. 691.
336. Ofir G. et al. DISARM is a widespread bacterial defence system with broad anti-phage activities //Nature microbiology. – 2018. – T. 3. – №. 1. – C. 90-98.
337. Liu Y. et al. Covalent modifications of the bacteriophage genome confer a degree of resistance to bacterial CRISPR systems //Journal of virology. – 2020. – T. 94. – №. 23. – C. 10.1128/jvi.01630-20.
338. Roy D. et al. IncC conjugative plasmids and SXT/R391 elements repair double-strand breaks caused by CRISPR–Cas during conjugation //Nucleic Acids Research. – 2020. – T. 48. – №. 16. – C. 8815-8827.
339. Wilkowska K. et al. Low-level expression of the Type II restriction–modification system confers potent bacteriophage resistance in *Escherichia coli* //DNA Research. – 2020. – T. 27. – №. 1. – C. dsaa003.

340. Smirnov S. V. et al. Fluorescence microscopy study of the effect of Esp1396I restriction-modification system proteins concentrations on protection against lambda phage //Journal of Physics: Conference Series. – IOP Publishing, 2018. – T. 1135. – №. 1. – C. 012016.
341. Mekler V. et al. CRISPR–Cas molecular beacons as tool for studies of assembly of CRISPR–Cas effector complexes and their interactions with DNA //Methods in enzymology. – Academic Press, 2019. – T. 616. – C. 337-363.
342. Borges A. L. et al. Bacterial alginate regulators and phage homologs repress CRISPR–Cas immunity //Nature microbiology. – 2020. – T. 5. – №. 5. – C. 679-687.
343. Fineran P. C. Resistance is not futile: Bacterial ‘innate’ and CRISPR–Cas ‘adaptive’ immune systems //Microbiology. – 2019. – T. 165. – №. 8. – C. 834-841.
344. Lopatina A., Tal N., Sorek R. Abortive infection: bacterial suicide as an antiviral immune strategy //Annual review of virology. – 2020. – T. 7. – C. 371-384.
345. Feyereisen M. et al. Identification of a prophage-encoded abortive infection system in *Levilactobacillus brevis*. – 2020.
346. Trotter A. J. et al. Recent and emerging technologies for the rapid diagnosis of infection and antimicrobial resistance //Current opinion in microbiology. – 2019. – T. 51. – C. 39-45.
347. Udaondo Z., Matilla M. A. Mining for novel antibiotics in the age of antimicrobial resistance //Microbial Biotechnology. – 2020. – T. 13. – №. 6. – C. 1702-1704.

348. Montso P. K., Mlambo V., Ateba C. N. Efficacy of novel phages for control of multi-drug resistant *Escherichia coli* O177 on artificially contaminated beef and their potential to disrupt biofilm formation //Food Microbiology. – 2021. – T. 94. – C. 103647.

349. Maszewska A. et al. Use of polyvalent bacteriophages to combat biofilm of *Proteus mirabilis* causing catheter-associated urinary tract infections //Journal of applied microbiology. – 2018. – T. 125. – №. 5. – C. 1253-1265.

350. Malik S., Nehra K., Rana J. S. Bacteriophage cocktail and phage antibiotic synergism as promising alternatives to conventional antibiotics for the control of multi-drug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* //Virus Research. – 2021. – T. 302. – C. 198496.

351. Zurabov F., Zhilenkov E. Characterization of four virulent *Klebsiella pneumoniae* bacteriophages, and evaluation of their potential use in complex phage preparation //Virology journal. – 2021. – T. 18. – №. 1. – C. 1-20.

352. Yu L. et al. A guard-killer phage cocktail effectively lyses the host and inhibits the development of phage-resistant strains of *Escherichia coli* //Applied microbiology and biotechnology. – 2018. – T. 102. – C. 971-983.

353. Oechslin F. et al. Synergistic interaction between phage therapy and antibiotics clears *Pseudomonas aeruginosa* infection in endocarditis and reduces virulence //The Journal of infectious diseases. – 2017. – T. 215. – №. 5. – C. 703-712.

354. Townsend E. M., Moat J., Jameson E. CAUTI's next top model—Model dependent *Klebsiella* biofilm inhibition by bacteriophages and antimicrobials //Biofilm. – 2020. – T. 2. – C. 100038.

355. Chaudhry W. N. et al. Synergy and order effects of antibiotics and phages in killing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms //PloS one. – 2017. – T. 12. – №. 1. – C. e0168615.

