ISSN 2074-9414 (Print)
ISSN 2313-1748 (Online)

https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-4-87-113
УДК 577.29:664

Обзорная статья
http://fptt.ru/

Использование молекулярно-генетических методов для микробиологического контроля пищевой продукции

М. И. Деревщикова, М. Ю. Сыромятников*, В. Н. Попов

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, 1

**e-mail: syromyatnikov@bio.vsu.ru*

Дата поступления в редакцию: 26.10.2018
Дата принятия в печать: 28.12.2018

© М. И. Деревщикова, М. Ю. Сыромятников, В. Н. Попов, 2018

Аннотация. В настоящее время для обнаружения и идентификации микроорганизмов разработан ряд технологий и коммерческих приложений, позволяющих выявлять нуклеиновые кислоты, входящие в состав микроорганизмов. Различные методы обнаружения и идентификации микроорганизмов активно разрабатываются в течение многих лет. Одним из наиболее перспективных направлений в молекулярно-генетической идентификации микробиоты в пищевых субстратах считаются технологии, основанные на анализе ДНК. Данный обзор посвящен рассмотрению различных аспектов идентификации микроорганизмов в пищевых субстратах на основе современной научной и методической литературы, а также запатентованных решений. Значительное внимание также уделено классическим методам идентификации микроорганизмов. Приводятся различные аспекты применения ПЦР для анализа микробных сообществ. Показано развитие современных технологий высокопроизводительного секвенирования (NGS) ДНК микробных сообществ в пищевых субстратах. Особе внимание уделено современным стратегиям идентификации патогенов с использованием NGS. Проведен анализ нормативной и методической литературы, а также анализ технических решений, раскрытых в источниках патентной литературы. Рассмотрены достоинства и недостатки различных методов исследования микроорганизмов в пищевых субстратах. В ходе проведенного обзора литературы показано, что наиболее многообещающим методом анализа присутствия прокариотических и эукариотических микроорганизмов, в том числе патогенных, является высокопроизводительное секвенирование.

Ключевые слова. Высокопроизводительное секвенирование (NGS), молекулярно-генетические методы идентификации микроорганизмов, контроль, ДНК, микробные сообщества

Для цитирования: Деревщикова, М. И. Использование молекулярно-генетических методов для микробиологического контроля пищевой продукции / М. И. Деревщикова, М. Ю. Сыромятников, В. Н. Попов // Техника и технология пищевых производств. – 2018. – Т. 48, № 4. – С. 87–113. DOI: https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-4-87-113.

Review article

Available online at http://fptt.ru/

Molecular Genetic Methods in Microbiological Control of Food Products

M.I. Derevshchikova, M.Yu. Syromyatnikov*, V.N. Popov

Voronezh State University, 1 Universitetskaya Square, Voronezh, 394018, Russia

**e-mail: syromyatnikov@bio.vsu.ru*

Received: November 26, 2018
Accepted: December 28, 2018

© M.I. Derevshchikova, M.Yu. Syromyatnikov, V.N. Popov, 2018

Abstract. There are a number of technologies and business applications that identify nucleic acids of various microorganisms. Technologies based on DNA analysis are the most promising direction in the molecular-genetic identification of the microbiota in food substrates. The present paper is a review of various aspects of microorganism identification in food substrates, their advantages and disadvantages. It features modern regulatory, scientific, and methodological sources, as well as patented solutions. The authors pay considerable attention to the classical methods and describe the use of polymerase chain reaction (PCR) in microbiota analysis. Then, they trace the development of next-generation sequencing (NGS) of DNA and how it can be used to identify pathogens in food substrates. So far, NGS proves to be the most advantageous method that identifies prokaryotic and eukaryotic microorganisms, as well as pathogens.

Keywords. Next-generation sequencing (NGS), molecular genetic methods for identifying microorganisms, control, DNA, microbiota

For citation: Derevshchikova M.I., Syromyatnikov M.Yu., and Popov V.N. Molecular Genetic Methods in Microbiological Control of Food Products. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2018, vol. 48, no. 4, pp. 87–113. (In Russ.). DOI: https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-4-87-113.

Введение

В настоящее время для обнаружения и идентификации микроорганизмов разработан ряд технологий и коммерческих приложений, позволяющих выявлять нуклеиновые кислоты, входящие в состав микроорганизмов. Различные методы обнаружения и идентификации микроорганизмов активно разрабатываются в течение многих лет. Эти методы можно разделить на три группы:

– классические методы идентификации микроорганизмов;
– методы ПЦР;
– высокопроизводительное секвенирование.

Среди методов идентификации биологических образцов микроорганизмов наибольшее распространение получили методы, основанные на анализе структуры ДНК. Прогресс в освоении методов ДНК-диагностики послужил стимулом для разработки и внедрения в практику высокочувствительных методик оценки качества и экспертизы продуктов питания, основанных на методе ПЦР. В методе ПЦР маркером жизнеспособности бактерий служит недолго живущий ген – специфичная мРНК, с помощью которой можно выделить патогенные бактерии. Молекулярно-генетические методы метагеномного анализа состава бактериального сообщества позволяют выявлять микроорганизмы в пищевых продуктах без предварительного культивирования и без выделения видоспецифических фрагментов по суммарной ДНК и амплификации генов, кодирующих рРНК.

Секвенирование следующего поколения (NGS) в совокупности описывает несколько технологий, которые обеспечивают массовое параллельное секвенирование гетерогенных фрагментов ДНК. Данный метод применим к мониторингу микробного сообщества, который заключается в амплифицированнии коротких фрагментов ДНК с использованием универсальных PCR-праймеров, нацеленных на известные маркерные гены, преимущественно прокариотические 16S rRNA и грибковые ITS гены.

Цель исследования – рассмотрение различных аспектов идентификации микроорганизмов в пищевых субстратах на основе современной научной и методической литературы, а также запатентованных решений.

Результаты и их обсуждение

1. Классические методы идентификации микроорганизмов. Традиционный методом микробиологического мониторинга сообщества микроорганизмов включает в себя выделение и культивирование микробиоты. В рамках данного направления осуществляются следующие методики: стандартный подсчёт колоний (КОЕ) [1], микроскопический подсчёт колоний [4], посев на скошенный агар [5]. Известен способ определения микроскопических грибов, бактерий и дрожжей путем высева анализируемых проб на селективные питательные среды в чашки Петри, термостатирования в течение 24–72 часов при температуре 25–37 ± 1 °С. О принадлежности микроорганизмов к данной группе судят по характеру роста на конкретной среде и по виду колоний. Способ весьма трудоемок и продолжителен во времени [1].

Известен быстрый (15–30 мин) способ определения микроскопических грибов, бактерий и дрожжей, основанный на методах окраски с последующим микроскопированием [2]. Способ включает следующие операции: приготовление фиксированного мазка исследуемого образца, окрашивание препарата, промывание водопроводной водой, подсушивание и микроскопирование с иммерсионной системой. О принадлежности микроорганизмов к бактериям, грибам или дрожжам судят по морфологическим особенностям окрашенного препарата.

Известен способ обнаружения микробов в молоке с помощью высева пробы в питательные среды [3]. Способ предусматривает смешивание исследуемых проб в различных разведениях с питательной средой, в качестве которой применяют питательный агар с 1 % глюкозы на основе из смеси панкреотического перевара молока, мяса или казеина и дрожжевого аутолизата (в отношении 3:1), культивирование смеси при 30–32 °С в течение 3 суток с последующим учетом образовавшихся колоний. Способ оказался неэффективным при обнаружении возбудителя сибирской язвы, когда он находится в пробе в малых концентрациях.

После разработки и применения новых микроскопических и микробиологических методов исследования было показано, что большинство микроорганизмов существует в окружающей среде в виде микробиологических сообществ (биопленок), образуемых на биотических и абиотических поверхностях. В составе этих сообществ обнаружены и некультивируемые формы членов сообщества. То, что бактериологическими методами не удается выделить индикаторные или патогенные бактерии в сырье и продуктах животного происхождения может объясняться переходом их в покоящееся состояние. Выделение таких покоящихся форм без культивирования на питательных средах возможно различными методами, например, прямого подсчета жизнеспособных клеток в комбинации с добавлением специфических моноклональных антител (МА); методами люминометрии для тестирования естественно люминесцентных бактерий (*Pseudomonas fluorescens* и др.) и бактерий, получивших гены, кодирующие комплекс ферментов люцеферин-люцеферазы, генно-инженерным способом; методами жидкостной флюорицитометрии, позволяющими определять общее число микробных клеток, в том числе погибших, живых и некультивируемых, но жизнеспособных клеток (такой метод требует

оборудование, реактивов-красителей и специальных компьютерных программ).

Химические методы. Метод основан на качественном и количественном определении выделяемых метаболитами микроорганизмов в питательную среду, которые подвергаются специфическим химическим реакциям [10]. К химическим методам в микробиологии относят определение термостабильной нуклеазы, измерение количества АТФ, радиометрию, флуорогенные и хромогенные субстраты. Присутствие *Salmonella aureus* в продуктах можно выявить, подвергнув продукт анализу на предмет присутствия термостабильной нуклеазы [22].

Радиометрия. Метод основан на включении в бактериальный метаболизм органики, содержащей радиоактивный углерод-14. Впервые радиометрия была применена для определения бактерий *Levin* и используется в клинической микробиологии, однако, в некоторых случаях она применима и для контроля качества продуктов и питьевой воды [26]. Previte использовал этот метод для определения присутствия *Salmonella aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Clostridium botulinum* и спор гнилостного анаэроба 3679 на говядине [36].

Серотипирование является наиболее распространённым методом для определения присутствия грамотрицательных бактерий, таких как *Salmonella* и *Esherichia*. Из грамположительных бактерий этим методом лучше всего определяются бактерии рода *Listeria*. Серологическая классификация сальмонелл была начата Kauffmann в начале 1940-х гг. [19].

Обогатительный серологический метод. 1–2 тест на сальмонелл схож с обогатительным серологическим методом, основанном на взаимодействии антител со штаммами сальмонелл, имеющими жгутики [19].

Радиоиммунологический анализ. Метод заключается в радиоактивном мечении антигенов, которые затем взаимодействуют с антителами [1].

В широком смысле иммунохроматографическая аналитическая система обозначает продольное или поперечное стекание культуральной жидкости по пластине-носителю, содержащей антитела, с прохождением иммунохимической реакции. Разработка иммунографических систем для обеспечения безопасности пищевой продукции и повышения контроля качества открывает новые направления исследований.

Активно разрабатываются и методы Lux-люминесценции для определения микроорганизмов, контаминирующих сырье и продукты животного происхождения. Широко применяются физические методы контроля: измерение сопротивления, биосенсоры, микрокалориметрия, проточная цитометрия.

Метод жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии. Жидкостная хроматография и тандемная масс-спектрометрия представляют собой метод аналитической химии, который объединяет физические возможности разделения жидкостной хроматографии с возможностями масс-анализа масс-спектрометрии. В то время как жидкая хроматография разделяет смеси с несколькими компонентами, масс-спектрометрия обеспечивает структурную идентичность отдельных компонентов с высокой молекулярной специфичностью и чувствительностью обнаружения [51]. Этот тандемный метод может быть использован для анализа биохимических, органических и неорганических соединений, обычно встречающихся в сложных образцах экологического и биологического происхождения. Поэтому LC-MS может применяться в широком спектре секторов, включая биотехнологию, мониторинг окружающей среды, пищевую промышленность, фармацевтическую, агрохимическую и косметическую промышленность [73]. Так, шведские ученые при помощи LC-MS провели количественный анализ церегулированного токсина *Bacillus cereus* в рисе и макаронах [74]. LC-MS также используется для анализа натуральных продуктов и профилирования вторичных метаболитов в растениях [75].

PAGE – метод фракционирования смесей белков в полиакриламидном геле в соответствии с их электрофоретической подвижностью. Разделение белков, которое необходимо для идентификации токсинов в пищевых продуктах, проводят с помощью жидкостной хроматографии, но также используются методы на основе геля. Анализ бактериальной секреции белков позволяет выявить роль секретируемых, мембранных и клеточных белков в патогенности [76]. В одном из таких исследований для анализа секретов резистентного к метициллину штамма *Staphylococcus aureus* использовали натрий-додецилсульфатный полиакриламидный гель-электрофорез (SDS PAGE) и сильное катионообменное фракционирование, объединенное с тандемной масс-спектрометрией. Было идентифицировано в общей сложности 174 различных энтеротоксинов [77].

Для оценки патогенности и токсигенности выделенных штаммов микроорганизмов разработаны методы биотестирования на лабораторных животных и на клеточных культуральных системах.

Для своевременной оценки безопасности сырья и продукции принципиальное значение имеет время получения результатов. Так, проточный цитофлуориметр BD FACSMicroCount позволяет проверить сырье, промежуточный и конечный продукт в течение 24 ч. Метод позволяет проводить количественный учет как микроорганизмов – контаминантов, так и необходимых для технологического процесса микроорганизмов. Например, подсчет пробиотических молочнокислых бактерий. Флуоресцентный краситель нуклеиновых кислот проникает в мембрану и связывается с нуклеиновыми кислотами, а дополнительный реагент связывается со свободным флуоресцентным

красителем в растворе не попавшим в погибшие клетки и останавливает флуоресценцию. Сфокусированный лазерный луч с длиной волны 639 нм сталкивается с меченым микроорганизмом, а датчики светорассеяния и флуоресценции в оптической системе формируют графическое отображение результатов анализа

Все вышеперечисленные методы часто трудоемки и длительны, а идентификация за пределами родового уровня часто затруднена. К примеру, они позволяют выявить сальмонеллы и листерии в продуктах питания в течение четырех-пяти дней, биохимическая и серологическая идентификации дополнительно занимают два-три дня. Таким образом, определить насколько опасен продукт можно уже после того, как он поступит в продажу и к потребителям.

2. Использование метода ПЦР для анализа микробных сообществ. Среди методов идентификации биологических образцов микроорганизмов наибольшее распространение получили методы, основанные на анализе структуры ДНК. Прогресс в освоении методов ДНК-диагностики послужил стимулом для разработки и внедрения в практику высокочувствительных методик оценки качества и экспертизы продуктов питания, основанных на методе ПЦР.

В методе ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) маркером жизнеспособности бактерий служит недолго живущий ген – специфичная мРНК, с помощью которой можно выделить патогенные бактерии, в том числе сальмонеллы и листерии и санитарно-показательные микроорганизмы, например, *Enterococcus faecalis* и др.

Молекулярно-генетические методы метагеномного анализа состава бактериального сообщества позволяют выявлять микроорганизмы в пищевых продуктах без предварительного культивирования и без выделения видоспецифических фрагментов по суммарной ДНК и амплификации генов, кодирующих рРНК. Для большинства бактерий уже существуют банки данных для последовательностей рРНК и генов, их кодирующих. В настоящее время методы с использованием ПЦР и праймеров на основе прямого секвенирования частиц или почти полных 16S и 23S ДНК широко используются для идентификации как некультивируемых форм известных бактерий, так и неизвестных микроорганизмов, которые не могут расти на обычных питательных средах и в используемых условиях культивирования.

Основные молекулярно-биологические методы, используемые для дифференциации и идентификации организмов, можно разделить на три категории: методы, базируемые на рестрикции, на амплификации (ПЦР) и на совокупности последних.

К первой группе относится техника RFLP, которая заключается в фрагментировании нативной ДНК исследуемого организма с помощью ферментов рестриктаз и последующим разделении полученных фрагментов при помощи Пульс-Гель Электрофореза (PFGE) [4]. Обладая оригинальным принципом разделения фрагментов ДНК в геле, тем не менее данный метод весьма трудоемок на стадии получения и рестрикции целой нефрагментированной ДНК.

Ко второй группе относятся такие техники, как: AP-ПЦР – случайная ПЦР, осуществляемая без знания нуклеотидной последовательности организма, основанная на геномном распределении случайных повторов [5]; гер-ПЦР – техника представляет собой комплекс праймеров на часто повторяющиеся в геномах энтеробактерий последовательности, получившие названия [6]; микросаттелитная ПЦР – техника, основанная на геномном распределении микросаттелитных последовательностей типа (GC)4, (GTG)5 [7–9]; тРНК-ПЦР – техника, основанная на геномном распределении консервативных участков генов тРНК [10]; IS-ПЦР – техника, основанная на геномном распределении последовательностей мобильных элементов, встречаемых в геноме исследуемого организма gyrB [11, 12]; ПЦР анализ с праймерами на целевые гены (такими генами могут быть гены домашнего хозяйства (housekeeping) [13–16], рибосомальный кластер (16S рРНК, межгенная область, расположенная между генами 16S рРНК и 23S рРНК, 23S рРНК) [17], а также симбиотические гены (sym-гены, nod-гены) [18, 19], гены патогенности (hrp) [20–22] и др.), секвенирование ДНК [23].

