БИОЛОГИЯ, БИОХИМИЯ, ГЕНЕТИКА

УДК 578, 579.66
DOI: 10.31040/2222-8349-2025-0-3-103-107

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ФАГОВОГО БИОДЕЗИНФЕКТАНТА ПРОТИВ *ESCHERICHIA COLI* ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ НА АБИОТИЧЕСКИХ ПОВЕРХНОСТЯХ

© Э.Р. Зулькарнеев, Н.В. Пименов

Пищевые инфекции, вызываемые патогенными *Escherichia coli*, представляют серьезную угрозу здоровью населения и экономике пищевой и перерабатывающей промышленности. Широкое применение химических дезинфицирующих средств для борьбы с бактериальной контаминацией в пищевой отрасли, несмотря на эффективность, сопряжено с рядом негативных последствий, включая коррозию оборудования и образование токсичных побочных продуктов, что требует поиска альтернативных решений. Одним из таких решений является использование бактериофагов – вирусов, избирательно инфицирующих бактерии.

Целью данного исследования стала разработка прототипа экологически безопасного биодезинфектанта на основе коктейля вирулентных бактериофагов Ec1-7 и Ec2-7, а также оценка его стабильности и эффективности при снижении бактериальной контаминации абиотических поверхностей.

В ходе работы был разработан прототип препарата с высоким титром фаговых частиц ($\geq 10^{10}$ БОЕ/мл), обладающий стабильностью в течение 6 месяцев хранения при температуре 2–8°C. Проведенные испытания показали, что фаговый коктейль эффективно снижал количество жизнеспособных клеток *E. coli* на поверхностях из нержавеющей стали (на 95.4%) и поливинилхлорида (на 99.5%) при экспозиции в течение 1 часа.

Полученные результаты подтверждают перспективность разработанного средства на основе бактериофагов для экологически безопасного снижения бактериальной контаминации в пищевой и перерабатывающей промышленности.

Ключевые слова: *E. coli*, бактериофаг, пищевая безопасность, коррозия, нержавеющая сталь, поливинилхлорид, дезинфектант.

Введение. По данным ФАО и ВОЗ, ежегодно регистрируется более 1.2 миллиона случаев заражения шигатоксин-продуцирующей *Escherichia coli* (STEC) через пищевые продукты, что приводит к 128 случаям летального исхода и утрате почти 13 000 лет жизни с учетом инвалидности (DALY) [1]. Одним из факторов, способствующих передаче патогенов, является способность микроорганизмов адгезироваться к поверхностям, используемым в пищевой и перерабатывающей промышленности, где они могут сохраняться в составе биопленок, что повышает риск кросс-контаминации, порчи продуктов и передаче патогенных микроорганизмов человеку [2].

Использование химических дезинфицирующих средств в пищевой и перерабатывающей промышленности играет ключевую роль в контроле пищевых патогенов. Однако их нерациональное применение может вызывать точечную и поверхностную коррозию металлических поверхностей различного оборудования [3]. Кроме того, существует риск образования потенциально опасных побочных продуктов дезинфекции, способных оказывать негативное влияние на органолептические свойства пищевой продукции [4, 5]. В условиях ужесточения требований к экологической безопасности возрастает необходимость разработки альтернативных или дополнительных стратегий борьбы с пищевыми патогенами.

Бактериофаги или фаги представляют собой вирусы, которые специфически инфицируют бактериальные клетки и рассматриваются в качестве перспективной альтернативы для борьбы с пищевыми патогенами [6]. Применение бактериофагов в качестве дезинфицирующих агентов обладает рядом существенных преимуществ: а) они являются естественными компонентами человеческого микробиома

ЗУЛЬКАРНЕЕВ Эльдар Ринатович – к.б.н., Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина, e-mail: elzz89@mail.ru
ПИМЕНОВ Николай Васильевич – д.б.н., Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина, e-mail: pimenov-nikolai@yandex.ru

и ежедневно непреднамеренно потребляются с пищей; б) как природные биологические агенты, бактериофаги полностью биоразлагаемы и не накапливаются в окружающей среде, в отличие от ряда химических дезинфицирующих средств; в) благодаря своей специфичности, фаги разрушают исключительно целевые бактериальные патогены, не нарушая баланс микробных сообществ в окружающей среде [7, 8].

