

УДК 579.6

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА И МЕТОДОВ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ С ЦЕЛЬЮ БИОПРОЦЕССИНГА МЯСНОГО ФАРША

Хакимов Н.Т., студент 4 курса, Родичева А.Н., магистрант 3 курса
Научный руководитель – к.б.н., доцент Майоров П.С.
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: качество, бактерии, мясной фарш, *E. coli*, КМАФАнМ, биобезопасность.

В статье представлены результаты проведения оценки влияния и скорости развития бактерии *E.coli* в мясном фарше. Снижение бактериальной обсемененности происходит при превышении количества биопрепарата над количеством бактерий в 2 и более раза, но при этом снижение было отмечено лишь на 1 порядок. Через 48 часов хранения, обработанных биопрепаратом и бактериями образцов, было отмечено более эффективное подавление бактериофагами целевых бактерий. Так при соотношении вносимых суспензии бактерий и биопрепарат 1 к 1 уже наблюдалось снижение микробной обсемененности. При этом при снижении количества биопрепарата по отношению к бактериальной суспензии не приводило к положительному результату.

Введение

Мясо является превосходным источником белка для человека, но оно также очень восприимчиво к микробному загрязнению, что приводит к порче продуктов питания и болезням пищевого происхождения. Постоянно растет число заболеваний пищевого происхождения, вызываемых бактериальными патогенами, такими как *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Listeria*. Продукты питания подвергаются воздействию этих патогенов во время производства, обработки, хранения и упаковки. Физические обработки, включая ультрафиолетовое излучение, высокое давление, сухое тепло и пар, являются действенными методами для уменьшения количества

патогенных микробов в сырье. Эти стратегии были приняты во внимание, поскольку со временем использование антибиотиков сократилось. Это связано с тем, что устойчивые к антибиотикам бактерии могут проникать в пищевую цепочку человека и негативно влиять на лечение человека противомикробными препаратами. Однако хорошо известно, что физические методы снижения микробной нагрузки на сырые пищевые продукты оказывают негативное влияние на органолептические качества продуктов, что снижает их приемлемость.

В связи с этим целью исследования являлось проведение оценки влияния и скорости развития бактерии *E.coli* в мясном фарше.

В качестве целевого объекта наших исследований был использован фарш из куриного мяса.

Материалы и методы

Штаммы бактерий и бактериофагов. В работе были использованы штаммы бактерий *E.coli* Я1, 22, 3254 и бактериофаги Col4-УГСХА, ЕС1, ЕС2, ЕС3, ЕС4, полученные из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ.

При проведении работ по оценке эффективности биопроцессинга мясного фарша с использованием сконструированного биопрепарата приготовление фарша осуществляли самостоятельно из свиного мяса.

Питательные среды и реактивы. ГРМ бульон (МПБ) (Оболенск), ГРМ агар (МПА) (Оболенск), среда Эндо (Оболенск), агар бактериологический (Оболенск), пептон сухой ферментативный (Оболенск), хлорид натрия (AppliChem), среды Гисса (Оболенск), лимонно-амиачное железо (AppliChem), сульфат магния (AppliChem), обезжиренное молоко (AppliChem), гидрофосфат калия двузамещенный (AppliChem), гидрофосфат калия однозамещенный (AppliChem), глюкоза (Оболенск), N-N-диметил-пара-фенилен-диамид (AppliChem), бромтимоловый синий (Оболенск), калия гидроксид (AppliChem), реактив Эрлиха, NO₃ (AppliChem), альфа-нафтол (Оболенск), метиловый красный (Оболенск), перекись водорода, растворимый крахмал (HiMedia), желатин (Оболенск), набор окраски по Граму (Оболенск), иммерсионное масло (HiMedia).

Приборы и оборудование. Лабораторная бактериологическая посуда, холодильники минусовые и бытовые, термостат ТС 1/80 СПУ, микроскоп «Биомед» с видеофотонасадкой, набор для фильтрации фагов (Millipore-Millivac), водяная баня, лабораторные центрифуги СМ – 6 М с угловыми и баккет-роторами, автоклав ГК-100-3, термометр ртутный, дистиллятор, лупа бинокулярная МБС – 9, шкаф сушильно-стерилизационный ШСС – 80.