К третьей группе методов относятся: AFLP и его различные модификации [24, 25]. saAFLP – техника, основанная на сопоставлении длин амплифицированных фрагментов, получаемых путем первоначального фрагментирования общей ДНК организма ферментами рестриктазами, затем легирования полученных рестрикционных фрагментов с короткими (10–30 п. о.) двухцепочечными нуклеотидными последовательностями (адаптерами) и последующей ПЦР с праймерами, нуклеотидные последовательности которых комплиментарны последовательностям адаптеров. ПЦР-RFLP – техника, основанная на сопоставлении длин рестрикционных фрагментов целевых генов, накопленных предварительно в большой концентрации путем ПЦР [26, 27].

У каждого из этих методов есть свои преимущества и недостатки, однако, их совокупное использование позволяет обеспечить высокую достоверность идентификации и последующей дифференциации таксономических порядков разного уровня.

Известна методика, основанная на амплификации, секвенировании и/или рестрикции межгенного региона рибосомального кластера 16S рРНК и 23S рРНК, позволяющая одновременно определять, идентифицировать и дифференцировать различные таксоны прокариот.

Известны методические указания, устанавливающие метод ускоренного выявления (посредством

ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией) в пищевых продуктах патогенных бактерий – возбудителей острых и хронических инфекционных заболеваний с пищевым путем передачи (родов *Salmonella*, *Shigella* (в комплексе с энтероинвазивными *E. coli*), вида *Enterobacter* (*Cronobacter*) *sakazakii*, энтерогеморрагических веротоксигенных *Escherichia coli*, термофильных *Campylobacter* spp. видов *C. jejuni, C. coli, C. lari*, а также *Listeria monocytogenes*) [27]. Представленный в настоящих указаниях метод является альтернативным классическому бактериологическому посеву и предусматривает ускоренное определение наличия или отсутствия ДНК и, соответственно, бактерий в определенной массе (объеме) пищевого продукта, подвергнутого инкубации в жидких селективных питательных средах (при необходимости дополнительно прединкубации в неселективных средах).

Принципом метода является выявление путем ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией последовательностей (фрагментов) ДНК, строго специфических для геномов бактерий. В основе ПЦР лежит многократное увеличение числа копий (амплификация) нуклеотидных фрагментов – мишеней ДНК, ферментом Taq-полимеразой в присутствии синтетических олигонуклеотидных праймеров и дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. Так, например, гибридизация флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов, присутствующих в составе реакционной смеси, с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени сопровождается нарастанием флуоресценции. Измерение интенсивности флуоресцентного сигнала позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации.

Все диагностические системы, основанные на амплификации нуклеиновых кислот, значительно чувствительнее других методик. Так, метод ПЦР позволяет обнаружить в образце одиночные молекулы нуклеиновых кислот микроорганизма за достаточно короткое время [29–30].

Не менее важной характеристикой диагностических методов является специфичность, поскольку необходимо свести к минимуму фоновые сигналы и устранить ложноположительные результаты в образцах, которые зачастую представляют собой сложную смесь органических и неорганических соединений. При этом «неспецифика» может также возникать в случае наличия в пробах высоких концентраций конкурирующих антигенов или фрагментов ДНК. В случае с методами, основанными на ПЦР, высокая чувствительность может быть их слабым местом вследствие возможной контаминации образца и получения ложноположительного результата из-за ингибирования работы полимеразы различными веществами, включая гуминовые кислоты и гем.

Другим важным требованием к диагностическим методам является их воспроизводимость. На этот параметр может влиять целый ряд факторов, таких как стабильность реагентов и различия в условиях анализа.

Таким образов, использование ПЦР имеют целый ряд очевидных преимуществ перед традиционными методами исследования идентификационных генетических маркеров:

– более высокая информативность;

– возможность проводить в едином комплексе исследование значительного числа генетических маркеров, в том числе различных по их экспертной функции (например, маркеров полиморфных локусов), что методически удобно и обеспечивает экономное расходование экспертного материала и максимальную сопоставимость результатов исследования;

– применение праймеров, специфичных для ДНК микроорганизмов, позволяет избежать актуальной для иммунологических методов проблемы ложноположительных результатов вследствие загрязнения;

– вещества, содержащиеся в предмете-носителе, в ряде случаев могут приводить к отрицательному результату типирования за счет ингибирования ПЦР. Однако в иммунологических методах влияние предмета-носителя может создавать риск получения ложноположительного результата, что более опасно;

– результаты ДНК-анализа наглядны; легко документируются, что позволяет сохранить и предоставить первичные материалы. Это обеспечивает высокую достоверность данных, а, следовательно, повышает ценность экспертного заключения;

– метод ПЦР хорошо поддается автоматизации, тем самым обеспечивается высокая пропускная способность метода, стандартность выполнения процедуры, сведение к минимуму риска ошибок за счет субъективного фактора.

3. Развитие современных технологий высокопроизводительного секвенирования ДНК микробных сообществ. Секвенирование следующего поколения (NGS) в совокупности описывает несколько технологий, которые обеспечивают массовое параллельное секвенирование гетерогенных фрагментов ДНК. Данный метод применим к мониторингу микробного сообщества, который заключается в амплифицированнии коротких фрагментов ДНК с использованием универсальных PCR-праймеров, нацеленных на известные маркерные гены, преимущественно прокариотические 16S rRNA и грибковые ITS гены. На данный момент только две системы NGS используются для профилирования микробных сообществ: это секвенирующие платформы 454 Life Sciences пиросеквенирование [28] и Illumina [29].

NGS обеспечивает представление о составе микробных популяций и показывает, что улучшение и применение таких методов в пищевой микробиологии может быть отличным способом для детального анализа микробиологического качества пищи. Идентификация критических этапов

производственного процесса может иметь большое значение для контроля микробной нагрузки и предлагать решения для безопасного производства продуктов питания [30].

Общий принцип методов секвенирования нового поколения, основанных на предварительной амплификации матриц, приблизительно одинаков независимо от реагентно-аппаратной базы. Он включает: стадию получения библиотек, заключающуюся в получении небольших фрагментов ДНК и введении в их состав адаптерных нуклеотидных последовательностей для закрепления на носителе и отжига специфических праймеров для секвенирования; стадию иммобилизации полученных фрагментных библиотек на микросферах или поверхности проточной ячейки с последующей амплификацией с помощью эмульсионной или мостиковой PCR соответственно; стадию гибридизации специфических праймеров с адаптерными участками и непосредственно секвенирования.

При этом подходе прочтение последовательности всегда связано с достройкой комплементарной цепи. Причем достройка может осуществляться либо путем синтеза новой цепи, либо путем легирования. Достройка цепи сопровождается испусканием сигнала, природа которого зависит от типа платформы для секвенирования. Сигнал регистрируется прибором, который переводит его в последовательность нуклеотидов.

Преимущества NGS в отношении методов профилирования первого поколения, таких как DGGE и TRFLP, многочисленны. Все системы секвенирование следующего поколения за один прогон читают сразу несколько участков генома. Таким образом, NGS позволяет сравнивать сообщества по филогенетическому сходству [32].

NGS – это постоянно развивающаяся технология и наряду с ее многочисленными преимуществами возникают новые проблемы для анализа. Основными проблемами являются: вычислительный анализ, мощность и хранение полученных данных. Множественные результаты, полученные на платформах NGS, затрачивают гигабайты памяти на жестком диске и значительные вычислительные мощности для обработки этих файлов. Требования к этим параметрам растут параллельно с увеличением охвата чтения [30].

Все модификации NGS можно поделить на две большие группы: первый тип методов основан на секвенировании заранее амплифицированных фрагментов ДНК из пробы, второй тип связан с прочтением первичной последовательности единичных молекул. Некоторые из них достаточно экзотичны. Например, чтение нуклеотидных остатков ДНК электронным или оптическим способом по мере того, как молекула «протискивается» через нанопору. Длинный перечень улучшений системы капиллярного электрофореза в сочетании с возрастающей автоматизацией и усовершенствованием программного обеспечения позволили снизить стоимость секвенирования в 13 раз с тех пор, как первые автоматические секвенаторы появились в прошлом десятилетии.

Пиросеквенирование или 454-секвенирование, появившееся первым из всех методов NGS, использует для детекции светового сигнала, возникающего при достройке комплементарной цепи ДНК [32–34], в то время как полупроводниковое секвенирование основано на фиксации изменения pH, происходящего вследствие отщепления протона при образовании фосфодиэфирных связей при достройке цепи [35–38].

Третий вариант — это секвенирование путем лигирования, при котором детектируется флуоресцентный сигнал, возникающий в процессе достройки комплементарной цепи в ячейке. Через неё пропускают смесь, содержащую лигазу и специальные флуоресцентно меченные нуклеотидные зонды (октамеры) [39]. Наиболее распространенным вариантом является секвенирование путем синтеза с использованием обратимо терминированных флуоресцентных нуклеозидтрифосфатов. Амплификация проводится внутри проточной пористой ячейки, через которую пропускаются реагенты для синтеза ДНК [40]. В результате амплификации с использованием мостиковой ПЦР внутри каналов ячейки генерируются кластеры копий исходных фрагментов библиотеки, каждый из которых соответствует одному прочтению. Высокая плотность кластеров (до 800–900 тыс. на мм^2) обеспечивает максимально большой объем получаемых данных. Затем полученные кластеры молекул ДНК секвенируются по принципу, сходному с секвенированием по методу Сэнгера [41, 42].

К недостаткам методов высокопроизводительного секвенирования, основанных на предварительной амплификации ДНК-фрагментов, можно отнести:

1. ошибки в гомополимерных участках и местах, где имеются однонуклеотидные полиморфизмы; сложности разрешения в повторах;
2. зависимость точности прочтения от GC-состава фрагментов ДНК и т. д [43–45].

Поэтому в настоящее время разрабатывают альтернативные методы секвенирования, в частности мономолекулярное секвенирование.

Одна из технологий мономолекулярного секвенирования основана на пропускании секвенируемого участка ДНК через активный центр ДНК-полимеразы. Высокочувствительной CCD-камерой фиксируется сигнал от присоединения флуоресцентно меченого нуклеотида, попадающего в активный центр ДНК-полимеразы в процессе достройки комплементарной цепи. При присоединении нуклеотида флуоресцентная метка отщепляется и сигнал падает до фонового уровня. Затем в активный центр попадает следующий нуклеотид, и цикл повторяется [46]. Используемая в этой технологии ДНК-полимераза

фага φ29 высокопроцессивна, скорость ее работы составляет около 10 нуклеотидов в секунду. Эта технология позволяет прочитывать длинные молекулы ДНК (до 10–20 тыс. п. о.) и имеет целый ряд практических приложений [47–53]. Другим вариантом мономолекулярного секвенирования является секвенирование с использованием мембран с нанопорами: если мембрану, содержащую такие поры, поместить в электрофоретическую ячейку, то одноцепочечные молекулы ДНК могут протягиваться через пору. При этом происходит изменение силы тока, проходящего через мембрану [54]. При таком протягивании в зависимости от типа нуклеотида происходит определенное по амплитуде и продолжительности изменение силы тока, что дает возможность определить, какой именно нуклеотид находится в полости поры именно сейчас.

В настоящее время существует только одна коммерческая серия компактных приборов, в которых реализована данная стратегия секвенирования (MinION компании Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Они распространяются в рамках программы раннего доступа [55].

К безусловным преимуществам нанопорового секвенирования относится возможность делать длинные прочтения без покупки дорогостоящего оборудования. В качестве недостатков отмечают высокую частоту ошибок: 12–20 % [62].

Однако в настоящий момент все больше исследователей признают перспективность нанопорового секвенирования для метагеномных исследований, секвенирования небольших геномов, идентификации вирусных и бактериальных инфекционных агентов.

Современные методы секвенирования ДНК также можно условно разделить на три основных вида: классические – секвенирование с помощью капиллярного электрофореза и пиросеквенирование; новые («второго» поколения – Next Generation Sequencing – NGS) – проводят одновременно секвенирование миллионов фрагментов ДНК, каждый из которых представлен кластером из многих тысяч или сотен тысяч своих клонов – это высокопроизводительное пиросеквенирование, циклическое лигазное и полупроводниковое секвенирование, секвенирование на молекулярных кластерах с использованием флуоресцентно меченых предшественников; новейшие («третьего» поколения – Next-Next Generation Sequencing – NNGS) методы секвенирования, которые считывают информацию с миллионов единичных фрагментов ДНК без их предварительного клонирования [57].

3.1. Современные стратегии идентификации патогенов с использованием NGS. Основными группами патогенов, представляющих наибольшую опасность для человека, являются бактерии и вирусы. Другие патогены, такие как грибы или протисты, не менее опасны, однако, обычно не требуют генетического анализа для идентификации. На сегодняшний день основным приемом, позволяющим охарактеризовать разнообразие микроорганизмов в пробе, является метагеномный анализ. Подобный анализ стал возможным (и даже рутинным) благодаря разработке методов высокопроизводительного секвенирования. Биоразнообразие пробы характеризуют с помощью двух стратегий: таргетного секвенирования выбранных маркерных участков и полноценного тотального секвенирования метагенома.

Первый способ существенно проще технически, требует меньших временных и финансовых затрат на подготовку образцов, секвенирование и обработку данных. Однако он имеет существенное ограничение: позволяет провести только оценку разнообразия, тогда как второй способ позволяет получить исчерпывающую информацию о составе и генетических свойствах конкретного сообщества.

Обычно в качестве маркерных участков в метагеномных образцах используют участки генов 16S или 18S рРНК у прокариот и эукариот или ITS-участки грибов [79–81].

В зависимости от задачи маркерные участки могут быть и иными. К примеру, для характеристики резистома в метагеномном образце используют участки генов устойчивости к антибиотикам.

Второй способ требует существенно больших временных и финансовых затрат, но при тотальном секвенировании метагеномов получают полногеномные данные, представляющие собой различные фрагменты ДНК организмов, содержащихся в анализируемом метагеномном образце, на основе которых впоследствии собирают референсный геном.

Анализируют подобные данные тремя различными способами. Первый способ предусматривает сравнение определенных маркерных последовательностей генов с известными последовательностями базы данных для подобных генов определенных организмов [82–84]. Второй способ основан на кластеризации всех чтений образца по таксономическим группам, например, на основе их сходства с известными полногеномными последовательностями [85–88].

Наконец, третий способ связан со сборкой полученных контигов в целые гены или даже геномы de novo [88, 90].

В случае с идентификацией новых патогенов группа методов анализа данных тотального секвенирования метагенома может быть наиболее важной, поскольку позволяет не только оценить биоразнообразие образца, но и идентифицировать в его составе отдельные гены.

Таким образом, оба подхода имеют свои достоинства и ограничения: секвенирование маркерных участков позволяет быстро и с небольшими материальными затратами установить разнообразие генетического материала в образце, тогда как результаты тотального секвенирования метагенома позволяют получить исчерпывающую

информацию о патогенных детерминантах (метатоксиком, метарезистом и пр.). Большая часть этой информации не будет представлять ценности, но позволит не упустить генетические элементы, обусловливающие эпидемическое значение патогенов в составе образца. Целесообразно заменять полногеномный анализ сложным реагентным комплексом, состоящим из нескольких сотен олигонуклеотидных последовательностей, комплементарных наиболее важным и эпидемически значимым патогенным детерминантом, что позволит ускорить и удешевить процедуру метагеномгой характеристики образца. Использование тотального/полногеномного секвенирования может быть оправдано в отдельных сложных случаях уже после первичной детекции для подробной характеристики генетических особенностей смешанного образца или уже изолированного патогена.

Существующие методы NGS идеально подходят для анализа, идентификации и расшифровки генома выделенных в чистую культуру прокариотических организмов и открывают новые возможности в области идентификации неизвестных патогенов в смеси микроорганизмов. Определенную сложность при метагеномной характеристике образцов на предмет содержания в них прокариотических организмов представляют выявление фактов горизонтального переноса генов от одного члена метагенома к другому и корректное распределение информации по отдельным представителям микробного сообщества.

Решением этих проблем для хромосомных генетических элементов является повышение степени покрытия отдельными рядами хромосомных последовательностей отдельных компонентов метагенома.

Фактором, определяющим качество получаемой в результате секвенирования информации, является пробоподготовка образца. Ее влияние прослеживают, анализируя особенности идентификации вирусов.