356. Kumaran D. et al. Does treatment order matter? Investigating the ability of bacteriophage to augment antibiotic activity against *Staphylococcus aureus* biofilms //Frontiers in microbiology. – 2018. – T. 9. – C. 127.
357. Gibb B., Hyman P., Schneider C. L. The many applications of engineered bacteriophages—An overview //Pharmaceuticals. – 2021. – T. 14. – №. 7. – C. 634.
358. Huss P., Raman S. Engineered bacteriophages as programmable biocontrol agents //Current opinion in biotechnology. – 2020. – T. 61. – C. 116-121.
359. Li M. et al. Recombination of T4-like Phages and its activity against pathogenic *Escherichia coli* in planktonic and biofilm forms //Virologica Sinica. – 2020. – T. 35. – C. 651-661.
360. Lu T. K., Collins J. J. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2007. – T. 104. – №. 27. – C. 11197-11202.
361. Dedrick R. M. et al. Engineered bacteriophages for treatment of a patient with a disseminated drug-resistant *Mycobacterium abscessus* //Nature medicine. – 2019. – T. 25. – №. 5. – C. 730-733.
362. Born Y. et al. Engineering of bacteriophages Y2:: dpoL1-C and Y2:: luxAB for efficient control and rapid detection of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora* //Applied and environmental microbiology. – 2017. – T. 83. – №. 12. – C. e00341-17.
363. Azeredo J., García P., Drulis-Kawa Z. Targeting biofilms using phages and their enzymes //Current Opinion in Biotechnology. – 2021. – T. 68. – C. 251-261.
364. Fernández L. et al. The perfect bacteriophage for therapeutic applications—a quick guide //Antibiotics. – 2019. – T. 8. – №. 3. – C. 126.

365. Park D. W., Park J. H. Characterization of a novel phage depolymerase specific to *Escherichia coli* O157: H7 and biofilm control on abiotic surfaces // *Journal of Microbiology*. – 2021. – T. 59. – C. 1002-1009.

366. Olszak T. et al. The O-specific polysaccharide lyase from the phage LKA1 tailspike reduces *Pseudomonas* virulence // *Scientific reports*. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 16302.

367. Wu Y. et al. A novel polysaccharide depolymerase encoded by the phage SH-KP152226 confers specific activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* via biofilm degradation // *Frontiers in Microbiology*. – 2019. – T. 10. – C. 2768.

368. Li M. et al. Identification of a phage-derived depolymerase specific for KL64 capsule of *Klebsiella pneumoniae* and its anti-biofilm effect // *Virus Genes*. – 2021. – T. 57. – №. 5. – C. 434-442.

369. Łusiak-Szelachowska M. et al. Anti-biofilm activity of bacteriophages and lysins in chronic rhinosinusitis // *Acta virologica*. – 2021. – T. 65. – №. 2.

370. Chen X. et al. Membrane-permeable antibacterial enzyme against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* // *ACS Infectious Diseases*. – 2021. – T. 7. – №. 8. – C. 2192-2204.

371. Landlinger C. et al. Engineered phage endolysin eliminates *Gardnerella* biofilm without damaging beneficial bacteria in bacterial vaginosis ex vivo // *Pathogens*. – 2021. – T. 10. – №. 1. – C. 54.

372. Letrado P. et al. Bactericidal synergism between antibiotics and phage endolysin Cpl-711 to kill multidrug-resistant pneumococcus // *Future Microbiology*. – 2018. – T. 13. – №. 11. – C. 1215-1223.

373. Olsen N. M. C. et al. Synergistic removal of static and dynamic *Staphylococcus aureus* biofilms by combined treatment with a bacteriophage endolysin and a polysaccharide depolymerase // *Viruses*. – 2018. – T. 10. – №. 8. – C. 438.

374. Remington A., Turner C. E. The DNases of pathogenic Lancefield streptococci // *Microbiology*. – 2018. – T. 164. – №. 3. – C. 242-250.

375. Remington A., Turner C. E. The DNases of pathogenic Lancefield streptococci // *Microbiology*. – 2018. – T. 164. – №. 3. – C. 242-250.

376. Pei R., Lamas-Samanamud G. R. Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing quorum-quenching enzymes // *Applied and environmental microbiology*. – 2014. – T. 80. – №. 17. – C. 5340-5348.