Целью настоящего исследования являлось разработка прототипа биодезинфектанта на основе коктейля вирулентных бактериофагов, а также оценка его стабильности при хранении и эффективности при снижении бактериальной контаминации абиотических поверхностей.

Материалы и методы.

Конструирование прототипа дезинфицирующего средства на основе бактериофагов.

Прототип дезинфицирующего средства был разработан на основе двух вирулентных бактериофагов Ec1-7 и Ec2-7, хранящихся в лабораторной коллекции. Для получения бактериофагового коктейля использовали метод твердой агаровой среды [9]. Ночную бульонную культуру *Escherichia coli* O2:H6 штамма M7 (141 ST) наносили на скошенную поверхность 200 мл ГМФ-агара (НИЦФ, Россия) в литровых колбах Ру. После 3,5-часовой инкубации при 37°C лишнюю жидкость удаляли, затем на сформированный бактериальный газон наносили 2 мл суспензии бактериофагов в титре 10^6 БОЕ/мл, каждый фаг вносили в отдельную колбу и инкубировали при той же температуре еще 15 часов. Размноженные бактериофаги смывали с агаровой поверхности 10 мл стерильного 0.9% раствора NaCl после чего суспензию центрифугировали при 6000 × g в течение 20 мин и фильтровали через полиэфирсульфоновый фильтр с диаметром пор 0.22 мкм. Полученные фаголизаты концентрировали и очищали методом ультрафильтрации с помощью концентраторов Vivaspin 20 с отсечкой по молекулярной массе 100 кДа и ресуспендировали в стерильном 0.9% растворе NaCl.

Титр очищенных бактериофагов определяли методом двойных агаровых слоев и хранили при температуре 4°C. Средний титр фагов составлял $\geq 10^{10}$ БОЕ/мл. Для приготовления прототипа стерильные фаголизаты объединяли в коктейль до конечного титра не менее 10^{10} БОЕ/мл каждого бактериофага, используя 0.9% раствор NaCl в качестве буферного раствора (табл. 1). Образцы коктейля хранили в холодильнике при температуре 2–8°C на протяжении 12 месяцев.

Таблица 1

Рецептура дезинфицирующего средства на основе бактериофагов

Наименование компонента	Кол-во
Смесь стерильных бесклеточных фильтратов фаголизатов (Ec1-7; Ec2-7)	20.00 мл
Хлорид натрия	0.90 г
Дистиллированная вода	79.1 мл

Стерильность приготовленного прототипа проверяли путем инкубации 0,1 мл фаголизата в 5 мл тиогликолевой среде (HiMedia, India) при температурах 32.5 ± 2.5°C и 22.5 ± 2.5°C в течение 14 дней с ежедневным визуальным контролем. При отсутствии помутнения среды исследуемые образцы считались стерильными.

Стабильность титра при длительном хранении оценивали методом Грациа в соответствие с ОФС 1.7.1.0002.15 на протяжении 12 месяцев при температуре хранения 2–8°C.

Оценка эффективности дезинфицирующего средства.

Оценку эффективности проводили в соответствии с Руководством Р 4.2.3676–20 «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности». Эффективность бактериофаговой дезинфекции оценивали на «чистом» этапе санитарной обработки, то есть сразу после стандартной процедуры Clean-in-Place, когда видимое загрязнение и основная органика уже удалены с поверхности.

Поверхности и условия дезинфекции.

В качестве тест-объектов использовались пластины из поливинилхлорида (ПВХ) в соответствии с ГОСТ Р 50962. Листы ПВХ нарезали на фрагменты размером 5×5 см, промывали с мылом, высушивали, а затем протирали поверхность стерильной марлевой салфеткой, смоченной 6% раствором перекиси водорода.

Также в качестве тест-объектов применялись пластины из нержавеющей стали (размером 5×5 см) в соответствии с ГОСТ 5632–2014. Перед использованием они были вымыты с мылом, высушены и простерилизованы в течение 20 минут при температуре 121°C.

Инокуляция E. coli и методика нанесения фагов.