Изучение биологических свойств бактериофагов проводили по стандартным методикам [1,3,5]. Для изучения литической активности использовали методы Аппельмана и Грациа [8,9,12].

Показатели микробиологического качества мясного фарша определяли в соответствии с действующими нормативными документами: ТР ТС 034/2013 «О безопасности мяса и мясной продукции», ТР ТС 021/2011 «О безопасности пищевой продукции», ГОСТ Р 54354-2011 «Мясо и мясные продукты. Общие требования и методы микробиологического анализа».

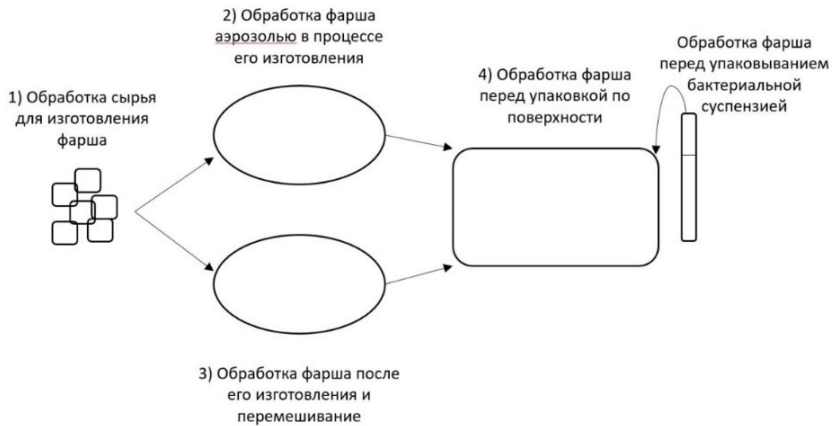


Рис. 1. Схема оценки влияния метода применения фагового биопрепарата на его эффективность

Результаты исследований

Для оценки влияния метода применения фагового биопрепарата была разработана схема эксперимента (рис.1). Для этого несколько образцов фарша обрабатывали фаговым препаратом по поверхности

фарша, при его изготовлении распылением аэрозоли, перемешиванием фарша с биопрепаратом после изготовления фарша и обработка биопрепаратом сырья для изготовления фарша. Сырье для изготовления фарша было предварительно искусственно контаминировано штаммом 22 исходя из расчета 10^5 КОЕ/г.

Результаты проведенного эксперимента представлены в таблице 1. Полученные данные показали, что наилучшего эффекта удалось достигнуть в случае обработки материала сконструированным биопрепаратом непосредственно после изготовления фарша с активным его перемешиванием. В данном случае наблюдалось снижение концентрации бактерий по сравнению с контролем в 200 раз. Несколько худших результатов удалось достичь при обработке фарша аэрозолем в процессе его изготовления – наблюдалось снижение концентрации бактерий примерно в 20 раз и при обработке сырья для изготовления фарша биопрепаратом – снижение в 6-7 раз.

Таблица 1. Изменение количества бактерий в мясном фарше в зависимости от метода его обработки

Метод обработки мясного фарша биопрепаратом	Количество целевых бактерий в мясном фарше через 24 часа, КОЕ/г
Обработка сырья для изготовления фарша	3×10^5
Обработка фарша аэрозолем в процессе изготовления	9×10^4
Обработка фарша нативным препаратом после изготовления	1×10^4
Обработка фарша перед упаковыванием по поверхности	1×10^6
Контроль	2×10^6

Обработка поверхности фарша перед упаковыванием практически не сказалась на конечной концентрации бактерий.

С целью оценки воздействия фагового биопрепарата на бактерии вида *E. coli* в мясном фарше была разработана схема постановки эксперимента, представленная на рисунке 2.