377. Stachler E., Kull A., Julian T. R. Bacteriophage treatment before chemical disinfection can enhance removal of plastic-surface-associated *Pseudomonas aeruginosa* // *Applied and environmental microbiology*. – 2021. – T. 87. – №. 20. – C. e00980-21.

378. He X. et al. Phage-guided targeting, discriminative imaging, and synergistic killing of bacteria by AIE bioconjugates // *Journal of the American Chemical Society*. – 2020. – T. 142. – №. 8. – C. 3959-3969.

379. Seethalakshmi P. S. et al. Shrimp disease management for sustainable aquaculture: innovations from nanotechnology and biotechnology // *Aquaculture International*. – 2021. – T. 29. – C. 1591-1620.

380. Bone S. et al. Physisorption and chemisorption of T4 bacteriophages on amino functionalized silica particles // *Journal of colloid and interface science*. – 2018. – T. 532. – C. 68-76.

381. Yu P. et al. Bottom-up biofilm eradication using bacteriophage-loaded magnetic nanocomposites: a computational and experimental study // *Environmental Science: Nano*. – 2019. – T. 6. – №. 12. – C. 3539-3550.

382. Li L. L. et al. Enhanced biofilm penetration for microbial control by polyvalent phages conjugated with magnetic colloidal nanoparticle clusters (CNCs) // *Environmental Science: Nano*. – 2017. – Т. 4. – №. 9. – С. 1817-1826.
383. Han X. et al. Impact of nano-TiO<sub>2</sub> on horizontal transfer of resistance genes mediated by filamentous phage transduction // *Environmental Science: Nano*. – 2020. – Т. 7. – №. 4. – С. 1214-1224.
384. Williams K. P., Branda S., Krishnakumar R. Therapeutic phages and methods thereof : пат. 11066691 США. – 2021.
385. da Costa Garcia M. Â. et al. Antibacterial phage, phage peptides and methods of use thereof : пат. 9222077 США. – 2015.
386. Fischetti V., Loomis L. Use of bacterial phage associated lysing enzymes for treating various illnesses : заяв. пат. 10104488 США. – 2002.
387. Fischetti V. A., Loeffler J. M., Nelson D. Phage-associated lytic enzymes for treatment of *Streptococcus pneumoniae* and related conditions : пат. 7569223 США. – 2009.
388. Belcher A. M., Tsedev U., Lam F. Homogeneous engineered phage populations : пат. 10987388 США. – 2021.
389. Bruessow H. et al. Isolated phages and their use in food or pet food products : пат. 7211426 США. – 2007.
390. Ioannou P., Baliou S., Samonis G. Bacteriophages in Infectious Diseases and Beyond—A Narrative Review // *Antibiotics*. – 2023. – Т. 12. – №. 6. – С. 1012.
391. Magill S. S. et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections // *New England Journal of Medicine*. – 2014. – Т. 370. – №. 13. – С. 1198-1208.



392. Khan H. A., Baig F. K., Mehboob R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance //Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. – 2017. – T. 7. – №. 5. – C. 478-482.

393. Ioannou P. et al. A Point Prevalence Survey of Healthcare-Associated Infections and Antimicrobial Use in Public Acute Care Hospitals in Crete, Greece //Antibiotics. – 2022. – T. 11. – №. 9. – C. 1258.

394. Metsini A. et al. Point prevalence of healthcare-associated infections and antibiotic use in three large Swiss acute-care hospitals //Swiss medical weekly. – 2018. – T. 148. – №. 1718. – C. w14617-w14617.

395. Yokoe D. S. et al. A compendium of strategies to prevent healthcare-associated infections in acute care hospitals: 2014 updates //Infection Control & Hospital Epidemiology. – 2014. – T. 35. – №. 8. – C. 967-977.

396. Kramer A., Schwebke I., Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review //BMC infectious diseases. – 2006. – T. 6. – №. 1. – C. 1-8.

397. Allegranzi B. et al. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis //The Lancet. – 2011. – T. 377. – №. 9761. – C. 228-241.

398. Otter J. A., Yezli S., French G. L. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens //Infection Control & Hospital Epidemiology. – 2011. – T. 32. – №. 7. – C. 687-699.

399. Otter, J.A.; Yezli, S.; Salkeld, J.A.G.; French, G.L. Evidence That Contaminated Surfaces Contribute to the Transmission of Hospital Pathogens and an Overview of Strategies to Address Contaminated Surfaces in Hospital Settings. Am. J. Infect. Control. 2013, 41, S6–S11.