На дно стерильной чашки Петри помещали по одной пластине. С помощью пипетки на каждую из них наносили 0.1 мл взвеси *E. coli* M7 в концентрации 10^8 КОЕ/мл, после чего равномерно распределяли суспензию по поверхности с использованием стерильного шпателя. Образцы оставляли при комнатной температуре и относительной влажности воздуха 40–60% на 10–15 минут для подсушивания. Затем на поверхность каждой пластины наносили по 100 мкл фагового коктейля с титром 10^8 БОЕ/мл, равномерно распределяя его стерильным шпателем. На контрольные образцы по аналогичной схеме наносили стерильный физиологический раствор. Время экспозиции составляло 1 час.

Оценка эффективности дезинфекции.

После завершения экспозиции в каждую чашку с тест-объектом добавляли по 10 мл стерильного физиологического раствора и выполняли несколько круговых движений для обеспечения равномерного смачивания поверхности. Через несколько минут пластины переворачивали стерильным пинцетом и повторяли круговые движения. Затем из каждой чашки отбирали 100 мкл физиологического раствора, который наносили на агар Эндо и равномерно распределяли по поверхности с помощью стерильного шпателя. Чашки с посевами инкубировали при температуре +37°C. На следующий день проводили учет выросших колоний. Снижение концентрации *E. coli* оценивали, сравнивая показатели опытной группы с контрольной, принятой за 100%.

Статистический анализ.

Статистическую обработку результатов проводили в программе R версия 4.4.3 (R Foundation for Statistical Computing, Австрия). Результаты представлялись как среднее значение из пяти повторностей и стандартное отклонение, M±Sd. Оценку нормальности распределения проводили с помощью теста Шапиро–Уилка для малых выборок. Для оценки различий между группами использовался двухвыборочный *t*-критерий Стьюдента. Уровень статистической значимости устанавливался на уровне $p < 0.05$.

Результаты. В ходе проведенного исследования был сконструирован прототип дезинфицирующего средства в форме коктейля бактериофагов, предназначенного для снижения загрязнения абиотических поверхностей бактериями *E. coli* (табл. 2).

Таблица 2

Параметры дезинфицирующего средства на основе бактериофагов

Показатель	Результат испытаний
Титр	Не менее 10^{10} БОЕ/мл
pH	7.4
Стерильность	Стерильно
Подлинность	Вызывает специфический лизис бактерий *E. coli*

В рамках исследования стабильности титра бактериофагов при длительном хранении проводили определение количества фаговых частиц в 1 мл на протяжении 12 месяцев при температуре 2–8°C.

Установлено, что исследуемый фаговый коктейль сохранял стабильный титр в течение первых 6 месяцев хранения. На 9 и 12-м месяцах отмечалось снижение титра, однако оно не было статистически значимым (рис. 1).

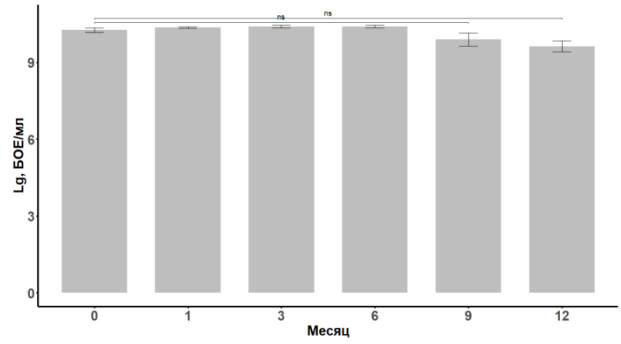

Рис. 1. Стабильность титра бактериофагов в течение 12 месяцев

Традиционные методы деконтаминации могут вызывать преждевременный износ оборудования вследствие коррозионного действия химических дезинфектантов, а также оказывать неблагоприятное влияние на органолептические свойства и пищевую ценность продуктов питания [10]. В настоящем исследовании была оценена эффективность бактериофагового коктейля в снижении поверхностного микробного загрязнения на материалах, таких как нержавеющая сталь – широко используемая в конструкции оборудования для пищевой промышленности [11].