Использование секвенирования по Сэнгеру позволяет «считывать» последовательности до 1000 пар нуклеотидов и применяется для небольших фрагментов генома/генов. Оно используется для:

1. секвенирования отдельных участков генома с целью анализа мутаций и полиморфизмов;
2. идентификации вирусов и организмов (бактерий, растений, грибов и животных);
3. валидации данных, полученных на платформах NGS;
4. микросателлитного анализа;
5. анализа делеций и инсерций (малых и протяженных).

Наиболее популярными секвенаторами, использующими технологию секвенирования по Сэнгеру, являются приборы, производимые компанией Thermo Fisher Scientific: 3730xL, 3730, 3500xL, 3500, 3130xL, 3130, 310. Следует отметить, что все описанные выше типы исследований сейчас можно проводить с помощью NGS, однако, главные плюсы секвенирования по Сэнгеру – высокая точность (достоверность) полученных данных и невысокая стоимость работ при анализе небольшого количества ДНК-фрагментов – сохраняют актуальность этого типа определения последовательности нуклеиновых кислот.

За последние полтора десятилетия были разработаны, коммерциализированы и продолжают успешно развиваться совершенно новые технологии определения последовательности нуклеиновых кислот, в основе которых лежит стремление к миниатюризации, автоматизации, увеличению объема получаемых данных, а также удешевлению процесса. Появление NGS впервые позволило значительно ускорить и удешевить определение полной последовательности миллионов геномов организмов, начиная от бактерий и заканчивая человеком. Более того, появилась реальная возможность единовременно оценивать экспрессию (работу) тысяч генов в организмах, тканях и единичных клетках (секвенирование транскриптомов), а также анализировать регуляцию их активности (анализ экспрессии микроРНК и метилирования генома). В настоящее время на рынке представлено сразу несколько разработок, позволяющих определять последовательность полных геномов организмов, проводить анализ экспрессии генов и метилирования генома. Эти подходы реализуются на секвенаторах нового поколения производства коммерческих компаний Illumina, Thermo Fisher Scientific, Pacific Biosciences и Oxford Nanopore Technologies. Часть разработанных платформ уже ушли с рынка (например, GS FLX, 454/Roche или HeliScope/Helicos Bioscience). Другие, пройдя несколько реинкарнаций и модификаций, прочно закрепились на нем (Illumina и Thermo Fisher Scientific). Третьи только нащупывают почву, намереваясь занять свою нишу и найти своего потребителя (например, Oxford Nanopore Technologies).

Секвенирование следующего поколения произвело революцию в пищевой микробиологии за счет разработки новых высокопроизводительных технологий, таких как микробиологическое профилирование на основе 16S rRNA и секвенирование методом дробовика, которые были использованы для исследования состава микробиоты различных пищевых продуктов [58].

Метод дробовика. Метод прекращения цепочки секвенирования ДНК (или «секвенирование по Сэнгеру») может использоваться только для довольно коротких нитей от 100 до 1000 пар оснований. Более длинные последовательности фрагментируются на более мелкие фрагменты, которые могут быть секвенированы отдельно, а затем они повторно собираются для получения общей последовательности. Для этого используются два основных метода: праймер-опосредованная прогулка (или «прогулка по хромосоме»), при которой праймер продвигается вперед по всей цепочке «шаг за шагом», и метод дробовика, который является более

быстрым, но более сложным процессом, и использует случайные фрагменты [65].

Метод дробовика заключается в том, что ДНК разбивается случайным образом на многочисленные мелкие фрагменты, которые секвенируются с использованием метода обрыва цепи. Исходную последовательность восстанавливают при помощи компьютерного анализа перекрывающихся ридов [66].

Технология секвенирования методом дробовика была использована группой американских ученых в качестве инструмента для обнаружения патогенных бактерий в образцах, взятых с разных этапов обработки производства говядины [87].

Метод с использованием FPP. Он был разработан итальянскими учеными на базе лаборатории пробиогеномики Пармского университета. Они разработали новый метод обнаружения возбудителей болезней пищевого происхождения, основанный на параллельном секвенировании множественных ампликонов, подход, который разительно отличается от метода микробиологического профилирования на основе 16S rRNA, поскольку последний опирается на секвенирование одного гена. Этот новый подход к обнаружению возбудителей болезней пищевого происхождения основан на комплекте праймеров под названием «панель пищевых патогенов» (FPP), которая генерирует специфические ампликоны, предназначенные для секвенирования на платформе Illumina. Подход FPP предназначен для отслеживания возбудителей болезней пищевого происхождения в естественно загрязненных пищевых образцах [88].

Метод ddPCR. Метод ddPCR представляет собой биотехнологическое усовершенствование обычных методов полимеразной цепной реакции, которые могут быть использованы для непосредственного количественного определения и клонирования амплификации нитей нуклеиновых кислот, включая ДНК, кДНК или РНК [90]. Ключевое различие между ddPCR и традиционной PCR заключается в способе измерения количества нуклеиновых кислот. Первый из них является более точным методом, хотя также более подвержен ошибкам в руках неопытных пользователей. PCR выполняет одну реакцию на один образец. ddPCR также выполняет одну реакцию в пробе, однако, образец разделяют на большое количество частей и реакцию проводят в каждой части индивидуально. Это разделение позволяет получить более достоверный результат и более чувствительное измерение количества нуклеиновой кислоты [69].

На данный момент этот метод был применен для анализа генетически модифицированных организмов в кормах для животных, обнаружения и количественного определения патогенных бактерий, таких как *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* и *Listeria monocytogenes* в окружающей среде [71], мониторинга динамики микробных популяций в почвах с различным уровнем популяций [72].

3.2. Использование высокопроизводительного анализа ДНК для контроля качества молочной и масложировой продукции. Загрязнение молочных продуктов при транспортировке, обработке или хранении патогенными для человека микроорганизмами, такими как *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Salmonella enterica*, часто приводит к тяжелым болезням пищевого происхождения [78]. Молочные продукты характеризуются малым сроком годности, поскольку они являются прекрасной средой для выращивания широкого спектра микроорганизмов [79]. Стафилококковое пищевое отравление является одним из самых распространённых во всем мире, а молочные и молочнокислые продукты обычно связаны со вспышками этого заболевания. Один нанограмм стафилококкового энтеротоксина на грамм загрязненной пищи может вызывать симптомы пищевого отравления. Обнаружение контаминации пищевых продуктов болезнетворными микроорганизмами на стадиях производства имеет важное социальное значение. Так в Эфиопии, регионе Тиграй, в котором наблюдается высокое распространение энтеротоксигенного *S. aureus*, в 2016 году было проведено исследование распределения генов стафилококковых энтеротоксинов. При помощи секвенирования гена стафилококкового белка A (spa) в сыром коровьем молоке и молочных продуктах из 549 образцов молочной продукции 160 (29,1 %) были положительными для *S. aureus* [80].

Исследователи из Пакистана, где загрязнение продуктов питания различными микроорганизмами является повсеместной и серьезной проблемой, провели работу, направленную на то, чтобы изолировать и охарактеризовать загрязняющие бактерии из местного переработанного масла, основного продукта молочной промышленности в стране. Им удалось выделить и определить штамм *Enterococcusfaecium* из коммерческого образца сливочного масла. Штамм был идентифицирован путем секвенирования последовательностей 16S и 23S рРНК генов [81].

Помимо загрязнения пищевых продуктов патогенными микроорганизмами, актуальна проблема роста микроорганизмов, вызывающих нежелательные реакции, которые ухудшают вкус, запах, цвет и сенсорные и текстурные свойства продуктов [82]. В связи с глобализацией торговли продуктами питания важной задачей производителей становится продление срока хранения продуктов. Споры и термофильные бактерии способны вызывать порчу продуктов питания и создают проблемы, связанные с безопасностью продукта [83]. Знание состава микробиома пищи имеет большое значение для определения безопасности и качества пищевого продукта. Секвенирование нового поколения (NGS) представляет собой интересный подход к пищевой микробиологии, позволяющий определять микробное сообщество непосредственно в образцах пищи [64]. Конкурентная борьба между производителями привела к устойчивым

техническим улучшениям и снижению затрат почти на всех платформах NGS. Это позволило широко использовать эти технологии и обеспечить более полное описание микробного сообщества, его взаимодействие и эволюцию [84]. Итальянские ученые при помощи NGS на базе Illumina, определили состав микробного сообщества сыра Ricotta и продемонстрировали наличие большой популяции спорообразующих бактерий, которая является основной причиной порчи продуктов до истечения предполагаемого срока годности. Штамм, принадлежащий группе *Bacillus cereus*, был идентифицирован в образцах сыра и являлся причиной быстрой порчи продукции. Также обнаружили, что споры *Bacillus cereus* были занесены из сырья, такого как сыворотка, и в сыре Ricotta нашли идеальные условия для прорастания и роста. Тепловая обработка при производстве и пастеризации могла поспособствовать активизации прорастания [85].

NGS обеспечивает представление о составе микробных популяций и показывает, что улучшение и применение таких методов в пищевой микробиологии может быть отличным способом для детального анализа микробиологического качества пищи. Идентификация критических этапов производственного процесса может иметь большое значение для контроля микробной нагрузки и предлагать решения для безопасного производства продуктов питания [85].

4. Анализ нормативной и методической литературы. Технические регламенты Таможенного союза разработаны с целью установления единых обязательных для применения и исполнения требований для масложировой и молочной продукции на единой таможенной территории Таможенного союза (Республика Беларусь, Республика Казахстан, Российская Федерация) и для обеспечения свободного перемещения выпускаемой продукции на данной территории Таможенного союза.

Основная цель – организация требований безопасности к качеству сырья, упаковки и выпускаемой продукции. Основные нормативно-методические литературные источники, касающиеся санитарно-микробиологических исследований пищевых субстратов это: ГОСТы, нормирующие микробиологические показатели молочной и масложировой продукции и методическая литература по определению микроорганизмов в продуктах питания.

В техническом регламенте прописаны единые нормы, в частности микробиологические показатели. Имеется 3 основных технических регламента применимых к безопасности молочных и масложировых продуктов:

– ТР ТС 033/2013 «О безопасности молока и молочной продукции»;

– ТР ТС 024/2011 «Технический регламент на масложировую продукцию»;

– ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции».

Гигиенические нормативы по микробиологическим показателям безопасности включают в себя следующие группы микроорганизмов:

1. санитарно-показательные, к которым относятся количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ), бактерии группы кишечных палочек – БГКП (колиформы), бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, энтерококки;
2. условно-патогенные микроорганизмы, к которым относятся *E. coli, Staphylococcus aureus*, бактерии рода *Proteus, B. cereus* и сульфитредуцирующие клостридии, *Vibrio parahaemolyticus*;
3. патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы и *Listeria monocytogenes*, бактерии рода *Yersinia*; микроорганизмы порчи, к которым относятся дрожжи, плесневые грибы, молочнокислые микроорганизмы;
4. микроорганизмы заквасочной микрофлоры и пробиотические микроорганизмы (молочнокислые микроорганизмы, пропионовокислые микроорганизмы, дрожжи, бифидобактерии, ацидофильные бактерии и другие) в продуктах с нормируемым уровнем биотехнологической микрофлоры и в пробиотических продуктах.

Нормирование микробиологических показателей безопасности пищевых продуктов осуществляется для большинства групп микроорганизмов по альтернативному принципу – нормируется масса продукта, в котором не допускаются бактерии группы кишечных палочек, большинство условно-патогенных микроорганизмов, а также патогенные микроорганизмы, в том числе сальмонеллы и *Listeria monocytogenes*. В других случаях норматив отражает количество колониеобразующих единиц в 1 см (г) продукта (КОЕ/см (г)).

ГОСТы, нормирующие микробиологические показатели молочной и масложировой продукции:

– ГОСТ 31450-2013 «Молоко питьевое. Технические условия».

Настоящий стандарт распространяется на упакованное в потребительскую тару после термической обработки или термообработанное в потребительской таре питьевое молоко, изготавливаемое из коровьего сырого молока и/или молочных продуктов, и предназначенное для непосредственного использования в пищу. Контроль микроорганизмов осуществляется: для КМАФАнМ, БГКП (колиформы) – по ГОСТ 9225 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для *S. aureus* – по ГОСТ 30347 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для патогенных микроорганизмов – по ГОСТ 30519 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для листерий *L. monocytogenes* – по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.

– ГОСТ 31981-2013 «Йогурты. Общие технические условия».

В данном стандарте даются определения: «йогурт», «биойогурт» и «обогащенный йогурт», а также нормируются микробиологические патаметры йогуртов. Определение микробиологических показателей осуществляется: для бактерий группы кишечных палочек – по ГОСТ 9225 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для дрожжей и плесеней – по ГОСТ 10444.12 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для *Staphylococcus aureus* – по ГОСТ 30347 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для бактерий рода *Salmonella* – по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для молочнокислых микроорганизмов – по ГОСТ 10444.11 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для бифидобактерий – по нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.

– ГОСТ 31452-2012 «Сметана. Технические условия».

Настоящий стандарт распространяется на упакованную в потребительскую тару сметану, изготовляемую из сливок коровьего молока с добавлением молочных продуктов или без их добавления, и предназначенную для непосредственного использования в пищу. Определение микробиологических показателей осуществляется: для бактерий группы кишечных палочек – по ГОСТ 9225 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для дрожжей и плесеней – по ГОСТ 10444.12 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для *Staphylococcus aureus* – по ГОСТ 30347 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для бактерий рода *Salmonella* – по ГОСТ 30519 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт; для молочнокислых микроорганизмов – по ГОСТ 10444.11 и нормативным документам, действующим на территории государств, принявших стандарт.

– ГОСТ 31453-2013 «Творог. Технические условия».

В настоящем стандарте применен следующий термин с соответствующим определением: творог – кисломолочный продукт, произведенный с использованием заквасочных микроорганизмов – лактококков или смеси лактококков и термофильных молочнокислых стрептококков и методами кислотной или кислотно-сычужной коагуляции белков с последующим удалением сыворотки путем самопрессования и/или прессования. Определение микробиологических показателей регламентируется теми же нормативными документами, что и ГОСТ 31452-2012 и ГОСТ 31981-2013 (см. выше).

– ГОСТ Р 52686-2006 «Сыры. Общие технические условия».

Настоящий стандарт распространяется на сыры и сырные продукты, предназначенные для непосредственного употребления в пищу или дальнейшей переработки. Определение микробиологических показателей осуществляется: для бактерий группы кишечных палочек – по ГОСТ 9225; для *Staphylococcus aureus* – по ГОСТ 30347; для патогенных микроорганизмов – по ГОСТ 30519; для *Listeriamonocytogenes* – по ГОСТ Р 51921 и МУК 4.2.1122-2002.

– ГОСТ Р 53512-2009 «Продукты сырные. Общие технические условия».

Настоящий стандарт распространяется на сырные продукты, предназначенные для непосредственного употребления в пищу или дальнейшей переработки. Определение микробиологических показателей осуществляется по тем же нормативным документам, что и в ГОСТ Р 52686-2006.

– ГОСТ 32261-2013 «Масло сливочное. Технические условия».

Настоящий стандарт распространяется на сливочное масло, изготовляемое из коровьего молока и/или молочных продуктов и побочных продуктов переработки молока, предназначенное для непосредственного употребления в пищу, кулинарных целей и использования в других отраслях пищевой промышленности. Определение микробиологических показателей осуществляется: для мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов и бактерий группы кишечных палочек – по ГОСТ 9225; для *Staphylococcus aureus* – по ГОСТ 30347; для патогенных микроорганизмов – по ГОСТ 30519; для плесневых грибов и дрожжей – по ГОСТ 10444.12; для *Listeria monocytogenes* – по нормативным документам, действующим на территории государства, принявшего стандарт.

– ГОСТ 31761-2012 «Майонезы и соусы майонезные. Общие технические условия (с Поправкой)».

Настоящий стандарт распространяется на майонезы и майонезные соусы, представляющие собой эмульсионные продукты, изготовленные из пищевых растительных масел и воды, с добавлением эмульгирующих и вкусовых ингредиентов, подкислителей и других пищевых добавок. Определение микробиологических показателей осуществляется: для дрожжей и плесневых грибов – по ГОСТ 10444.12; для бактерий группы кишечной палочки – по ГОСТ 9225, ГОСТ 31747; для патогенных микроорганизмов – по ГОСТ 31659.

– ГОСТ 1129-2013 «Масло подсолнечное. Технические условия (с Поправкой)».

Настоящий стандарт распространяется на подсолнечное масло, предназначаемое для непосредственного употребления в пищу, производства пищевых продуктов, в том числе для детского питания и промышленной переработки.