400. Larramendy S. et al. Risk factors of extended-spectrum beta-lactamases-producing Escherichia coli community acquired urinary tract

infections: a systematic review //Infection and Drug Resistance. – 2020. – C. 3945-3955.

401. DeLeo F. R. et al. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era //The Journal of clinical investigation. – 2009. – T. 119. – №. 9. – C. 2464-2474.

402. Pachori P., Gothwal R., Gandhi P. Emergence of antibiotic resistance *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care unit; a critical review //Genes & diseases. – 2019. – T. 6. – №. 2. – C. 109-119.

403. Maurice N. M., Bedi B., Sadikot R. T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: host response and clinical implications in lung infections //American journal of respiratory cell and molecular biology. – 2018. – T. 58. – №. 4. – C. 428-439.

404. Lei H., Jones R. M., Li Y. Exploring surface cleaning strategies in hospital to prevent contact transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* //BMC infectious diseases. – 2017. – T. 17. – C. 1-9.

405. Hausemann A. et al. Cleaning and disinfection of surfaces in hospitals. Improvement in quality of structure, process and outcome in the hospitals in Frankfurt/Main, Germany, in 2016 compared to 2014 //GMS Hygiene and Infection Control. – 2018. – T. 13..

406. Goodman E. R. et al. Impact of an environmental cleaning intervention on the presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci on surfaces in intensive care unit rooms //Infection Control & Hospital Epidemiology. – 2008. – T. 29. – №. 7. – C. 593-599.

407. Wand M. E. et al. Mechanisms of increased resistance to chlorhexidine and cross-resistance to colistin following exposure of *Klebsiella*

pneumoniae clinical isolates to chlorhexidine //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2017. – T. 61. – №. 1. – C. 10.1128/aac. 01162-16.

408. Caselli E. et al. Impact of a probiotic-based cleaning intervention on the microbiota ecosystem of the hospital surfaces: focus on the resistome remodulation //Plos one. – 2016. – T. 11. – №. 2. – C. e0148857.

409. Jensen K. C. et al. Isolation and host range of bacteriophage with lytic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and potential use as a fomite decontaminant //PLoS One. – 2015. – T. 10. – №. 7. – C. e0131714.

410. Chen L. K. et al. Potential of bacteriophage  $\Phi$ AB2 as an environmental biocontrol agent for the control of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* //BMC microbiology. – 2013. – T. 13. – №. 1. – C. 1-10.

411. Ho Y. H. et al. Application of bacteriophage-containing aerosol against nosocomial transmission of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit //Plos one. – 2016. – T. 11. – №. 12. – C. e0168380.

412. D'Accolti M. et al. Efficient removal of hospital pathogens from hard surfaces by a combined use of bacteriophages and probiotics: potential as sanitizing agents //Infection and drug resistance. – 2018. – C. 1015-1026.

413. D'Accolti M. et al. Effective elimination of Staphylococcal contamination from hospital surfaces by a bacteriophage–probiotic sanitation strategy: a monocentric study //Microbial Biotechnology. – 2019. – T. 12. – №. 4. – C. 742-751.

414. Caselli E. et al. Impact of a probiotic-based hospital sanitation on antimicrobial resistance and HAI-associated antimicrobial consumption and costs: a multicenter study //Infection and Drug Resistance. – 2019. – C. 501-510.

415. Caselli E. et al. Reducing healthcare-associated infections incidence by a probiotic-based sanitation system: A multicentre, prospective, intervention study //PLoS One. – 2018. – T. 13. – №. 7. – C. e0199616.

416. Caselli E. et al. An innovative strategy for the effective reduction of MDR pathogens from the nosocomial environment //Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health: Volume 13. – 2019. – C. 79-91.

417. D'Accolti M. et al. Fighting AMR in the healthcare environment: microbiome-based sanitation approaches and monitoring tools //International journal of molecular sciences. – 2019. – T. 20. – №. 7. – C. 1535.

418. Huang S. S., Datta R., Platt R. Risk of acquiring antibiotic-resistant bacteria from prior room occupants //Archives of internal medicine. – 2006. – T. 166. – №. 18. – C. 1945-1951.

419. Bock L. J., Wand M. E., Sutton J. M. Varying activity of chlorhexidine-based disinfectants against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates and adapted strains //Journal of Hospital Infection. – 2016. – T. 93. – №. 1. – C. 42-48.

420. Liu S. et al. Phages against pathogenic bacterial biofilms and biofilm-based infections: a review //Pharmaceutics. – 2022. – T. 14. – №. 2. – C. 427.