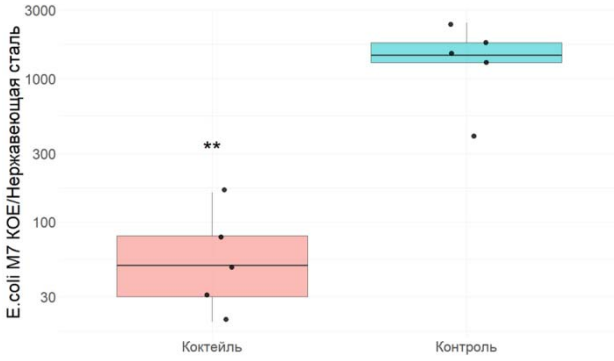

Рис. 2. Количество жизнеспособных клеток *E. coli* M7 на поверхности нержавеющей стали, обработанной коктейлем бактериофагов. ** $p < 0.01$

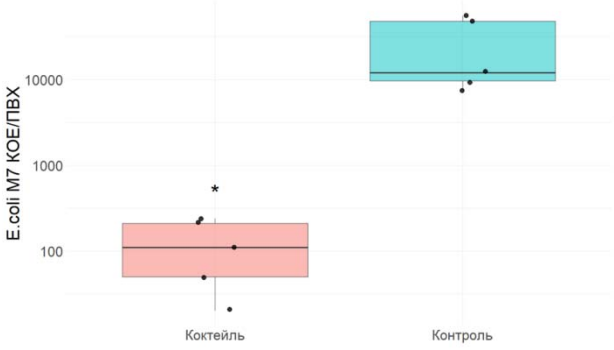

Рис. 3. Количество жизнеспособных клеток *E. coli* M7 на поверхности из ПВХ, обработанной коктейлем бактериофагов. * $p < 0.05$

После обработки искусственно контаминированной поверхности из нержавеющей стали бактериофаговым коктейлем в течение 1 часа наблюдалось снижение концентрации *E. coli* на 95.4 % по сравнению с контролем (рис. 2).

После обработки искусственно контаминированной поверхности из ПВХ фаговым коктейлем в течение одного часа концентрация *E. coli* снизилась на 99.5% (рис. 3). Полученные данные согласуются с результатами исследования Viazis и соавт. (2011), продемонстрировавшего эффективное подавление энтерогеморрагической *E. coli* (EHEC) O157:H7 в среднем на 0.5–5.25 log КОЕ при использовании фагового коктейля BEC8 на поверхностях из нержавеющей стали и полиэтилена высокой плотности при различных значениях множественности инфицирования и температурных режимах [12]. Кроме того, применение бактериофага AZO145A против биопленки STEC O145 на нержавеющей стали способствовало снижению уровня контаминации говядины со 100% до 25–41.7 % [13], что свидетельствует о снижении потенциальных рисков возникновения вспышек пищевых инфекций.

Заключение. Разработанный прототип дезинфицирующего средства на основе бактериофагов Ec1-7 и Ec2-7 продемонстрировал стабильность титра на протяжении шести месяцев хранения при температуре 2–8°C с незначительным снижением к 9 и 12 месяцам. Средство эффективно снижало искусственное загрязнение поверхностей из нержавеющей стали и поливинилхлорида бактериями *E. coli* M7, подтверждая его перспективность в качестве экологически безопасного биологического средства для снижения бактериальной контаминации в пищевой и перерабатывающей промышленности.

Литература

1. Organization W.H., Food, of the United Nations A.O. Attributing illness caused by Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) to specific foods: report. World Health Organization, 2019. 61 p.

2. Ortega M.P. et al. Adhesion behavior and removability of Escherichia coli on stainless steel surface // Food Control. 2010. V. 21. № 4. P. 573–578.

3. Chen Y. et al. Corrosion Behavior of 17-4PH Martensite Stainless Steel Sprayed with Sodium Hypochlorite Disinfectant // Corrosion. 2024. V. 80. № 3. P. 208–216.

4. Simpson A.M.-A., Mitch W.A. Chlorine and ozone disinfection and disinfection byproducts in postharvest food processing facilities: A review // Crit Rev Environ Sci Technol. 2022. V. 52. № 11. P. 1825–1867.