Определение микробиологических показателей осуществляется по нормативному документу, действующему на территории государства, принявшего стандарт.

ГОСТы по применению молекулярно-генетических методов при анализе пищевой продукции:

– ГОСТ 20837-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Требования к подготовке образцов для качественного обнаружения».

В настоящем стандарте приводятся критерии и примеры подготовки образцов для получения ПЦР-совместимых образцов или нуклеиновых кислот, качество и количество которых достаточны для использования в ПЦР. В стандарте описаны общие принципы процесса подготовки образцов. Настоящий стандарт распространяется на пищевые продукты, а также в случае необходимости при некоторой адаптации применим к кормам и к пробам окружающей среды.

– ГОСТ 22118-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) для обнаружения и количественного учета патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Технические характеристики».

Настоящий стандарт устанавливает минимальные требования к характеристикам для обнаружения последовательностей нуклеиновых кислот (ДНК или РНК) молекулярными методами. Настоящий стандарт распространяется на обнаружение патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах и, полученных из них, изолятах с помощью методов молекулярного обнаружения, основанных на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Настоящий стандарт применим также для обнаружения патогенных микроорганизмов в пробах из окружающей среды и кормов для животных.

– ГОСТ 22119-2013 «Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в режиме реального времени для определения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах. Общие требования и определения».

Настоящий стандарт определяет условия для обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах и, полученных из них, изолятов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Настоящий стандарт также определяет требования к амплификации и обнаружению последовательности нуклеиновых кислот (ДНК или РНК после обратной транскрипции) при проведении ПЦР в реальном времени. Минимальные требования, изложенные в настоящем стандарте, являются основой для сопоставления и воспроизведения результатов в отдельных лабораториях и между различными лабораториями. Настоящий стандарт также применим, например, для обнаружения пищевых патогенных микроорганизмов в пробах окружающей среды и кормов для животных.

– ГОСТ 52833-2007 «Микробиология пищевой продукции и кормов для животных. Метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) для определения патогенных микроорганизмов. Общие требования и определения».

Настоящий стандарт устанавливает общие требования и определения для амплификации последовательностей нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) *in vitro*. Стандарт может быть применен для испытаний пищевых продуктов, кормов для животных и, полученных из, них изолятов на наличие патогенных микроорганизмов с использованием полимеразной цепной реакции. Минимальные требования, установленные в настоящем стандарте, предназначены для обеспечения сопоставимости и воспроизводимости результатов, полученных в разных лабораториях.

– ГОСТ Р 56919-2016 «Организация испытаний ПЦР-наборов, используемых для идентификации целевых таксонов микрофлоры, растений и генетически модифицированных организмов. Требования к качеству, безопасности, транспортированию и хранению».

Настоящий стандарт распространяется на ПЦР-наборы, предназначенные для идентификации и используемые при амплификации нуклеиновых кислот методом ПЦР, организацию их испытаний и тестирования, и устанавливает требования к организации испытаний и тестирования ПЦР-наборов, предназначенных для идентификации микрофлоры, растений ГМО, контроля качества методов амплификации нуклеиновых кислот, использующих ПЦР.

Методическая литература по определению микроорганизмов в продуктах питания:

– МУК 4.2.1122-2002 «Организация контроля и методы выявления бактерий *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах».

В данных методических указаниях описывается метод, а также необходимое оборудование и реактивы для идентификации бактерии *Listeria monocytogenes* в продуктах питания.

– МР 2.3.2.2327-08 «Методические рекомендации по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности (с атласом значимых микроорганизмов)».

В данном пособии описываются методы и подходы по организации производственного микробиологического контроля на предприятиях молочной промышленности, а также необходмое оборудование и расходные материалы для проведения микробиологического контроля.

– МУК 4.2.3261-15 «Определение количества микроорганизмов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды методом наиболее вероятного числа с применением автоматического экспресс-анализатора».

Данные методические указания устанавливают порядок количественного учета микроорганизмов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды методом наиболее вероятного числа с применением автоматического экспресс-анализатора.

– МУК 4.2.3262-15 «Обнаружение патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды методом фермент-связанного флуоресцентного анализа с применением автоматического анализатора».

Данные методические указания устанавливают порядок обнаружения патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах и объектах окружающей среды методом фермент-связанного флуоресцентного анализа с применением автоматического анализатора.

– МУК 4.2.2872-11 «Методы выявления и идентификации патогенных бактерий-возбудителей инфекционных заболеваний с пищевым путём передачи в продуктах питания на основе ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией».

В данных методических указаниях описываются методы и подходы, необходимое оборудование и расходные материалы для идентификации патогенных микроорганизмов в продуктах питания с помощью ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

– МУК 4.2.2321-08 «Методы определения бактерий рода *Campylobacter*в пищевых продуктах».

В данных методических указаниях описывается метод, а также необходимое оборудование и реактивы для идентификации бактерий рода *Campylobacter* в продуктах питания.

5. *Анализ технических решений, раскрытых в источниках патентной литературы*. Существует большое количество классических и инструментальных методов оценки содержания и активности микроорганизмов [119]. Однако почти все из них предназначены для анализа клеток в жидких средах. Только немногие методы позволяют характеризовать численность и состояние микроорганизмов на поверхности материалов. В этих условиях одним из традиционно используемых подходов для оценки микробной загрязненности объектов является взятие смывов микроорганизмов с поверхностей с последующим их анализом прямыми и косвенными методами. Прямые способы анализа дают абсолютное значение содержания микроорганизмов.

Среди прямых методов анализа в лабораторной практике широко применяются способы посева и культивирования микроорганизмов на поверхности агаризованных питательных сред. Данные методы просты, высокочувствительны, не требуют измерительного оборудования, поэтому используются на производстве и в арбитражных случаях. Основные недостатки способов культивирования связаны с высокой длительностью и трудоемкостью, большим расходом питательных сред и экономической неэффективностью при большом количестве микробиологических испытаний. В настоящее время прослеживается тенденция их замены на инструментальные методы.

Косвенные методы микробиологического анализа характеризуют содержание и активность микроорганизмов. Они быстры, точны, имеют низкие трудозатраты и экономически эффективны при увеличении количества измерений. Эти способы нуждаются в инструментальных средствах измерений и дают относительное значение показателей, что требует проведения процедуры калибровки средств измерений с помощью прямых методов микробиологического анализа.

Метод культивирования заключается в следующем: образец пищевого продукта размачивают или гомогенизируют, используя гомогенизатор или блендер, и приготавливают соответствующие разбавления, которые высевают на селективные или полуселективные среды для последующего выделения и идентификации колоний. Численность ассоциируемых с порчей молочнокислых бактерий обычно оценивают путем подсчета колоний.

В патенте RU2203317 (C2) – 20030427 описывается способ обнаружения *Bacillus anthracis* в молоке, включающий культивирование исследуемой пробы с последующим учетом выросших колоний. Исследуемую пробу предварительно смешивают со смесью полимиксина М-сульфата 250 мкг/мл и триметоприма 100–120 мкг/мл в равных пропорциях, подращивают в течение 4–6 ч при 37 °С, затем центрифугируют при 5–5,5 тыс. об/мин в течение 30–40 мин. Культивирование верхнего слоя подращенной пробы ведут на дифференциально-диагностической среде в течение 18–20 ч при 37 °С, а учет выросших колоний осуществляют в парах аммиака.

В патенте RU2264467 (C2) – 20051120 описывается способ обнаружения бактерий группы кишечных палочек. Изобретение относится к биотехнологии, в частности к методам санитарно-микробиологического контроля производства продуктов животного происхождения, и может быть использовано в молочной и мясоперерабатывающей отраслях промышленности. Способ заключается в том, что для обнаружения бактерий группы кишечных палочек в пробе по изменению цвета жидкой питательной среды для бактерий использует смесь среды КОДА или ХБ и католита с pH 7–9 и окислительно-восстановительным потенциалом – 370 мВ при соотношении объемов 1 : (0,5–1,0), а определение изменения цвета с зеленого на желтый ведут после выдерживания пробы в течение 5–8 ч при температуре 18–25 °С. Изобретение позволяет значительно сократить продолжительность обнаружения БГКП при одновременном снижении температуры при анализе.

В патенте RU2276190 (C2) – 20060510 описывается экспрессный способ определения микроскопических грибов, бактерий и дрожжей в анализируемой пробе, согласно которому пробу смешивают с реактивом, включающим в себя

0,1–0,8 % раствор люминола в щелочи с pH 9,0–13,0 в 100 см^3 которого добавляют 0,3–1,0 см^3 30 % перекиси водорода в кювете анализатора жидкостей хемилюминесцентного ЛИК, регистрируют параметры хемилюминесценции: максимальную ее интенсивность (A_m), время достижения максимума хемилюминесценции (t_m) и площадь по кривой хемилюминесценции (S), по совокупности значений которых устанавливают наличие в пробе микроскопических грибов, бактерий и дрожжей.

Данный способ может быть использован в медицине, формации, пищевой и легкой промышленности, в сельском хозяйстве, нефтедобывающей промышленности и при защите сырья, материалов и изделий из них от микроорганизмов.

В заявке на изобретение RU97108375(A) – 1999-04-27 описывается способ обнаружения и идентификации микроорганизмов преимущественно в пищевых продуктах путем культивирования клеток на селективных питательных средах с одновременным измерением электрической проводимости среды культивирования и регистрацией изменения электрической проводимости среды во времени. При достижении значения электрического сопротивления среды культивирования, соответствующего концентрации клеток $n \times 10^5 – n \times 10^6$ клеток/мл, осуществляют отбор пробы субстрата, которую гидролизуют и метилируют до образования эфиров жирных кислот с последующим анализом полученных эфиров жирных кислот методом газовой хроматографии.

Культивированию на селективных средах подвергают несколько образцов контролируемых материалов в отдельных сосудах. Отбор проб субстрата для последующего газохроматографического анализа производят только из тех сосудов, для которых регистрируемое изменение электрической проводимости среды культивирования имеет вид логарифмической кривой роста.

Известен способ обнаружения присутствия термостойких микроорганизмов в пищевом продукте, включающий следующие стадии (RU2608653 (C2) – 20170123; AU2011373434 (B2) – 20160526; BR112014001246 (A2) – 20170613; DK2737076 (T3) – 20160613; EP2737076 (B1) – 20160302; NZ620009 (A) – 20160129; US2014147882 (A1) – 20140529; WO2013010574 (A1) – 20130124):

– помещения аликвоты продукта в сосуд, образующий удерживающую камеру и содержащий оптический зонд чувствительный к метаболиту термостойких микроорганизмов, где метаболитом термостойких микроорганизмов является кислород и где оптический зонд является чувствительным к кислороду фотолюминесцентным красителем;

– пастеризации аликвоты в сосуде;

– инкубирования пастеризованной аликвоты в сосуде в течение периода инкубации;

– периодического обращения к зонду во время периода инкубации, отличающийся тем, что в ходе таких обращений измеряют изменения концентрации метаболита термостойких микроорганизмов в аликвоте в зонде. Эти изменения концентрации указывают на присутствие жизнеспособных термостойких микроорганизмов в аликвоте.

Возможно, что дополнительно проводят преобразование измеренных произошедших в зонде изменений в концентрацию термостойких микроорганизмов в пастеризованной аликвоте перед инкубированием с помощью алгоритма преобразования и регистрируют выявленную концентрацию термостойких микроорганизмов.

Также возможно, что герметично закрывают аликвоту в удерживающей камере сосуда перед пастеризацией. Изобретением уточняется, что пищевым продуктом может являться молоко, а в качестве сосуда использоваться пробирка, кювета или многолуночный планшет.

В заявке на изобретение RU2012109856 (A) – 20131027 описывается способ выделения и идентификации штаммов бактерий *Pseudomonas aeruginosa* из объектов внешней среды пищевого сырья и пищевых продуктов, включающий селективные среды и специфичные тесты бактериологической дифференциации. Процесс идентификации включает схему бактериологического выделения и использование специфичного бактериофага, что позволяет выделять и идентифицировать, в том числе штаммы, лишенные пигментов.

В заявке на изобретение RU2012139912 (A) – 20140327 описывается способ количественного определения хитина методом иммуноферментного анализа в качестве общего маркера контаминации или поражения плесневыми грибами продуктов питания, почвы, строительных конструкций и биологических материалов (кровь или растения), заключающийся в обработке экстрагированного субстрата ферментом хитиназой с последующим взаимодействием со специфичными антителами к хитину, отличающийся тем, что применен новый принцип определения плесневых грибов, позволяющий идентифицировать с высокой точностью присутствие плесневых грибов в образце вне зависимости от видовых отличий микромицетов, а также от фазы их роста и морфологических особенностей.

ДНК-методы идентификации включают секвенирование последовательностей 165 или 235 рДНК, ПЦР-анализы с применением родо- или видоспецифических праймеров, а также методы ДНК-фингерпринтинга, основанные на структурах ПЦР-амплифицированных фрагментов ДНК или на рестрикционных анализах всей ДНК или ампликонов, полученных с помощью селективной ПЦР (полиморфизм длины фрагментов рестрикции, RFLP).

В патенте RU2375459 (C1) – 20091210 описывается способ индикации бактерий рода *Lactobacillus*. Способ основан на проведении ПЦР ДНК бактерий рода *Lactobacillus*. Для проведения

ПЦР используют оригинальные родовые праймеры, соответствующие консервативным участкам генома лактобактерий и амплифицирующие фрагмент генома, который в дальнейшем может быть использован для видовой идентификации бактерий рода *Lactobacillus*. Изобретение позволяет повысить специфичность способа индикации бактерий рода *Lactobacillus* на основе ПЦР фрагмента генетической детерминанты 16 S рРНК.

Изобретение может быть применено в научных исследованиях для получения новых знаний о биологических свойствах бактерий рода *Lactobacillus*, для изучения природных биотопов обитания и характера распространения этих бактерий и представляет практический интерес для использования в системе контроля качества продуктов питания, обогащенных лактобациллами, как на предприятиях-изготовителях, так и в учреждениях Роспотребнадзора.

В патенте RU2395583 (C2) – 20100727 описывается способ детекции живых клеток микроорганизма путем дифференцирования живых клеток от мертвых клеток или поврежденных клеток в тестируемом образце. В одном варианте исполнения изобретения способ включает следующие стадии:

– обработку тестируемого образца ядом топоизомеразы или ядом ДНК-гиразы;
– экстракцию ДНК из тестируемого образца и амплификацию мишеневого участка экстрагированной ДНК методом ПЦР, где длина мишеневого участка составляет от 900 до 3000 нуклеотидов;
– анализ продукта амплификации.

При этом возможно, что продукт амплификации анализируют с помощью стандартной кривой, отражающей зависимость количества продукта амплификации от количества микроорганизма, которую получают с использованием стандартных образцов микроорганизма и ПЦР проводят в режиме реального времени одновременно с анализом продукта амплификации.

В другом варианте изобретения длина мишеневого участка составляет от 100 до 3000 нуклеотидов.

В качестве тестируемого образца используют молоко, молочный продукт, пищевой продукт, полученный с использованием молока или молочного продукта в качестве сырья, образец крови, образец мочи, образец спинномозговой жидкости, образец синовиальной жидкости и образец плевральной жидкости, а микроорганизм представляет собой бактерию. Мишеневый участок может представлять собой ген рРНК 23S. ПЦР проводят с использованием набора праймеров, содержащего праймеры SEQ ID NO: 1 и 2, или набора праймеров, содержащего праймеры SEQ ID NO: 3 и 4.

Изобретение (RU2410440 (C1) – 20110127; AU2008287928 (B2) – 20110728; CA2666448 (C) – 20130910; CN101617057 (B) – 20131030; EP2077334 (B1) – 20151014; JP4378537 (B2) – 20091209; JPWO2009022558 (A1) – 20101111; KR101120270 (B1) – 20120306; NZ576113 (A) – 20120525; US8221975 (B2) – 20120717; US2012277121 (A1) – 20121101; WO2009022558 (A1) – 20090219) раскрывает способ детектирования живой клетки микроорганизма в тест-пробе, предусматривающий стадии:

– добавления сшивающего агента, способного сшивать ДНК при облучении светом, имеющим длину волны 350–700 нм к этой тест-пробе;
– облучения тест-пробы, к которой добавлен сшивающий агент, светом, имеющим длину волны 350–700 нм;
– удаления сшивающего агента, содержащегося в тест-пробе, облученной светом;
– добавления среды к тест-пробе, из которой удален сшивающий агент, и инкубации этой тест-пробы;
– добавления опять сшивающего агента, способного сшивать ДНК при облучении светом, имеющим длину волны 350–700 нм, к инкубированной тест-пробе;
– облучения тест-пробы, к которой добавлен сшивающий агент, светом, имеющим длину волны 350–700 нм;
– экстракции ДНК из этой тест-пробы и амплификации района-мишени экстрагированной ДНК при помощи способа амплификации нуклеиновых кислот;
– анализа амплифицированного продукта.