421. Fernández L. et al. The perfect bacteriophage for therapeutic applications—a quick guide //Antibiotics. – 2019. – T. 8. – №. 3. – C. 126.

422. Chan B. K., Abedon S. T. Phage therapy pharmacology: phage cocktails //Advances in applied microbiology. – Academic Press, 2012. – T. 78. – C. 1-23.

423. Friman V. P. et al. Pre-adapting parasitic phages to a pathogen leads to increased pathogen clearance and lowered resistance evolution with *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis bacterial isolates //Journal of evolutionary biology. – 2016. – T. 29. – №. 1. – C. 188-198.

424. Hernandez C. A., Koskella B. Phage resistance evolution in vitro is not reflective of in vivo outcome in a plant-bacteria-phage system //Evolution. – 2019. – T. 73. – №. 12. – C. 2461-2475.

425. Niu Y. D. et al. Efficacy of individual bacteriophages does not predict efficacy of bacteriophage cocktails for control of *Escherichia coli* O157 //Frontiers in Microbiology. – 2021. – T. 12. – C. 616712.

426. Oechslin F. et al. Synergistic interaction between phage therapy and antibiotics clears *Pseudomonas aeruginosa* infection in endocarditis and reduces virulence //The Journal of infectious diseases. – 2017. – T. 215. – №. 5. – C. 703-712.

427. Rohde C. et al. Expert opinion on three phage therapy related topics: bacterial phage resistance, phage training and prophages in bacterial production strains //Viruses. – 2018. – T. 10. – №. 4. – C. 178.

428. Trudelle D. M. et al. Cross-resistance to phage infection in *Listeria monocytogenes* serotype 1/2a mutants //Food microbiology. – 2019. – T. 84. – C. 103239.

429. Wright R. C. T. et al. Resistance evolution against phage combinations depends on the timing and order of exposure //MBio. – 2019. – T. 10. – №. 5. – C. 10.1128/mbio.01652-19.

430. Abedon S. T., Danis-Wlodarczyk K. M., Wozniak D. J. Phage cocktail development for bacteriophage therapy: Toward improving spectrum of activity breadth and depth //Pharmaceuticals. – 2021. – T. 14. – №. 10. – C. 1019.

431. Chan B. K., Abedon S. T., Loc-Carrillo C. Phage cocktails and the future of phage therapy //Future microbiology. – 2013. – T. 8. – №. 6. – C. 769-783.

432. Ly-Chatain M. H. The factors affecting effectiveness of treatment in phages therapy //Frontiers in microbiology. – 2014. – T. 5. – C. 51.

433. Choudhury T. G. et al. Influence of some environmental variables and addition of r-lysozyme on efficacy of *Vibrio harveyi* phage for therapy //Journal of biosciences. – 2019. – T. 44. – C. 1-9.

434. Dąbrowska K. Phage therapy: What factors shape phage pharmacokinetics and bioavailability? Systematic and critical review //Medicinal research reviews. – 2019. – T. 39. – №. 5. – C. 2000-2025.

435. Lewis R., Hill C. Overcoming barriers to phage application in food and feed //Current opinion in biotechnology. – 2020. – T. 61. – C. 38-44.

436. Zhang Y. et al. Manufacturing and ambient stability of shelf freeze dried bacteriophage powder formulations //International journal of pharmaceutics. – 2018. – T. 542. – №. 1-2. – C. 1-7.

437. Jończyk E. et al. The influence of external factors on bacteriophages //Folia microbiologica. – 2011. – T. 56. – C. 191-200.

438. Madera C., Monjardín C., Suárez J. E. Milk contamination and resistance to processing conditions determine the fate of Lactococcus lactis bacteriophages in dairies //Applied and environmental microbiology. – 2004. – T. 70. – №. 12. – C. 7365-7371.

439. Watanabe R. et al. Efficacy of bacteriophage therapy against gut-derived sepsis caused by Pseudomonas aeruginosa in mice //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2007. – T. 51. – №. 2. – C. 446-452.

440. Langlet J. et al. Aggregation and surface properties of F-specific RNA phages: implication for membrane filtration processes //Water research. – 2008. – T. 42. – №. 10-11. – C. 2769-2777.

441. Mylon S. E. et al. Influence of salts and natural organic matter on the stability of bacteriophage MS2 //Langmuir. – 2010. – T. 26. – №. 2. – C. 1035-1042.