Рис. 2. Схема биопроцессинга мясного фарша с применением фагового биопрепарата

Было отобрано 8 образцов фарша массой по 100 г каждый. Образцы фарша, в соответствии с представленной схемой, обрабатывали сконструированным биопрепаратом и суспензией бактерий. Для данного эксперимента использовали сконструированный биопрепарат с литической активностью 10^8 БОЕ/мл. В качестве бактериальной культуры использовали штамм 22 в концентрации 10^8 КОЕ/мл. Для обработки фарша использовали кратное 5 мл значение биопрепарата и суспензии бактерий, получая таким образом количество бактерий в образце 2×10^5 КОЕ/г. Указанный штамм использовался в эксперименте поскольку образовывал на поверхности среды Эндо розовые колонии без металлического блеска, что позволяло более просто обнаруживать его рост при параллельном росте какой-либо имеющейся в фарше микрофлоры.

Полученные образцы мясного фарша, обработанные микроорганизмами, хранили в течение 2 суток при комнатной температуре (22 ± 2 °C). Ежедневно отбирали часть образца в соответствии с приведенной схемой для оценки микробной обсемененности. Отобранную навеску суспендировали в физ.растворе в течение 15 минут и далее готовили 10-кратные разведения с последующим их высевом на среду Эндо. Далее посевы культивировали в термостате в течение суток при температуре 37 °C и фиксировали результат.

В таблице 2 и на рисунках 3-4 представлены результаты, полученные спустя 24 часа выдержки обработанных бактериями и биопрепаратом образцов фарша.

Таблица 2. Наличие бактерий *E. coli* в образцах фарша после его обработки разработанным биопрепаратом (время экспозиции 24 часа), КОЕ/г

Соотношение в исследуемом образце внесенных бактерий и биопрепарата					Контроль бактерий	Контроль биопрепарата
3:1	2:1	1:1	1:2	1:3		
10^5	10^5	10^5	10^4	10^4	10^5	от

от – отсутствие роста бактерий

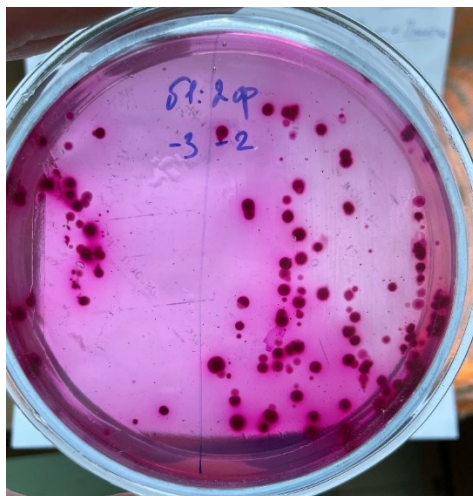


Рис. 3. Рост бактерий из 2 и 3 разведений фарша после обработки биопрепаратом в соотношении 1:2, 24 часа

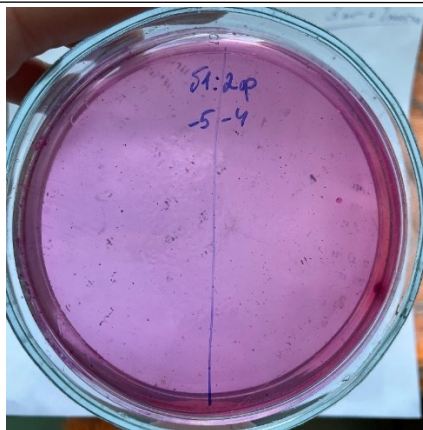


Рис. 4. Отсутствие роста бактерий из 4 и 5 разведений фарша после обработки биопрепаратом в соотношении 1:2, 24 часа

Из представленных данных видно, что снижение бактериальной обсемененности происходит при превышении количества биопрепарата над количеством бактерий в 2 и более раза, но при этом снижение было отмечено лишь на 1 порядок. От части данный факт может быть обусловлен тем, что в отличие от жидкой среды в фарше бактериофагам входящим в биопрепарат значительно сложнее найти свою цель и эффект получается ограниченным.