Предпочтительно анализировать амплифицированный продукт на основе калибровочной кривой, которая получена с использованием стандартной пробы этого микроорганизма и показывает зависимость между количеством этого микроорганизма и амплифицированного продукта.

Также предпочтительно использовать способ ПЦР, LAMP, SDA, LCR или способ микроматрицы ДНК в качестве способа амплификации нуклеиновых кислот. ПЦР выполняют с использованием ПЦР реального времени и выполняют одновременно ПЦР и анализ амплифицированного продукта.

Тест-пробой является пищевой продукт, проба крови, проба мочи, проба спинальной жидкости, проба синовиальной жидкости, проба плеврального выпота, промышленная вода, водопроводная вода, грунтовая вода, речная вода или дождевая вода.

Микроорганизм представляет собой патогенную бактерию, а районом-мишенью является патогенный ген.

В охранных документах (RU2435865 (C2) – 20111210; CA2639069 (A1) – 20070726; CN101405411 (A) – 20090408; EP1984520 (B1) – 20131211; GB0601302 (D0) – 20060301; GB0701298 (D0) – 20070228; GB2434644 (A) – 20070801; JP5650887 (B2) – 20150107; SG169342 (A1) – 20110330; UA100495 (C2) – 20130110; US2009306230 (A1) – 20091210; US2016108467 (A1) – 20160421; WO2007083147 (A3) – 20071221) описывается способ обнаружения наличия микроорганизмов в

биологическом образце. Согласно изобретению способ предусматривает использование диагностической мультиплексной панели (DMP), созданной для одновременной идентификации совокупности возможных микроорганизмов, которые могут присутствовать в биологическом образце, с применением реакции удлинения праймеров в отношении высококонсервативных нуклеотидных последовательностей в тестируемых микроорганизмах. Биологический образец иммобилизуют на твердом субстрате в первом местоположении, затем переносят в другое местоположение и осуществляют стадию экстракции на твердом субстрате таким образом, чтобы экстрагировалась ДНК любого микроорганизма, присутствующего в пробе. Затем проводят амплификацию нуклеиновой кислоты на экстрагированных ДНК микроорганизмов, затем смешивают целевые последовательности с праймерами с применением DMP. В результате определяют генотип любых присутствующих микроорганизмов и идентифицируют искомые микроорганизмы. Для осуществления способа используют диагностическую мультиплексную панель (DMP), пригодную для генотипирования патогенных микроорганизмов и набор для тестирования микроорганизмов. Использование изобретения позволяет произвести надежный отбор биологических образцов и их тестирование, обеспечивая при этом одновременное тестирование множества микроорганизмов.

В зависимости от назначения диагностической мультиплексной панели (DMP) биологический образец можно получать от человека, животного, из растения или пищевого продукта. В последнем случае предполагается, что DMP предназначена для определения загрязнения пищевого продукта патогенами, передающими заболевание алиментарным путем.

В патенте RU2460801 (C1) – 20120910 описывается способ выявления санитарно-показательных бактерий и стартовых культур в мясных продуктах. Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в микробиологии. Способ включает приготовление среды обогащения по прописи, контроль pH, стерилизацию, выявление санитарно-показательных бактерий и стартовых культур в мясных продуктах и их идентификацию. Для приготовления среды по прописи в 950 мл дистиллированной воды растворяют 10,00 г пептона, 5,00 г мясного экстракта, 5,00 г дрожжевого экстракта, 1,00 г твина-80, 3,00 г натрия фосфорнокислого, 0,10 г магния сернокислого, 0,01 г железа сернокислого. Среду стерилизуют при 1,1 атм. в течение 15 мин. Далее, в 50 мл дистиллированной воды растворяют 20,00 г глюкозы. Полученный 40 % раствор глюкозы стерилизуют при 0,5 атм. в течение 20 мин, затем в асептических условиях добавляют к среде и перемешивают. Для выделения санитарно-показательных бактерий и стартовых культур в стерильных условиях отбирают 25 г образца мясного продукта и помещают в колбу, содержащую 250 мл среды, затем инкубируют при 37 °C в течение 16 ч. Далее, бактерии отделяют от среды центрифугированием при 4000 об/мин, отмывают от остатков питательной среды физиологическим раствором и вновь центрифугируют при 4000 об/мин. Из полученных бактериальных клеток выделяют геномную ДНК и идентифицируют с помощью ПЦР-анализа с электрофоретической схемой детекции с использованием родо- и видоспецифических праймеров для каждого микроорганизма. Изобретение обеспечивает комплексное выделение как санитарно-показательных бактерий, так и стартовых культур.

В охранных документах (RU2526576 (C2) – 20140827 и WO2013100810 (A3) – 20131031) описывается способ идентификации лактобацилл. Представленный способ основан на комбинации и полиморфизме генов токсин-антитоксин суперсемейств RelBE и MazEF и характеризуется тем, что для идентификации проводят амплификацию геномных ДНК с использованием набора олигонуклеотидов определенной структуры, ПЦР-продукты анализируют в агарозном геле, а размер полученного фрагмента определяют с помощью ДНК-маркера. Исследуемый штамм относят к определенной группе, виду или штамму в случае наработки фрагментов при использовании определенных олигонуклеотидов. Представленное изобретение может быть использовано для идентификации штаммов лактобацилл в микробиоте человека, продуктах питания, а также для определения исследуемого штамма в клинических пробах или молекулярного отслеживания в коммерческих препаратах.

В охранных документах (RU2567011 (C2) – 20151027; BR112012024873 (A2) – 20161206; CA2794466 (A1) – 20111006; CN102939390 (B) – 20160518; EP2553120 (B1) – 20150422; ES2543172 (T3) – 20150817; JP2013523118 (A) – 20130617; KR20130062276 (A) – 20130612; PT105029 (B) – 20120911; US2013102000 (A1) – 20130425; WO2011121544 (A4) – 20111201) описывается зонд пептидно-нуклеиновой кислоты (PNA-зонд) для обнаружения *Salmonella*, содержащий последовательность SEQ ID № 1-5′-AGG AGC TTC GCT TGC-3. Утверждается, что такой PNA-зонд способен обнаруживать последовательность-мишень в рРНК, рДНК или последовательности, комплементарные рРНК *Salmonella*. Он связывается с одной из обнаруживаемых фракций, выбранной из одной из следующих групп: конъюгата, системы обнаружения разветвленной фракции, хромофора, флуорофора, радиоизотопа, фермента, гаптена или люминесцентного компонента. Флуорофорная группа может представляет собой, по меньшей мере, одну из следующих: флуорофоры серии Alexa, серии Alexa Fluor, цианины, 5-(и -6)

карбокси-2′,7′-дихлорфлуоресцеин, 5-ROX (5-карбокси-X-родамина триэтиламмониевую соль).

Также в изобретении описывается набор для обнаружения *Salmonella*, который содержит PNA-зонд и, по меньшей мере, один из следующих растворов: один раствор для фиксации, один раствор для гибридизации и один раствор для промывки. Способ обнаружения *Salmonella* содержит следующие стадии:

– контактирования PNA-зонда с биологическими пробами;

– гибридизации PNA-зонда с последовательностью-мишенью микроорганизмов, присутствующих в указанных пробах;

– обнаружения гибридизации в виде показания указанного обнаружения и количественного анализа указанных проб.

При этом биологическую пробу получают из крови, воздуха, пищевого продукта, воды или биопсий.

В патенте RU2569196 (C1) – 20151120 предложен способ определения наличия в биологических жидкостях, окружающей среде и продуктах питания бактерий *Escherichia coli* штамма O157:H7, включающий дезинтеграцию бактерий ферментативной обработкой и лизис неионным детергентом, адсорбцию на парамагнитных частицах при помощи специфического моноклонального антитела, детекцию антигена бактерий *E. coli* O157:H7 при помощи специфического биотинилированного моноклонального антитела, связывание полученного комплекса с нековалентным коньюгатом ДНК-матрицы с нейтравидином, диссоциацию твердофазного комплекса «антитело-антиген *E. coli* O157:H7 − биотинилированное антитело-коньюгат» добавлением раствора глицин HCl pH 2.6, ПЦР-амплификацию ДНК-матрицы и выявление наличия бактерий *E. coli* O157:H7 по скорости нарастания флуоресцентного сигнала. Данный способ отличается высокой специфичностью и чувствительностью детекции и может быть использован в ранней диагностике геморрагического колита и санитарно-гигиеническом контроле над наличием его возбудителя.

Известен способ детекции живых клеток микроорганизма в тестируемом образце (RU2527897 (C2) – 20140910; AU2010275576 (B2) – 20130228; CA2768699 (C) – 20170822; CN102471768 (B) – 20140723; CN103820578 (B) – 20150617; EP2458002 (B1) – 20150325; JP4825313 (B2) – 20111130; JPWO2011010740 (A1) – 20130107; KR101383389 (B1) – 20140408; MX2012001000 (A) – 20120316; NZ597138 (A) – 20121221; SG177738 (A1) – 20120228; US9394572 (B2) – 20160719; US2016298181 (A1) – 20161013; WO2011010740 (A1) – 20110127) путем отличия живых клеток от мертвых клеток или поврежденных клеток, который включает стадии:

– добавления в тестируемый образец средства, способного к ковалентному связыванию с ДНК или РНК при облучении светом с длиной волны 350–700 нм;

– облучения тестируемого образца, в который добавляют средство, светом с длиной волны 350–700 нм;

– амплификации мишеневой области ДНК или РНК микроорганизма, содержащегося в тестируемом образце, способом амплификации нуклеиновых кислот в присутствии средства подавления действия вещества, ингибирующего амплификацию нуклеиновых кислот, соли магния и соли органической кислоты или соли фосфорной кислоты, без выделения нуклеиновых кислот из клеток;

– анализа продукта амплификации.

Амплификацию мишеневой области проводят в клетках микроорганизма.

Тестируемый образец – продукты питания, биологические образцы, питьевая вода, промышленные воды, вода из окружающей среды, сточные воды, почва, мазки и т.д.

В предпочтительные примеры продуктов питания включают: напитки, такие как безалкогольные напитки, газированные безалкогольные напитки, жидкие пищевые добавки, напитки на основе фруктовых соков и молочнокислые напитки (включая концентраты и порошки этих напитков); мороженные кондитерские изделия, такие как мороженое, фруктовое мороженое и ледяная стружка; молочные продукты, такие как переработанное молоко, молочные напитки, молочнокислые продукты и масло; энтеральное питание, жидкая пища, молоко для младенцев, спортивные напитки; функциональное питание, такое как питание для применения при определенном состоянии здоровья, пищевые добавки и т.д.

В заявке на изобретение RU97119187 – 1999-10-27 описывается олигонуклеотидный праймер, способ идентификации вида организма, геномный полинуклеотидный локус, набор для выделения ДНК-мишени. Согласно изобретению выделенный олигонуклеотидный праймер для идентификации вида организма, гибридизующийся с полинуклеотидной молекулой-мишенью, имеет последовательность, выбранную из группы, состоящей из: 5›-GTTGTCGTACC(G/A) TCACCAGCAATTTC-3› (SEQ ID 1) и 5›-AA(G/A) GCGCCTGGTTT (C/T) GGTGAT (C/A) (G/A) (A/T/C/G) (C/A) (G/A)-3› (SEQ ID 2), и последовательностей, комплементарных им. Праймер может представлять собой 5›-GAIIIIGCIGGIGA(T/C)GGIACIACIAC-3› (SEQ ID 3) или 5›-(T/C) (T/G)1(T/C)(T/G)ITCICC(A/G) AAICCIGGIGC (T/C) TT-3› (SEQ ID 4). При этом организмом может являться микроорганизм, например, прокариотический – член рода, выбранный из группы, состоящей из *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Salmonella*, *Chlamidia, Helicobacter и Streptococcus*. Вид рода может быть выбран из группы, состоящей из

S. haemoliticus, S. epidermidis, S. lugdunensis, S. hominis, E. coli, B. subtilis и P. aeruginosa.

Способ идентификации вида организма предусматривает амплификацию района геномной нуклеиновой кислоты организма при помощи олигонуклеотидных праймеров, которые гибридизуются с фланкирующими мишенями 5› и 3› полинуклеотидными последовательностями геномной нуклеиновой кислоты. Полинуклеотидная последовательность-мишенями имеет в основном последовательность, выбранную из группы, состоящей из: 5›-GTTGTCGTACC(G/A) TCACCAGCAATTTC-3› (SEQ ID 1) и 5›-AA(G/A) GCGCCTGGTTT (C/T) GGTGAT (C/A) (G/A) (A/T/C/G) (C/A) (G/A)-3’ (SEQ ID 2) и последовательностей, комплементарных им, и детектирование амплифицированного района. Амплификация может представлять собой метод ПЦР.

Возможно, что геномный локус кодирует полипептид теплового шока.

Набор для выделения ДНК-мишени для идентификации вида организма содержит средства для амплификации ДНК-мишени. Эти средства содержат необходимый фермент (ферменты) и олигонуклеотидные праймеры для амплификации ДНК-мишени из организма или клетки организма.

В патенте на изобретение RU2350656 (C2) – 20090327 описывается способ определения зараженности продовольствия патогенными биологическими агентами при лабораторном контроле. Он включает подготовку проб и их исследование. Подготовку проб проводят в два приема. Во-первых, в зависимости от плотности, жиросодержания и текучести продукта его подвергают соответственно взвешиванию, выделяя 25 г (мл) продукта с последующим измельчением, переводу в жидкую фазу в объеме 50–100 мл посредством добавления физиологического раствора, а при исследовании воды последнюю в количестве 500 мл фильтруют через мембранные фильтры. Во-вторых, деление пробы на части по 2 мл пробы отделяют для исследования методом флюоресцирующих антител (МФА), в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), в реакции агломерации объемной (РАО), иммуноферментным анализом (ИФА), ПЦР и бактериологическим методом, а по 5 мл проб берут для исследования биологическим методом, заражая биопробных животных. Проведение приемов на 25 пробах осуществляют в течение 1,5–2 ч. При этом исследование проб экспрессными или ускоренными методами (МФА, РНГА, РАО, ИФА, ПЦР) проводят в течение 4–10 ч, а исследование биологическим методом – в течение 48–120 ч с использованием селективных питательных сред.

Для проведения ПЦР выделяют ДНК микроорганизмов из проб пищевых продуктов, применяя в зависимости от сложности их состава гуанидинтиоцианатный метод или фенольную экстракцию, а затем проводят постановку ПЦР, используя 1–5 мкл раствора содержащего ДНК пробы, с последующим учетом реакции, обеспечивающей чувствительность 2–10^3 м.к./мл пробы.

Известен способ выделения и очистки дезоксирибонуклеиновых кислот (RU2400537 (C2) – 20100927). Сущность способа заключается в том, что, в отличие от прототипа, очистку биологического раствора после лизиса образца в буфере на основе анионного детергента (например, додецил сульфата натрия – SDS) проводят суспензией предварительно отожженного в вакууме детонационного наноалмаза, являющегося гидрофильным сорбентом со слабым положительным зарядом и сильно развитой удельной поверхностью. В результате из раствора удаляются примеси, ингибирующие полимеразную цепную реакцию – пептиды, пигменты, танины, липиды. Последующее центрифугирование раствора позволяет разделить детонационный наноалмаз с адсорбированными примесями и супернатант, содержащий ДНК. Далее ДНК осаждают спиртом (изопропанолом или этанолом) и растворяют в дистиллированной воде. Изобретение относится к области молекулярной биологии, а именно к способу выделения и очистки ДНК из образцов тканей растений, а также продуктов переработки растительного и животного происхождения.

Известно изобретение (WO9600298 (A1) – 19960104), позволяющее осуществлять одновременное обнаружение, идентификацию и дифференциацию. Изобретение относится к способу обнаружения и идентификации одного микроорганизма или для одновременного обнаружения нескольких микроорганизмов в образце, включающий стадии:

– при необходимости высвобождения, выделения или концентрирования полинуклеиновых кислот, присутствующих в образец;

– при необходимости амплифицирование спейсерной области 16S-23S рРНК или ее части с одной подходящей парой праймеров;

– гибридизацию полинуклеиновых кислот на первой или второй стадии с одним и предпочтительно более чем одним из спейсерных зондов или их эквивалентами, в соответствующих условиях гибридизации и промывки, и/или с таксоноспецифическим зондом, полученным из любой из спейсерных последовательностей при тех же условиях гибридизации и промывки;

– обнаружение гибридов, образованных на третьей стадии, с каждым из зондов, используемых в соответствующих условиях гибридизации и промывки;

– идентификацию микроорганизмов, присутствующих в образце, из сигналов дифференциальной гибридизации, полученных на четвертой стадии.