442. Balogh B., Nga N. T. T., Jones J. B. Relative level of bacteriophage multiplication in vitro or in phyllosphere may not predict in planta efficacy for controlling bacterial leaf spot on tomato caused by Xanthomonas perforans //Frontiers in Microbiology. – 2018. – T. 9. – C. 2176.

443. Chibani-Chennoufi S. et al. Phage-host interaction: an ecological perspective //Journal of bacteriology. – 2004. – T. 186. – №. 12. – C. 3677-3686.
444. Iriarte F. B. et al. Soil-based systemic delivery and phyllosphere in vivo propagation of bacteriophages: two possible strategies for improving bacteriophage persistence for plant disease control //Bacteriophage. – 2012. – T. 2. – №. 4. – C. e23530.
445. Merikanto I., Laakso J. T., Kaitala V. Outside-host phage therapy as a biological control against environmental infectious diseases //Theoretical Biology and Medical Modelling. – 2018. – T. 15. – C. 1-11.
446. Balogh B. et al. Improved efficacy of newly formulated bacteriophages for management of bacterial spot on tomato //Plant disease. – 2003. – T. 87. – №. 8. – C. 949-954.
447. León M., Bastías R. Virulence reduction in bacteriophage resistant bacteria //Frontiers in microbiology. – 2015. – T. 6. – C. 343.
448. Born Y. et al. Protection of Erwinia amylovora bacteriophage Y2 from UV-induced damage by natural compounds //Bacteriophage. – 2015. – T. 5. – №. 4. – C. e1074330.
449. Gill J. J. et al. Efficacy and pharmacokinetics of bacteriophage therapy in treatment of subclinical Staphylococcus aureus mastitis in lactating dairy cattle //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2006. – T. 50. – №. 9. – C. 2912-2918.
450. Gill J. J. et al. Bovine whey proteins inhibit the interaction of Staphylococcus aureus and bacteriophage K //Journal of applied microbiology. – 2006. – T. 101. – №. 2. – C. 377-386.
451. O'flaherty S. et al. Inhibition of bacteriophage K proliferation on Staphylococcus aureus in raw bovine milk //Letters in applied microbiology. – 2005. – T. 41. – №. 3. – C. 274-279.

452. Tom E. F. et al. Experimental evolution of UV resistance in a phage //PeerJ. – 2018. – T. 6. – C. e5190.

453. Inal J. M. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics //Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. – 2003. – T. 51. – №. 4. – C. 237-244.

454. Sulakvelidze A. Phage therapy: an attractive option for dealing with antibiotic-resistant bacterial infections //Drug discovery today. – 2005. – T. 12. – №. 10. – C. 807-809.

455. Koskella B., Taylor T. B. Multifaceted impacts of bacteriophages in the plant microbiome //Annual Review of Phytopathology. – 2018. – T. 56. – C. 361-380.

456. Doffkay Z. et al. Bacteriophage therapy against plant, animal and human pathogens //Acta Biologica Szegediensis. – 2015. – T. 59. – №. suppl. 2. – C. 291-302.

457. Adriaenssens E. et al. Bacteriophage LIMEstone isolates for the control of the soft rot bacterium 'Dickeya solani' on potato //Viruses of Microbes Conference. – 2012.

458. Adriaenssens E. M. et al. T4-related bacteriophage LIMEstone isolates for the control of soft rot on potato caused by 'Dickeya solani' //PloS one. – 2012. – T. 7. – №. 3. – C. e33227.

459. Boulé J. et al. Isolation and characterization of eight bacteriophages infecting Erwinia amylovora and their potential as biological control agents in British Columbia, Canada //Canadian journal of plant pathology. – 2011. – T. 33. – №. 3. – C. 308-317.

460. Czajkowski R., Ozymko Z., Lojkowska E. Isolation and characterization of novel soilborne lytic bacteriophages infecting Dickeya spp. biovar 3 ('D. solani') //Plant Pathology. – 2014. – T. 63. – №. 4. – C. 758-772.