5. Quansah J.K., Adhikari K., Chen J. Validating the Efficacy of Sanitation Methods Commonly Used by Ghanaian Households in Inactivating Artificially Inoculated Salmonella enterica on Leafy Green Vegetables // J Food Prot. 2022. V. 85. № 4. P. 653–659.

6. Sillankorva S.M., Oliveira H., Azeredo J. Bacteriophages and Their Role in Food Safety // Int J Microbiol. 2012. V. 2012. P. 1–13.

7. Gindin M. et al. Bacteriophage for Gastrointestinal Health (PHAGE) Study: Evaluating the Safety and Tolerability of Supplemental Bacteriophage Consumption // J Am Coll Nutr. 2019. V. 38. № 1. P. 68–75.

8. Holtappels D., Alfenas-Zerbini P., Koskella B. Drivers and consequences of bacteriophage host range // FEMS Microbiol Rev. 2023. V. 47. № 4.

9. Лаишевцев А.И., Зулькарнеев Э.Р., Пименов Н.В., Киселева И.А., Багандова К.М., Мизаева Т.Э., Алешкин А.В. Биологические свойства штамма Salmonella phage BF-1356 и его эффективность при фаготерапии пуллороза кур // Сельскохозяйственная биология. 2024. Т. 59. № 4. С. 799–813 [Laishevtsev A.I., Zul'karneev E.R., Pimenov N.V.,

Kiseleva I.A., Bagandova K.M., Mizaeva T.E., Aleshkin A.V. Biologicheskie svoystva shtamma Salmonella phage BF-1356 i ego effektivnost' pri fagoterapii pulloroza kur // Sel'skokhozyaystvennaya biologiya, 2024, vol. 59, no. 4, pp. 799–813].

10. Moye Z.D., Woolston J., Sulakvelidze A. Bacteriophage Applications for Food Production and Processing // Viruses. 2018. V. 10, № 4. P. 205.

11. Gvaladze T., Lehnherr H., Hertwig S.A bacteriophage cocktail can efficiently reduce five important Salmonella serotypes both on chicken skin and stainless steel // Front Microbiol. 2024. V. 15.

12. Viazis S. et al. Reduction of Escherichia coli O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture // Int J Food Microbiol. 2011. V. 145, № 1. P. 37–42.

13. Wang C. et al. Bacteriophage biocontrol of Shiga toxigenic Escherichia coli (STEC) O145 biofilms on stainless steel reduces the contamination of beef // Food Microbiol. 2020. V. 92. P. 103572.

DEVELOPMENT AND EFFICIENCY EVALUATION OF PHAGE BIODISINFECTANT AGAINST *ESCHERICHIA COLI* FOR USE ON ABIOTIC SURFACES

© E.R. Zulkarneev, N.V. Pimenov

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology named after K.I. Skryabin,
23, ulitsa Akademika Skryabina, 109472, Moscow, Russian Federation

Foodborne infections caused by pathogenic *Escherichia coli* (*E. coli*) pose a serious threat to public health and the economy of the food processing industry. While the widespread use of chemical disinfectants to control bacterial contamination in the food industry is effective, it is also associated with a number of negative consequences, including corrosion of equipment and the formation of toxic by-products. This makes it necessary to search for alternative solutions. One such solution is the use of bacteriophages, which are viruses that infect and destroy bacteria.

This study aimed to develop an environmentally safe biodeinfectant based on a cocktail of virulent bacteriophages Ec1-7 and Ec2-7, and to evaluate its stability and effectiveness in reducing bacterial contamination of abiotic surfaces.

During the study, a prototype preparation containing a high concentration of phage particles ($\geq 10^{10}$PFU/mL) that remained stable for six months when stored at 2–8°C was developed. Tests showed that the phage cocktail effectively reduced the number of viable *E. coli* cells on stainless steel surfaces by 95.4% and on polyvinyl chloride surfaces by 99.5% when exposed for one hour.

These results confirm the promising potential of the developed bacteriophage-based agent for the environmentally safe biocontrol of bacterial contamination in the food and processing industry.

Keywords: *E. coli,* bacteriophage, food safety, corrosion, stainless steel, polyvinyl chloride, disinfectant.