«Образец» может представлять собой любой биологический материал, взятый либо непосредственно от инфицированного человека (или животного), либо после культивирования (обогащения), либо образец, взятый из пищи или корма.

Известен способ обнаружения патогенов в пищевых продуктах, объединяющий преимущества специфичности иммунологической детекции с высокой чувствительностью ПЦР (WO9820148 (A1) – 19980514 и US2001008887 (A1) – 20010719). Проведение детекции по данному способу включает в себя следующие этапы:

– обогащение образцов по исследуемому бактериальному патогену культивацией на богатой питательной среде;

– иммуномагнитную сепарацию патогенных бактерий с использованием парамагнитных частиц, покрытых специфическими антителами, распознающими, связывающими и захватывающими *E. coli* O157:H7 (Dynabeads anti-E.coli O157:H7, DynalAs, Oslo, Norway или аналогичные);

– амплификацию последовательностей ДНК, специфичных для данного патогена, с помощью ПЦР;

– детекцию продуктов амплификации с помощью электрофореза в агарозном геле. С применением данной технологии за период в 8 часов можно провести выявление единичных клеток патогена в пищевых образцах.

Преимуществом данного способа является двухэтапное обеспечение специфичности детекции (за счет селекции анализируемых бактерий с помощью высокоспецифичных антител к патогену и за счет использования при ПЦР-амплификации праймеров, специфичных к ДНК бактерии-патогена), а также повышение чувствительности определения патогена за счет ПЦР-амплификации, поскольку ПЦР позволяет детектировать даже единичные молекулы ДНК.

Однако на практике прямое применение ПЦР для детекции бактериальной ДНК, полученной из сложных биологических образцов, осложнено наличием примесей, ингибирующих реакцию, а процедура обогащения образцов наращиванием на питательной среде значительно (от 8 часов и более) увеличивает как время проведения детекции, так и вероятность контаминации культуры, полученной от исследуемого образца, что может привести к неточным и малодостоверным результатам. Данная процедура вкупе с примененным способом анализа продуктов амплификации в агарозном геле дает возможность лишь качественно охарактеризовать образцы по наличию патогена и полностью исключает возможность его количественного определения.

Изобретение (WO2006136640 (A1) – 20061228; ES2276597 (B1) – 20080616) относится к способу обнаружения и идентификации, особенно в молоке, следов разрушающих бактериофагов видов молочнокислых бактерий (LAB) (*Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*), которые используются в промышленных молочных ферментациях с использованием мульти-ПЦР. Многократную ПЦР-амплификацию проводят со специфическими олигонуклеотидами праймеров консервативных областей генома вышеупомянутых бактериофагов. Указанные вирусы являются основной причиной сбоев ферментации в молочной промышленности, что приводит к значительным потерям. Способ по изобретению может быть использован для принятия решений, таких как отнесение зараженного молока процессам, которые не связаны с использованием LAB, которые чувствительны к идентифицированным фагам или к процессам инактивации, а также к дезинфекции производственной установки. Основным преимуществом метода является скорость, с которой он может быть выполнен, а также специфичность, простота и чувствительность.

Выводы

В ходе проведенного обзора литературы показано, что наиболее многообещающим методом анализа присутствия прокариотических и эукариотических микроорганизмов, в том числе патогенных, является высокопроизводительное секвенирование. Классические методы анализа микробных сообществ часто трудоемки и длительны, а идентификация за пределами родового уровня часто затруднена. Метод ПЦР позволяет обнаружить одиночные молекулы нуклеиновых кислот микроорганизма за достаточно короткое время. Однако высокая чувствительность методов ПЦР может быть их слабым местом вследствие возможной контаминации образца и получения ложноположительного результата из-за ингибирования работы полимеразы различными веществами. Метод NGS обеспечивает представление о составе микробных популяций, а также является отличным способом для детального анализа микробиологического качества пищи.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Финансирование.

Работа поддержана Минобрнауки России (Соглашение № 14.577.21.0257, уникальный код соглашения RFMEFI57717X0257).

Список литературы

1. Fenchel, T. Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling / T. Fenchel, G. M. King, T. H. Blackburn. – Academic Press, 2012. – 303 p. DOI: https://doi.org/10.1016/C2010-0-67238-5.

2. GeoChip 4: A functional gene-array-based high-throughput environmental technology for microbial community analysis / Q. Tu, H. Yu, Z. He [et al.] // Molecular Ecology Resources. – 2014. – Vol. 14, № 5. – P. 914–928. DOI: https://doi.org/10.1111/1755-0998.12239.

3. Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill / O. U. Mason, T. C. Hazen, S. Borglin [et al.] // ISME Journal. – 2012. – Vol. 6, № 9. – P. 1715–1727. DOI: https://doi.org/10.1038/ismej.2012.59.

4. Optimization and clinical validation of a pathogen detection microarray / C. W. Wong, C. L. W. Heng, L. Wan Yee [et al.] // Genome Biology. – 2007. – Vol. 8, № 5. – P. R93. DOI: https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r93.

5. Norman, J. M. Kingdom-Agnostic Metagenomics and the Importance of Complete Characterization of Enteric Microbial Communities / J. M. Norman, S. A. Handley, H. W. Virgin // Gastroenterology. – 2014. – Vol. 146, № 6. – P. 1459–1469. DOI: https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.001.

6. Cox, M. J. Sequencing the human microbiome in health and disease / M. J. Cox, W. O. C. M. Cookson, M. F. Moffatt // Human Molecular Genetics. – 2013. – Vol. 22, № R1. – P. R88–R94. DOI: https://doi.org/10.1093/hmg/ddt398.

7. Beuchat, L. R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables / L. R. Beuchat // Microbes and Infection. – 2002. – Vol. 4, № 4. – P. 413–423. DOI: https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01555-1.

8. Methods for the detection, isolation and characterization of food-borne fungi / R. A. Samson, E. S. Hoekstra, F. Lund [et al.] // Introduction fo food – and airborne fungi / R. A. Samson, E. S. Hoekstra, J. C. Frisvad [et al.]. – Utrecht : Centraalbureau voor Schimmelcultures, 2000. – P. 283–297.

9. Houbraken, J. Diversity and biology of heat-resistant fungi / J. Houbraken, J. Dijksterhuis, R. A. Samson // Stress responses of Foodborne Microorganisms / H.-C. Wong. – Nova Press, 2012. – P. 331–353.

10. Sex in Cheese: Evidence for Sexuality in the Fungus *Penicillium roqueforti* / J. Ropars, J. Dupont, E. Fontanillas [et al.] // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 11. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049665.

11. Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae* / J. Schacherer, J. A. Shapiro, D. M. Ruderfer [et al.] // Nature. – 2009. – Vol. 458, № 7236. – P. 342–345. DOI: https://doi.org/10.1038/nature07670.

12. Апробация метода SSR-анализа для ДНК-паспортизации коммерческих штаммов винных дрожжей / И. И. Супрун, С. В. Токмаков, Н. М. Агеева // Политематической сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2017. – № 125. – С. 151–163. DOI: https://doi.org/10.21515/1990-4665-125-009.

13. Fay, J. C. Evidence for Domesticated and Wild Populations of *Saccharomyces cerevisiae* / J. C. Fay, J. A. Benavides // PLoS Genetics. – 2005. – Vol. 1, № 1. – P. 0066–0071. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010005.

14. Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene / M. Fidalgo, R. R. Barrales, J. I. Ibeas [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – Vol. 103, № 30. – P. 11228–11233. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0601713103.

15. Microsatellite marker-based assessment of the biodiversity of native bioethanol yeast strains / A. T. B. F. Antonangelo, D. P. Alonso, P. E. M. Ribolla [et al.] // Yeast. – 2013. – Vol. 30, № 8. – P. 307–317. DOI: https://doi.org/10.1002/yea.2964.

16. Genomic and transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* isolates with focus in succinic acid production / R. Franco-Duarte, D. Bessa, F. Gonçalves [et al.] // FEMS Yeast Research. – 2017. – Vol. 17, № 6. DOI: https://doi.org/10.1093/femsyr/fox057.

17. Development of simple sequence repeat (SSR) markers for discrimination among isolates of *Fusarium proliferatum* / I. Moncrief, C. Garzon, S. Marek [et al.] // Journal of Microbiological Methods. – 2016. – Vol. 126. – P. 12–17. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.03.013/.

18. Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains / J.-L. Legras, O. Ruh, D. Merdinoglu [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2005. – Vol. 102, № 1. – P. 73–83. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.007.

19. Knight, S. Quantifying separation and similarity in a *Saccharomyces cerevisiae* metapopulation / S. Knight, M. R. Goddard // ISME Journal. – 2015. – Vol. 9, № 2. – P. 361–370. DOI: https://doi.org/10.1038/ismej.2014.132.

20. Rapid and not culture-dependent assay based on multiplex PCR-SSR analysis for monitoring inoculated yeast strains in industrial wine fermentations / G. Cordero-Bueso, M. E. Rodríguez, C. Garrido [et al.] // Archives of Microbiology. – 2017. – Vol. 199, № 1. – P. 135–143. DOI: https://doi.org/10.1007/s00203-016-1287-4.

21. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharamyces*: A fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts / M. Teresa Fernández-Espinar, B. Esteve-Zarzoso, A. Querol [et al.] // Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology. – 2000. – Vol. 78, № 1. – P. 87–97. DOI: https://doi.org/10.1023/A:1002741800609.

22. Bokulich, N. A. Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations / N. A. Bokulich, D. A. Mills // BMB Reports. – 2012. – Vol. 45, № 7. – P. 377–389. DOI: https://doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.7.148.

23. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers / B. Esteve-Zarzoso, C. Belloch, F. Uruburu [et al.] // International Journal of Systematic Bacteriology. – 1999. – Vol. 49, № 1. – P. 329–337. DOI: https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329.

24. Sun, Y. Investigating of yeast species in wine fermentation using terminal restriction fragment length polymorphism method / Y. Sun, Y. Liu // Food Microbiology. – 2014. – Vol. 38. – P. 201–207. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.001.

25. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review / H. Frickmann, A. E. Zautner, A. Moter [et al.] // Critical Reviews in Microbiology. – 2017. – Vol. 43, № 3. – P. 263–293. DOI: https://doi.org/10.3109/1040841X.2016.1169990.

26. Evaluation of the Performance Characteristics of an In-House One Step TaqMan Real Time-Polymerase Chain Reaction Assay for Detection and Quantification of Hepatitis C Virus / F. R. Kermani, S. A. Kafi-Abad, K. M. Hosseini [et al.] // Jundishapur Journal of Microbiology. – 2017. – Vol. 10, № 3. DOI: https://doi.org/10.5812/jjm.42884.

27. Microvariation Artifacts Introduced by PCR and Cloning of Closely Related 16S rRNA Gene Sequences / A. G. C. L. Speksnijder, G. A. Kowalchuk, S. De Jong [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2001. – Vol. 67, № 1. – P. 469–472. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.469-472.2001.

28. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors / M. Margulies, M. Egholm, W. E. Altman [et al.] // Nature. – 2005. – Vol. 437, № 7057. – P. 376–380. DOI: https://doi.org/10.1038/nature03959.

29. Balasubramanian, S. Solexa Sequencing: Decoding Genomes on a Population Scale / S. Balasubramanian // Clinical Chemistry. – 2015. – Vol. 61, № 1. – P. 21–24. DOI: https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221747.

30. Comparison of next-generation sequencing systems / L. Liu, Y. Li, S. Li [et al.] // Journal of Biomedicine and Biotechnology. – 2012. DOI: https://doi.org/10.1155/2012/251364.

31. Oliver, S. P. Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications / S. P. Oliver, B. M. Jayarao, R. A. Almeida // Foodborne Pathogens and Disease. – 2005. – Vol. 2, № 2. – P. 115–129. DOI: https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.115.

32. Peck, M. W. *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue? / M. W. Peck // Journal of Applied Microbiology. – 2006. – Vol. 101, № 3. – P. 556–570. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02987.x.

33. Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products / C. J. Doyle, D. Gleeson, K. Jordan [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2015. – Vol. 197. – P. 77–87. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.022.

34. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation / W. Tesfaye, M. L. Morales, M. C. García-Parrilla [et al.] // Trends in Food Science and Technology. – 2002. – Vol. 13, № 1. – P. 12–21. DOI: https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00023-7.

35. Gullo, M. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection / M. Gullo, P. Giudici // International Journal of Food Microbiology. – 2008. – Vol. 125, № 1. – P. 46–53. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.076.

36. Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing / C. Ilabaca, P. Navarrete, P. Mardones [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2008. – Vol. 126, № 1–2. – P. 245–249. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.001.

37. Mitsuoka, T. Development of functional foods / T. Mitsuoka // Bioscience of Microbiota, Food and Health. – 2014. – Vol. 33, № 3. – P. 117–128. DOI: https://doi.org/10.12938/bmfh.33.117.

38. Bacterial consortia at different wine fermentation phases of two typical Central European grape varieties: Blaufränkisch (Frankovka modrá) and Grüner Veltliner (Veltlínske zelené) / Z. Godálová, L. Kraková, A. Puškárová [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2016. – Vol. 217. – P. 110–116. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.015.

39. Edwards, R. A. Viral metagenomics / R. A. Edwards, F. Rohwer // Nature Reviews Microbiology. – 2005. – Vol. 3, № 6. – P. 504–510. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro1163.

40. Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities / R. Logares, S. Sunagawa, G. Salazar [et al.] // Environmental Microbiology. – 2014. – Vol. 16, № 9. – P. 2659–2671. DOI: https://doi.org/10.1111/1462-2920.12250.

41. Continuous fermentation and kinetic experiments for the conversion of crude glycerol derived from second-generation biodiesel into 1,3 propanediol and butyric acid / C. Varrone, G. Floriotis, T. M. B. Heggeset [et al.] // Biochemical Engineering Journal. – 2017. – Vol. 128. – P. 149–161. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.09.012.

42. Humblot, C. Pyrosequencing of tagged 16S rRNA gene amplicons for rapid deciphering of the microbiomes of fermented foods such as pearl millet slurries / C. Humblot, J. P. Guyot // Applied and Environmental Microbiology. – 2009. – Vol. 75, № 13. – P. 4354–4361. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.00451-09.

43. Peter-Katalinić, J. MALDI MS: A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications / J. Peter-Katalinić, F. Hillenkamp. – Wiley-VCH, 2007. – 345 p. DOI: https://doi.org/10.1002/9783527610464.

44. Discrimination of multilocus sequence typing-based *Campylobacter jejuni* subgroups by MALDI-TOF mass spectrometry / A. E. Zautner, W. O. Masanta, A. M. Tareen [et al.] // BMC microbiology. – 2013. – Vol. 13. DOI: https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-247.

45. Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria / K. Cheng, H. Chui, L. Domish [et al.] // Proteomics – Clinical Applications. – 2016. – Vol. 10, № 4. – P. 346–357. DOI: https://doi.org/10.1002/prca.201500086.

46. Urwyler, S. K. Advantage of MALDI-TOF-MS over biochemical-based phenotyping for microbial identification illustrated on industrial applications / S. K. Urwyler, J. Glaubitz // Letters in Applied Microbiology. – 2016. – Vol. 62, № 2. – P. 130–137. DOI: https://doi.org/10.1111/lam.12526.

47. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria / M. Drevinek, J. Dresler, J. Klimentova [et al.] // Letters in Applied Microbiology. – 2012. – Vol. 55, № 1. – P. 40–46. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03255.x.

48. Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam / N. T. L. Doan, K. Van Hoorde, M. Cnockaert [et al.] // Letters in Applied Microbiology. – 2012. – Vol. 55, № 4. – P. 265–273. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03287.x.

49. Foodborne pathogens and their toxins / T. Martinović, U. Andjelković, M. Š. Gajdošik [et al.] // Journal of Proteomics. – 2016. – Vol. 147. – P. 226–235. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.029.

50. Next generation sequencing-based multigene panel for high throughput detection of food-borne pathogens / C. Ferrario, G. A. Lugli, M. C. Ossiprandi [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2017. – Vol. 256. – P. 20–29. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.001.