461. Kim M. H., Park S. W., Kim Y. K. Bacteriophages of *Pseudomonas tolaasii* for the biological control of brown blotch disease //Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. – 2011. – T. 54. – C. 99-104.
462. Chen Y. et al. Specific integration of temperate phage decreases the pathogenicity of host bacteria //Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. – 2020. – T. 10. – C. 14.
463. Owen S. V. et al. A window into lysogeny: revealing temperate phage biology with transcriptomics //Microbial genomics. – 2020. – T. 6. – №. 2.
464. Balogh B. et al. Phage therapy for plant disease control //Current pharmaceutical biotechnology. – 2010. – T. 11. – №. 1. – C. 48-57.
465. Hay I. D., Lithgow T. Filamentous phages: masters of a microbial sharing economy //EMBO reports. – 2019. – T. 20. – №. 6. – C. e47427.
466. Ilyina T. S. Filamentous bacteriophages and their role in the virulence and evolution of pathogenic bacteria //Molecular Genetics, Microbiology and Virology. – 2015. – T. 30. – C. 1-9.
467. Ahmad A. A. et al. The filamentous phage XacF1 causes loss of virulence in *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, the causative agent of citrus canker disease //Frontiers in Microbiology. – 2014. – T. 5. – C. 321.
468. Karlsson F. et al. The mechanism of bacterial infection by filamentous phages involves molecular interactions between TolA and phage protein 3 domains //Journal of bacteriology. – 2003. – T. 185. – №. 8. – C. 2628-2634.
469. Loh B., Kuhn A., Leptihn S. The fascinating biology behind phage display: filamentous phage assembly //Molecular Microbiology. – 2019. – T. 111. – №. 5. – C. 1132-1138.
470. Casjens S. R., Hendrix R. W. Bacteriophage lambda: Early pioneer and still relevant //Virology. – 2015. – T. 479. – C. 310-330.

471. Hooton S. et al. *Campylobacter* bacteriophage DA10: an excised temperate bacteriophage targeted by CRISPR-cas //BMC genomics. – 2020. – T. 21. – C. 1-14.

472. Krupovič M., Bamford D. H. Putative prophages related to lytic tailless marine dsDNA phage PM2 are widespread in the genomes of aquatic bacteria //BMC genomics. – 2007. – T. 8. – C. 1-9.

473. Krupovic M., Forterre P. Microviridae goes temperate: microvirus-related proviruses reside in the genomes of Bacteroidetes //PloS one. – 2011. – T. 6. – №. 5. – C. e19893.

474. Melo L. D. R. et al. Isolation and characterization of a new *Staphylococcus epidermidis* broad-spectrum bacteriophage //Journal of General Virology. – 2014. – T. 95. – №. 2. – C. 506-515.

475. Ravin N. V. N15: The linear phage-plasmid //Plasmid. – 2011. – T. 65. – №. 2. – C. 102-109.

476. Ravin N. V. Replication and maintenance of linear phage-plasmid N15 //Microbiology Spectrum. – 2015. – T. 3. – №. 1. – C. 10.1128/microbiolspec.plas-0032-2014.

477. Al-Anany A. M., Fatima R., Hynes A. P. Temperate phage-antibiotic synergy eradicates bacteria through depletion of lysogens //Cell Reports. – 2021. – T. 35. – №. 8.

478. Chaudhry W. N. et al. Synergy and order effects of antibiotics and phages in killing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms //PloS one. – 2017. – T. 12. – №. 1. – C. e0168615.

479. Kebraei R. et al. Bacteriophage-antibiotic combination strategy: an alternative against methicillin-resistant phenotypes of *Staphylococcus aureus* //Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2020. – T. 64. – №. 7. – C. 10.1128/aac.00461-20.

480. Kim M. et al. Phage-antibiotic synergy via delayed lysis //Applied and environmental microbiology. – 2018. – T. 84. – №. 22. – C. e02085-18.
481. Rodriguez-Gonzalez R. A. et al. Quantitative models of phage-antibiotic combination therapy //MSystems. – 2020. – T. 5. – №. 1. – C. e00756-19.
482. Tagliaferri T. L., Jansen M., Horz H. P. Fighting pathogenic bacteria on two fronts: phages and antibiotics as combined strategy //Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2019. – T. 9. – C. 22.
483. Ambroa A. et al. Temperate bacteriophages (prophages) in *Pseudomonas aeruginosa* isolates belonging to the international cystic fibrosis clone (CC274) //Frontiers in microbiology. – 2020. – T. 11. – C. 556706.
484. Abdulrahman R. F., Davies R. L. Diversity and characterization of temperate bacteriophages induced in *Pasteurella multocida* from different host species //BMC microbiology. – 2021. – T. 21. – №. 1. – C. 1-20.
485. Casjens S. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? //Molecular microbiology. – 2003. – T. 49. – №. 2. – C. 277-300.
486. Feiner R. et al. A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria //Nature Reviews Microbiology. – 2015. – T. 13. – №. 10. – C. 641-650.
487. Menouni R. et al. Bacterial genome remodeling through bacteriophage recombination //FEMS microbiology letters. – 2015. – T. 362. – №. 1. – C. 1-10.
488. Paul J. H. Prophages in marine bacteria: dangerous molecular time bombs or the key to survival in the seas? //The ISME journal. – 2008. – T. 2. – №. 6. – C. 579-589.
489. Evans T. J. et al. Phage-selected lipopolysaccharide mutants of *Pectobacterium atrosepticum* exhibit different impacts on virulence //Journal of Applied Microbiology. – 2010. – T. 109. – №. 2. – C. 505-514.