51. An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years / E. Scallan, R. M. Hoekstra, B. E. Mahon [et al.] // Epidemiology and Infection. – 2015. – Vol. 143, № 13. – P. 2795–2804. DOI: https://doi.org/10.1017/S0950268814003185.

52. European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013 // EFSA Journal. – 2015. – Vol. 13, № 1. – P. 3991–4156. DOI: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991.

53. Food-borne diseases – The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge / D. G. Newell, M. Koopmans, L. Verhoef [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2010. – Vol. 139. – P. S3–S15. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021.

54. A cholera outbreak associated with drinking contaminated well water / R. Ranjbar, M. Rahbar, A. Naghoni [et al.] // Archives of Iranian Medicine. – 2011. – Vol. 14, № 5. – P. 339–340.

55. DNA microarray for direct identification of bacterial pathogens in human stool samples / Z. Mao, H. Zheng, X. Wang [et al.] // Digestion. – 2008. – Vol. 78, № 2–3. – P. 131–138. DOI: https://doi.org/10.1159/000174465.

56. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide / R. Ranjbar, A. Karami, S. Farshad [et al.] // New Microbiologica. – 2014. – Vol. 37, № 1. – P. 1–15.

57. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors / V. Velusamy, K. Arshak, O. Korostynska [et al.] // Biotechnology Advances. – 2010. – Vol. 28, № 2. – P. 232–254. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.12.004.

58. Impact of Next Generation Sequencing Techniques in Food Microbiology / B. Mayo, C. T. C. C. Rachid, Á. Alegría [et al.] // Current Genomics. – 2014. – Vol. 15, № 4. – P. 293–309. DOI: https://doi.org/10.2174/1389202915666140616233211.

59. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing / R. Ranjan, A. Rani, A. Metwally [et al.] // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2016. – Vol. 469, № 4. – P. 967–977. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.083.

60. Staden, R. A strategy of DNA sequencing employing computer programs / R. Staden // Nucleic Acids Research. – 1979. – Vol. 6, № 7. – P. 2601–2610. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/6.7.2601.

61. Use of metagenomic shotgun sequencing technology to detect foodborne pathogens within the microbiome of the beef production chain / X. Yang, N. R. Noyes, E. Doster [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2016. – Vol. 82, № 8. – P. 2433–2443. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.00078-16

62. Abstract 5438: Multiplexed ICE COLD-PCR coupled to NGS and ddPCR enables enhanced detection of low-level DNA mutations in tissues and liquid biopsies / K. A. Richardson, S. Statt, G. Wu [et al.] // Cancer Research. – 2015. – Vol. 75, № 15 Supplement. – P. 5438–5438. DOI : https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2015-543.

63. Perkel, J. Guiding our pcr experiments / J. Perkel // BioTechniques. – 2015. – Vol. 58, № 5. – P. 217–221. DOI: https://doi.org/10.2144/000114283.

64. Optimization of digital droplet polymerase chain reaction for quantification of genetically modified organisms / L. Gerdes, A. Iwobi, U. Busch [et al.] // Biomolecular Detection and Quantification. – 2016. – Vol. 7. – P. 9–20. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.12.003.

65. Quantification of Zoonotic Bacterial Pathogens within Commercial Poultry Processing Water Samples Using Droplet Digital PCR / M. J. Rothrock, K. L. Hiett, B. H. Kiepper [et al.] // Advances in Microbiology. – 2013. – Vol. 3, № 5. – P. 403–411. DOI: https://doi.org/10.4236/aim.2013.35055.

66. Kim, T. G. Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil / T. G. Kim, S. Y. Jeong, K. S. Cho // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2014. – Vol. 98, № 13. – P. 6105–6113. DOI: https://doi.org/10.1007/s00253-014-5794-4.

67. Systemic Enzyme Therapy: Fact or Fiction? A Review with Focus on Bromelains, Proteolytic Enzymes from the Pineapple Plant / P. Meiser, Z. Xu, G. Kirsch [et al.] // Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products: From Basic Chemistry to Widespread Applications in Medicine and Agriculture / C. Jacob, G. Kirsch, A. J. Slusarenko [et al.]. – Springer Netherlands, 2014. – P. 449–467. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-017-8953-0.

68. Quantitative Analysis of Cereulide Toxin from *Bacillus Cereus* in Rice and Pasta Using Synthetic Cereulide Standard and $^{13}C_6$-Cereulide Standard – A Short Validation Study / A. Z. Muratovic, R. Tröger, K. Granelli [et al.] // Toxins. – 2014. – Vol. 6, № 12. – P. 3326–3335. DOI: https://doi.org/10.3390/toxins6123326.

69. Profiling of phenolic glycosidic conjugates in leaves of *Arabidopsis thaliana* using LC/MS / M. Stobiecki, A. Skirycz, L. Kerhoas [et al.] // Metabolomics. – 2006. – Vol. 2, № 4. – P. 197–219. DOI: https://doi.org/10.1007/s11306-006-0031-5.

70. Application of subproteomics in the characterization of Gram-positive bacteria / X.-Y. Yang, J. Lu, X. Sun // Journal of Proteomics. – 2012. – Vol. 75, № 10. – P. 2803–2810. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.027.

71. Extensive proteomic profiling of the secretome of European community acquired methicillin resistant Staphylococcus aureus clone / S. Enany, Y. Yoshida, S. Magdeldin [et al.] // Peptides. – 2012. – Vol. 37, № 1. – P. 128–137. DOI: https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.06.011.

72. *In vitro* activities of nisin and nisin derivatives alone and in combination with antibiotics against *Staphylococcus* biofilms / D. Field, R. O'Connor, P. D. Cotter [et al.] // Frontiers in Microbiology. – 2016. – Vol. 7. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00508.

73. The complex microbiota of raw milk / L. Quigley, O. O'Sullivan, C. Stanton [et al.] // FEMS Microbiology Reviews. – 2013. – Vol. 37, № 5. – P. 664–698. DOI: https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030.

74. Enterotoxin Gene Profile and Molecular Characterization of Staphylococcus aureus Isolates from Bovine Bulk Milk and Milk Products of Tigray Region, Northern Ethiopia / E. K. Tarekgne, T. Skjerdal, S. Skeie [et al.] // Journal of Food Protection. – 2016. – Vol. 79, № 8. – P. 1387–1395. DOI: https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-003.

75. Production, characterization, and antimicrobial activity of a bacteriocin from newly isolated *Enterococcus faecium* IJ-31 / I. Javed, S. Ahmed, S. Manam [et al.] // Journal of Food Protection. – 2010. – Vol. 73, № 1. – P. 44–52. DOI: https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.1.44.

76. Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties / B. Remenant, E. Jaffrès, X. Dousset [et al.] // Food Microbiology. – 2015. – Vol. 45, № PA. – P. 45–53. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.009.

77. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage / G. Lücking, M. Stoeckel, Z. Atamer [et al.] // International Journal of Food Microbiology. – 2013. – Vol. 166, № 2. – P. 270–279. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.004.

78. Microbial dynamics during shelf-life of industrial Ricotta cheese and identification of a Bacillus strain as a cause of a pink discolouration / E. Sattin, N. A. Andreani, L. Carraro [et al.] // Food Microbiology. – 2016. – Vol. 57. – P. 8–15.

79. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data / J. G. Caporaso, J. Kuczynski, J. Stombaugh [et al.] // Nature Methods. – 2010. – Vol. 7, № 5. – P. 335–336. DOI: https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303.

80. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities / P. D. Schloss, S. L. Westcott, T. Ryabin [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2009. – Vol. 75, № 23. – P. 7537–7541. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09.

81. The RDP-II (Ribosomal Database Project) / B. L. Maidak, J. R. Cole, T. G. Lilburn [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2001. – Vol. 29, № 1. – P. 173–174. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/29.1.173.

82. SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB / E. Pruesse, C. Quast, K. Knittel [et al.] // Nucleic Acids Research. – 2007. – Vol. 35, № 21. – P. 7188–7196. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkm864.

83. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB / T. Z. DeSantis, P. Hugenholtz, N. Larsen [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – Vol. 72, № 7. – P. 5069–5072. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05.

84. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi / U. Kõljalg, R. H. Nilsson, K. Abarenkov [et al.] // Molecular Ecology. – 2013. – Vol. 22, № 21. – P. 5271–5277. DOI: https://doi.org/10.1111/mec.12481.

85. Fungal identification using a Bayesian classifier and the Warcup training set of internal transcribed spacer sequences / V. Deshpande, Q. Wang, P. Greenfield // Mycologia. – 2016. – Vol. 108, № 1. – P. 1–5. DOI: https://doi.org/10.3852/14-293.

86. Зубков, М. Н. Биологические особенности бактерий рода *Moraxella* и их этиологическая роль в патологии человека. Сообщение II. Характеристика биохимических свойств и идентификация / М. Н. Зубков // Лабораторное дело. – 1988. – № 3. – С. 15–18.

87. Зубков, М. Н. Характеристика серологических свойств бактерий рода *Moraxella* / М. Н. Зубков // Лабораторное дело. – 1990. – № 7. – С. 64–66.

88. Калина, Г. П. Бактерии рода *Moraxella*. Экология / Г. П. Калина, Г. М. Трухина // Журнал микробиологии, эпидемиологи и иммунологии. – 1987. – Т. 64, № 2. – С. 93–102.

89. Калина, Г. П. Патогенны ли моракселлы? Проблема и ее возможные решения / Г. П. Калина, Г. М. Трухина // Журнал микробиологии, эпидемиологи и иммунологии. – 1988. – Т. 65, № 1. – С. 80–88.

90. Коротяев, А. И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / А. И. Коротяев, С. А. Бабичев. – СПб. : СпецЛит, 2010. – 772 с.

91. Поздеев, О. К. Медицинская микробиология / О. К. Поздеев. – М. : Гэотар-Мед, 2001. – 778 с.

References

1. Fenchel T., King G.M., and Blackburn T.H. *Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling*. Academic Press Publ., 2012. 303 p. DOI: https://doi.org/10.1016/C2010-0-67238-5.

2. Tu Q., Yu H., He Z., et al. GeoChip 4: A functional gene-array-based high-throughput environmental technology for microbial community analysis. *Molecular Ecology Resources*, 2014, vol. 14, no. 5, pp. 914–928. DOI: https://doi.org/10.1111/1755-0998.12239.

3. Mason O.U., Hazen T.C., Borglin S., et al. Metagenome, metatranscriptome and single-cell sequencing reveal microbial response to Deepwater Horizon oil spill. *ISME Journal*, 2012, vol. 6, no. 9, pp. 1715–1727. DOI: https://doi.org/10.1038/ismej.2012.59.

4. Wong C.W., Heng C.L.W., Wan Yee L., et al. Optimization and clinical validation of a pathogen detection microarray. *Genome Biology*, 2007, vol. 8, no. 5, pp. R93. DOI: https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-r93.

5. Norman J.M., Handley S.A., and Virgin H.W. Kingdom-Agnostic Metagenomics and the Importance of Complete Characterization of Enteric Microbial Communities. *Gastroenterology*, 2014, vol. 146, no. 6, pp. 1459–1469. DOI: https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.02.001.

6. Cox M.J., Cookson W.O.C.M., and Moffatt M.F. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Human Molecular Genetics*, 2013, vol. 22, no. R1, pp. R88–R94. DOI: https://doi.org/10.1093/hmg/ddt398.

7. Beuchat L.R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*, 2002, vol. 4, no. 4, pp. 413–423. DOI: https://doi.org/10.1016/S1286-4579(02)01555-1.

8. Samson R.A., Hoekstra E.S., Lund F., Filtenborg O., and Frisvad J.C. Methods for the detection, isolation and characterization of food-borne fungi. *In: Samson R.A., Hoekstra E.S., Frisvad J.C. and Filtenborg O. (eds) Introduction fo food – and airborne fungi*. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmelcultures Publ., 2000. pp. 283–297.

9. Houbraken J., Dijksterhuis J., and Samson R.A. Diversity and biology of heat-resistant fungi. *In: Wong H.-C. (ed) Stress responses of Foodborne Microorganisms*. Nova Press Publ., 2012. pp. 331–353.

10. Ropars J., Dupont J., Fontanillas E., et al. Sex in Cheese: Evidence for Sexuality in the Fungus *Penicillium roqueforti*. *PLoS One*, 2012, vol. 7, no. 11. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049665.

11. Schacherer J., Shapiro J.A., Ruderfer D.M., and Kruglyak L. Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 2009, vol. 458, no. 7236, pp. 342–345. DOI: https://doi.org/10.1038/nature07670.

12. Suprun I.I., Tokmakov S.V., Ageeva N.M., and Nasonov A.I. Approbation of SSR-analysis for DNA-identification of commercial wine yeast strains. *Scientific Journal of KubSAU*, 2017, no. 125, pp. 151–163. (In Russ.). DOI: https://doi.org/10.21515/1990-4665-125-009.

13. Fay J.C. and Benavides J.A. Evidence for Domesticated and Wild Populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Genetics*, 2005, vol. 1, no. 1, pp. 0066–0071. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010005.

14. Fidalgo M., Barrales R.R., Ibeas J.I., and Jimenez J. Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, vol. 103, no. 30, pp. 11228–11233. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.0601713103.

15. Antonangelo A.T.B.F., Alonso D.P., Ribolla P.E.M., and Colombi D. Microsatellite marker-based assessment of the biodiversity of native bioethanol yeast strains. *Yeast*, 2013, vol. 30, no. 8, pp. 307–317. DOI: https://doi.org/10.1002/yea.2964.

16. Franco-Duarte R., Bessa D., Gonçalves F., et al. Genomic and transcriptomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* isolates with focus in succinic acid production. *FEMS Yeast Research*, 2017, vol. 17, no. 6. DOI: https://doi.org/10.1093/femsyr/fox057.

17. Moncrief I., Garzon C., Marek S., et al. Development of simple sequence repeat (SSR) markers for discrimination among isolates of *Fusarium proliferatum*. *Journal of Microbiological Methods*, 2016, vol. 126, pp. 12–17. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.03.013.

18. Legras J.-L., Ruh O., Merdinoglu D., and Karst F. Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, vol. 102, no. 1, pp. 73–83. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.007.

19. Knight S. and Goddard M.R. Quantifying separation and similarity in a Saccharomyces cerevisiae metapopulation. *ISME Journal*, 2015, vol. 9, no. 2, pp. 361–370. DOI: https://doi.org/10.1038/ismej.2014.132.

20. Cordero-Bueso G., Rodríguez M.E., Garrido C., Cantoral J.M. Rapid and not culture-dependent assay based on multiplex PCR-SSR analysis for monitoring inoculated yeast strains in industrial wine fermentations. *Archives of Microbiology*, 2017, vol. 199, no. 1, pp. 135–143. DOI: https://doi.org/10.1007/s00203-016-1287-4.

21. Teresa Fernández-Espinar M., Esteve-Zarzoso B., Querol A., and Barrio E. RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus *Saccharamyces*: A fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 2000, vol. 78, no. 1, pp. 87–97. DOI: https://doi.org/10.1023/A:1002741800609.

22. Bokulich N.A. and Mills D.A. Next-generation approaches to the microbial ecology of food fermentations. *BMB Reports*, 2012, vol. 45, no. 7, pp. 377–389. DOI: https://doi.org/10.5483/BMBRep.2012.45.7.148.

23. Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F., and Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, vol. 49, no. 1, pp. 329–337. DOI: https://doi.org/10.1099/00207713-49-1-329.

24. Sun Y. and Liu Y. Investigating of yeast species in wine fermentation using terminal restriction fragment length polymorphism method. *Food Microbiology*, 2014, vol. 38, pp. 201–207. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.09.001.

25. Frickmann H., Zautner A.E., Moter A., et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in the microbiological diagnostic routine laboratory: a review. *Critical Reviews in Microbiology*, 2017, vol. 43, no. 3, pp. 263–293. DOI: https://doi.org/10.3109/1040841X.2016.1169990.

26. Kermani F.R., Kafi-Abad S.A., Hosseini K.M., et al. Evaluation of the Performance Characteristics of an In-House One Step TaqMan Real Time-Polymerase Chain Reaction Assay for Detection and Quantification of Hepatitis C Virus. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2017, vol. 10, no. 3. DOI: https://doi.org/10.5812/jjm.42884.

27. Speksnijder A.G.C.L., Kowalchuk G.A., De Jong S., et al. Microvariation Artifacts Introduced by PCR and Cloning of Closely Related 16S rRNA Gene Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, vol. 67, no. 1, pp. 469–472. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.469-472.2001.

28. Margulies M., Egholm M., Altman W.E. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 2005, vol. 437, no. 7057, pp. 376–380. DOI: https://doi.org/10.1038/nature03959.