490. Santos S. B. et al. Exploiting bacteriophage proteomes: the hidden biotechnological potential //Trends in biotechnology. – 2018. – T. 36. – №. 9. – С. 966-984.

491. Addy H. S. et al. Host range and molecular characterization of a lytic Pradovirus-like Ralstonia phage RsoP1IDN isolated from Indonesia //Archives of virology. – 2018. – T. 163. – С. 3409-3414.

492. Álvarez B., Biosca E. G. Bacteriophage-based bacterial wilt biocontrol for an environmentally sustainable agriculture //Frontiers in Plant Science. – 2017. – T. 8. – С. 1218.

493. Kawasaki T. et al. Genomic diversity of large-plaque-forming podoviruses infecting the phytopathogen Ralstonia solanacearum //Virology. – 2016. – T. 492. – С. 73-81.

494. Kawasaki T. et al. Genomic characterization of Ralstonia solanacearum phage  $\phi$ RSB1, a T7-like wide-host-range phage //Journal of bacteriology. – 2009. – T. 191. – №. 1. – С. 422-427.

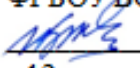
495. Brives C., Pourraz J. Phage therapy as a potential solution in the fight against AMR: obstacles and possible futures //Palgrave Communications. – 2020. – T. 6. – №. 1. – С. 1-11.

496. Budarina Z. I. et al. A new Bacillus cereus DNA-binding protein, HlyIIR, negatively regulates expression of B. cereus haemolysin II //Microbiology. – 2004. – T. 150. – №. 11. – С. 3691-3701.

497. Phelps R. J., McKillip J. L. Enterotoxin production in natural isolates of Bacillaceae outside the Bacillus cereus group //Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – T. 68. – №. 6. – С. 3147-3151.

498. Феоктистова Н. А. и др. Феоктистова Н. А. и др. Разработка систем генетической детекции фитотоксинов коронатина и сирингопептина в геномах бактериофагов Pseudomonas syringae //Вестник Ульяновской

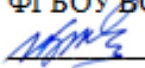
государственной сельскохозяйственной академии. – 2022. – №. 3 (59). – С. 128-134. //Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2022. – №. 3 (59). – С. 128-134.

УТВЕРЖДАЮ  
Первый проректор –  
проректор по научной работе и  
цифровой трансформации  
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ  
 И.И. Богданов  
«12» декабря 2023 года



**Методические рекомендации**  
по применению фагового биопрепарата (*Bacillus cereus*,  
*Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae*, *Listeria*  
*monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*)  
для биологической дезинфекции холодильных камер при  
хранении овощей (томаты, огурцы)

Ульяновск 2023

УТВЕРЖДАЮ  
Первый проректор –  
проректор по научной работе и  
цифровой трансформации  
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ  
 И.И. Богданов  
«12» декабря 2023 года



### **Методические рекомендации**

по изготовлению фагового биопрепарата (*Bacillus cereus*,  
*Bacillus pumilus*, *Pseudomonas syringae*, *Listeria*  
*monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*)  
для биологической дезинфекции холодильных камер при  
хранении овощей (томаты, огурцы)

Ульяновск 2023

Сульдина Екатерина Владимировна, старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы

Феоктистова Наталья Александровна, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы

Майоров Павел Сергеевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы

Мастыленко Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы

Богданов Ильгизар Исмаилович, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы

Бактериофаги для биологической дезинфекции. Монография – Ульяновск. – 240 с.

Подписано в печать 05.12.2023 г. Формат 60x90/16. Бумага офсетная  
Гарнитура Times New Roman. Усл. печ. л. 15. Тираж 500 экз. Заказ № 115/1

---

Адрес издателя: 432072, г. Ульяновск, 1-й Инженерный проезд, 17