29. Balasubramanian S. Solexa Sequencing: Decoding Genomes on a Population Scale. *Clinical Chemistry*, 2015, vol. 61, no. 1, pp. 21–24. DOI: https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221747.

30. Liu L., Li Y., Li S., et al. Comparison of next-generation sequencing systems. J*ournal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012. DOI: https://doi.org/10.1155/2012/251364

31. Oliver S.P., Jayarao B.M., and Almeida R.A. Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2005, vol. 2, no. 2, pp. 115–129. DOI: https://doi.org/10.1089/fpd.2005.2.115.

32. Peck M.W. *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue? *Journal of Applied Microbiology*, 2006, vol. 101, no. 3, pp. 556–570. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02987.x.

33. Doyle C.J., Gleeson D., Jordan K., et al. Anaerobic sporeformers and their significance with respect to milk and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 2015, vol. 197, pp. 77–87. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.12.022.

34. Tesfaye W., Morales M.L., García-Parrilla M.C., and Troncoso A.M. Wine vinegar: technology, authenticity and quality evaluation. *Trends in Food Science and Technology*, 2002, vol. 13, no. 1, pp. 12–21. DOI: https://doi.org/10.1016/S0924-2244(02)00023-7.

35. Gullo M. and Giudici P. Acetic acid bacteria in traditional balsamic vinegar: Phenotypic traits relevant for starter cultures selection. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, vol. 125, no. 1, pp. 46–53. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.076.

36. Ilabaca C., Navarrete P., Mardones P., Romero J., and Mas A. Application of culture culture-independent molecular biology based methods to evaluate acetic acid bacteria diversity during vinegar processing. *International Journal of Food Microbiology*, 2008, vol. 126, no. 1–2, pp. 245–249. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.05.001.

37. Mitsuoka T. Development of functional foods. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 2014, vol. 33, no. 3, pp. 117–128. DOI: https://doi.org/10.12938/bmfh.33.117.

38. Godálová Z., Kraková L., Puškárová A., et al. Bacterial consortia at different wine fermentation phases of two typical Central European grape varieties: Blaufränkisch (Frankovka modrá) and Grüner Veltliner (Veltlínske zelené). *International Journal of Food Microbiology*, 2016, vol. 217, pp. 110–116. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.015.

39. Edwards R.A. and Rohwer F. Viral metagenomics. *Nature Reviews Microbiology*, 2005, vol. 3, no. 6, pp. 504–510. DOI: https://doi.org/10.1038/nrmicro1163.

40. Logares R., Sunagawa S., Salazar G., et al. Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. *Environmental Microbiology*, 2014, vol. 16, no. 9, pp. 2659–2671. DOI: https://doi.org/10.1111/1462-2920.12250.

41. Varrone C., Floriotis G., Heggeset T.M.B. Continuous fermentation and kinetic experiments for the conversion of crude glycerol derived from second-generation biodiesel into 1,3 propanediol and butyric acid. *Biochemical Engineering Journal*, 2017, vol. 128, pp. 149–161. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bej.2017.09.012.

42. Humblot C. and Guyot J.P. Pyrosequencing of tagged 16S rRNA gene amplicons for rapid deciphering of the microbiomes of fermented foods such as pearl millet slurries. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, vol. 75, no. 13, pp. 4354–4361. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.00451-09.

43. Peter-Katalinić J. and Hillenkamp F. MALDI MS: *A Practical Guide to Instrumentation, Methods and Applications*. Wiley-VCH Publ., 2007. 345 p. DOI: https://doi.org/10.1002/9783527610464.

44. Zautner A.E., Masanta W.O., Tareen A.M., et al. Discrimination of multilocus sequence typing-based Campylobacter jejuni subgroups by MALDI-TOF mass spectrometry. *BMC microbiology*, 2013, vol. 13. DOI: https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-247.

45. Cheng K., Chui H., Domish L., Hernandez D., and Wang G. Recent development of mass spectrometry and proteomics applications in identification and typing of bacteria. *Proteomics – Clinical Applications*, 2016, vol. 10, no. 4, pp. 346–357. DOI: https://doi.org/10.1002/prca.201500086.

46. Urwyler S.K. and Glaubitz J. Advantage of MALDI-TOF-MS over biochemical-based phenotyping for microbial identification illustrated on industrial applications. *Letters in Applied Microbiology*, 2016, vol. 62, no. 2, pp. 130–137. DOI: https://doi.org/10.1111/lam.12526.

47. Drevinek M., Dresler J., Klimentova J., Pisa L., and Hubalek M. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, vol. 55, no. 1, pp. 40–46. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03255.x.

48. Doan N.T.L., Van Hoorde K., Cnockaert M., et al. Validation of MALDI-TOF MS for rapid classification and identification of lactic acid bacteria, with a focus on isolates from traditional fermented foods in Northern Vietnam. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, vol. 55, no. 4, pp. 265–273. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03287.x.

49. Martinović T., Andjelković U., Gajdošik M.Š. Foodborne pathogens and their toxins. *Journal of Proteomics*, 2016, vol. 147, pp. 226–235. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.029.

50. Ferrario C., Lugli G.A., Ossiprandi M.C., et al. Next generation sequencing-based multigene panel for high throughput detection of food-borne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 2017, vol. 256, pp. 20–29. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.001.

51. Scallan E., Hoekstra R.M., Mahon B.E., Jones T.F., and Griffin P.M. An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. *Epidemiology and Infection*, 2015, vol. 143, no. 13, pp. 2795–2804. DOI: https://doi.org/10.1017/S0950268814003185.

52. European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 2015, vol. 13, no. 1, pp. 3991–4156. DOI: https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991.

53. Newell D.G., Koopmans M., Verhoef L., et al. Food-borne diseases – The challenges of 20years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, vol. 139, pp. S3–S15. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.021.

54. Ranjbar R., Rahbar M., Naghoni A. A cholera outbreak associated with drinking contaminated well water. *Archives of Iranian Medicine*, 2011, vol. 14, no. 5, pp. 339–340.

55. Mao Z., Zheng H., Wang X., et al. DNA microarray for direct identification of bacterial pathogens in human stool samples. *Digestion*, 2008, vol. 78, no. 2–3, pp. 131–138. DOI: https://doi.org/10.1159/000174465.

56. Ranjbar R., Karami A., Farshad S., Giammanco G.M., and Mammina C. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *New Microbiologica*, 2014, vol. 37, no. 1, pp. 1–15.

57. Velusamy V., Arshak K., Korostynska O., Oliwa K., and Adley C. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*, 2010, vol. 28, no. 2, pp. 232–254. DOI: https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.12.004.

58. Mayo B., Rachid C.T.C.C., Alegría Á., et al. Impact of Next Generation Sequencing Techniques in Food Microbiology. *Current Genomics*, 2014, vol. 15, no. 4, pp. 293–309. DOI: https://doi.org/10.2174/1389202915666140616233211.

59. Ranjan R., Rani A., Metwally A., McGee H.S., and Perkins D.L. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, vol. 469, no. 4, pp. 967–977. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.12.083.

60. Staden R.A. strategy of DNA sequencing employing computer programs. *Nucleic Acids Research*, 1979, vol. 6, no. 7, pp. 2601–2610. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/6.7.2601.

61. Yang X., Noyes N.R., Doster E., et al. Use of metagenomic shotgun sequencing technology to detect foodborne pathogens within the microbiome of the beef production chain. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, vol. 82, no. 8, pp. 2433–2443. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.00078-16.

62. Richardson K.A., Statt S., Wu G., et al. Abstract 5438: Multiplexed ICE COLD-PCR coupled to NGS and ddPCR enables enhanced detection of low-level DNA mutations in tissues and liquid biopsies. *Cancer Research*, 2015, vol. 75, no. 15 Supplement, pp. 5438–5438. DOI: https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2015-543.

63. Perkel J. Guiding our pcr experiments. *BioTechniques*, 2015, vol. 58, no. 5, pp. 217–221. DOI: https://doi.org/10.2144/000114283.

64. Gerdes L., Iwobi A., Busch U., and Pecoraro S. Optimization of digital droplet polymerase chain reaction for quantification of genetically modified organisms. *Biomolecular Detection and Quantification*, 2016, vol. 7, pp. 9–20. DOI: https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.12.003.

65. Rothrock M.J., Hiett K.L., Kiepper B.H., Ingram K., and Hinton A. Quantification of Zoonotic Bacterial Pathogens within Commercial Poultry Processing Water Samples Using Droplet Digital PCR. *Advances in Microbiology*, 2013, vol. 3, no. 5, pp. 403–411. DOI: https://doi.org/10.4236/aim.2013.35055.

66. Kim T.G., Jeong S.Y., Cho K.S. Comparison of droplet digital PCR and quantitative real-time PCR for examining population dynamics of bacteria in soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, vol. 98, no. 13, pp. 6105–6113. DOI: https://doi.org/10.1007/s00253-014-5794-4.

67. Meiser P., Xu Z., Kirsch G., and Jacob C. Systemic Enzyme Therapy: Fact or Fiction? A Review with Focus on Bromelains, Proteolytic Enzymes from the Pineapple Plant. *In: Jacob C., Kirsch G., Slusarenko A.J., Winyard P.G., and Burkholz T. (eds) Recent Advances in Redox Active Plant and Microbial Products: From Basic Chemistry to Widespread Applications in Medicine and Agriculture*. Springer Netherlands Publ., 2014. 449–467 p. DOI: https://doi.org/10.1007/978-94-017-8953-0.

68. Muratovic A.Z., Tröger R., Granelli K., and Hellenäs K.-E. Quantitative Analysis of Cereulide Toxin from *Bacillus cereus* in Rice and Pasta Using Synthetic Cereulide Standard and $^{13}C_6$-Cereulide Standard – A Short Validation Study. *Toxins*, 2014, vol. 6, no. 12, pp. 3326–3335. DOI: https://doi.org/10.3390/toxins6123326.

69. Stobiecki M., Skirycz A., Kerhoas L., et al. Profiling of phenolic glycosidic conjugates in leaves of Arabidopsis thaliana using LC/MS. *Metabolomics*, 2006, vol. 2, no. 4, pp. 197–219. DOI: https://doi.org/10.1007/s11306-006-0031-5.

70. Yang X.-Y., Lu J., Sun X., and He Q.-Y. Application of subproteomics in the characterization of Gram-positive bacteria. *Journal of Proteomics*, 2012, vol. 75, no. 10, pp. 2803–2810. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.12.027.

71. Enany S., Yoshida Y., Magdeldin S., et al. Extensive proteomic profiling of the secretome of European community acquired methicillin resistant Staphylococcus aureus clone. *Peptides*, 2012, vol. 37, no. 1, pp. 128–137. DOI: https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.06.011.

72. Field D., O'Connor R., Cotter P.D., Ross, R.P., and Hill C. *In vitro* activities of nisin and nisin derivatives alone and in combination with antibiotics against *Staphylococcus* biofilms. *Frontiers in Microbiology*, 2016, vol. 7. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00508.

73. Quigley L., O'Sullivan O., Stanton C., et al. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, vol. 37, no. 5, pp. 664–698. DOI: https://doi.org/10.1111/1574-6976.12030.

74. Tarekgne E.K., Skjerdal T., Skeie S., et al. Enterotoxin Gene Profile and Molecular Characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from Bovine Bulk Milk and Milk Products of Tigray Region, Northern Ethiopia. *Journal of Food Protection*, 2016, vol. 79, no. 8, pp. 1387–1395. DOI: https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-003.

75. Javed I., Ahmed S., Manam S., et al. Production, characterization, and antimicrobial activity of a bacteriocin from newly isolated *Enterococcus faecium* IJ-31. *Journal of Food Protection*, 2010, vol. 73, no. 1, pp. 44–52. DOI: https://doi.org/10.4315/0362-028X-73.1.44.

76. Remenant B., Jaffrès E., Dousset X., Pilet M.-F., Zagorec M. Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiology*, 2015, vol. 45, no. PA, pp. 45–53. DOI: https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.03.009.

77. Lücking G., Stoeckel M., Atamer Z., Hinrichs J., and Ehling-Schulz M. Characterization of aerobic spore-forming bacteria associated with industrial dairy processing environments and product spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, vol. 166, no. 2, pp. 270–279. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.004.

78. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, vol. 7, no. 5, pp. 335–336. DOI: https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303.

79. Schloss P.D., Westcott S.L., Ryabin T., et al. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, vol. 75, no. 23, pp. 7537–7541. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09.

80. Maidak B.L., Cole J.R., Lilburn T.G., et al. The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research*, 2001, vol. 29, no. 1, pp. 173–174. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/29.1.173.

81. Pruesse E., Quast C., Knittel K., et al. SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 2007, vol. 35, no. 21, pp. 7188–7196. DOI: https://doi.org/10.1093/nar/gkm864

82. DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Larsen N., et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, vol. 72, no. 7, pp. 5069–5072. DOI: https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05.

83. Kõljalg U., Nilsson R.H., Abarenkov K., et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Molecular Ecology*, 2013, vol. 22, no. 21, pp. 5271–5277. DOI: https://doi.org/10.1111/mec.12481.

84. Deshpande V., Wang Q., Greenfield P., et al. Fungal identification using a Bayesian classifier and the Warcup training set of internal transcribed spacer sequences. *Mycologia*, 2016, vol. 108, no. 1, pp. 1–5. DOI: https://doi.org/10.3852/14-293.

85. Zubkov M.N. Biologicheskie osobennosti bakteriy roda *Moraxella* i ikh ehtiologicheskaya rol′ v patologii cheloveka. Soobshchenie II. Kharakteristika biokhimicheskikh svoystv i identifikatsiya [Biological features of bacteria of the genus *Moraxella* and their etiological role in human pathology. Post II. Characteristics of biochemical properties and identification]. *Laboratornoe delo* [Laboratory work], 1988, no. 3, pp. 15–18. (In Russ.).

86. Zubkov M.N. Kharakteristika serologicheskikh svoystv bakteriy roda *Moraxella* [Characteristics of the serological properties of bacteria of the genus *Moraxella*]. *Laboratornoe delo* [Laboratory work], 1990, no. 7, pp. 64–66. (In Russ.).

87. Kalina G.P. and Trukhina G.M. Bakterii roda *Moraxella*. Ehkologiya [Bacteria of the genus *Moraxella*. Ecology]. *Zhurnal mikrobiologii, ehpidemiologi i immunologii* [Journal of Microbiology, Epidemiologists and Immunology], 1987, vol. 64, no. 2, pp. 93–102. (In Russ.).

88. Kalina G.P. and Trukhina G.M. Patogenny li morakselly? Problema i ee vozmozhnye resheniya [Are *Moraxella* pathogens? Problem and its possible solutions]. *Zhurnal mikrobiologii, ehpidemiologi i immunologii* [Journal of Microbiology, Epidemiologists and Immunology], 1988, vol. 65, no. 1, pp. 80–88. (In Russ.).

89. Korotyaev A.I. and Babichev S.A. *Meditsinskaya mikrobiologiya, immunologiya i virusologiya* [Medical microbiology, immunology, and virology]. St. Peterburg: SpecLit Publ., 2010. 772 p. (In Russ.).

90. Pozdeev O.K. *Meditsinskaya mikrobiologiya* [Medical Microbiology]. Moscow: Geotar-Med Publ., 2001. 778 p. (In Russ.).

Деревенщикова Мария Ивановна
магистрант, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, 1.

Mariya I. Derevshchikova
Undergraduate, Voronezh State University, 1 Universitetskaya Square, Voronezh, 394018, Russia

Сыромятников Михаил Юрьевич
канд. биол. наук, доцент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, 1, тел.: + 7 (473) 220-88-76, e-mail: syromyatnikov@bio.vsu.ru

Mikhail Yu. Syromyatnikov
Cand.Sci.(Biol.), Associate Professor of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, 1 Universitetskaya Square, Voronezh, 394018, Russia, phone: + 7 (473) 220-88-76, e-mail: syromyatnikov@bio.vsu.ru

Попов Василий Николаевич
д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедры генетики, цитологии и биоинженерии, ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», 394018, Россия, г. Воронеж, Университетская площадь, 1, тел.: + 7 (473) 220-88-76, e-mail: pvn@bio.vsu.ru
http://orcid.org/0000-0003-1294-8686

Vasily N. Popov
Dr.Sci.(Biol.), Professor, Head of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University, 1 Universitetskaya Square, Voronezh, 394018, Russia, phone: + 7 (473) 220-88-76, e-mail: pvn@bio.vsu.ru
http://orcid.org/0000-0003-1294-8686