Таблица 3. Наличие бактерий *E. coli* в образцах фарша после его обработки разработанным биопрепаратом (время экспозиции 48 часов), КОЕ/г

Соотношение в исследуемом образце внесенных бактерий и биопрепарата					Контроль бактерий	Контроль биопрепарата
3:1	2:1	1:1	1:2	1:3		
10^5	10^5	10^4	10^3	10^3	10^5	от

от – отсутствие роста бактерий

Результаты, полученные через 48 часов хранения, обработанных биопрепаратом и бактериями образцов, показал более эффективное подавление бактериофагами целевых бактерий. Так при соотношении вносимых суспензии бактерий и биопрепарат 1 к 1 уже наблюдалось снижение микробной обсемененности. Лучший результат был получен

при увеличении количества вносимого биопрепарата по сравнению с количеством бактериальной суспензии – снижение с 10^5 до 10^3 КОЕ/г. При этом при снижении количества биопрепарата по отношению к бактериальной суспензии не приводило к положительному результату. В связи с этим было принято решение продлить эксперимент еще на 24 часа для образцов, где количество внесенного биопрепарат равно или превышает количество бактериальной суспензии.

Заключение

Для целей биопроцессинга мясного сырья был сконструирован фаговый биопрепарат, активный в отношении бактерий *E. coli*. Отмечалось, что литическая активность бактериофагов, отобранных для изготовления биопрепарата, достигала максимума в течение 22 часов при минимальном соотношении фаг/культура 1 к 2. В производстве биопрепарата используется культура бактерий *E. coli* 22, штаммы бактериофага Col4-УГСХА и EC2. Температура культивирования составляет 37 °С, время пассажа - 22 часа. Соотношение фаг/культура при производстве находится на уровне 1/2. После изготовления фаговый биопрепарат стерильно упаковывается во флаконы различного объема.

Оценка воздействия фагового биопрепарата и методов его применения с целью биопроцессинга мясного фарша позволила установить, что снижение бактериальной обсемененности происходит при превышении количества биопрепарата над количеством бактерий в 2 и более раза, но при этом снижение было отмечено лишь на 1 порядок. От части данный факт может быть обусловлен тем, что в отличие от жидкой среды в фарше бактериофагам входящим в биопрепарат значительно сложнее найти свою цель и эффект получается ограниченным.

Через 48 часов хранения, обработанных биопрепаратом и бактериями образцов, было отмечено более эффективное подавление бактериофагами целевых бактерий. Так при соотношении вносимых суспензии бактерий и биопрепарат 1 к 1 уже наблюдалось снижение микробной обсемененности. При этом при снижении количества биопрепарата по отношению к бактериальной суспензии не приводило к положительному результату.

Библиографический список:

1. Технический регламент Таможенного союза ТР ТС 021/2011 О безопасности пищевой продукции. Режим доступа: https://urfu.ru/fileadmin/user_upload/common_files/docs_units/oseb/TR_TS_021-2011_Tekhnicheskii_reglament_Tamozhennogo_sojuza_O_bezopasnosti_pishchevoi_produkcii.pdf
2. Технический регламент Евразийского экономического союза «О безопасности рыбы и рыбной продукции» (ТР ЕАЭС 040/2016). Режим доступа: <https://mosrst.ru/wp-content/uploads/2020/02/tr-eaes-040-2016.pdf?ysclid=luqv9na4fn176122471>
3. ГОСТ 31339-2006 Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Правила приемки и методы отбора проб. Режим доступа: https://www.testprom.ru/img_user/gosts/67/120/gost_31339-2006.pdf?ysclid=luqv9wurln849352004
4. Боровков М.Ф., Фролов В.П., Серко С.А. Ветеринарно-санитарная экспертиза с основами технологии и стандартизации продуктов животноводства. Учебник. – СПб: Издательство «Лань», 2008-448 с.
5. Доценко, В. А. Практическое руководство по санитарному надзору за предприятиями пищевой и перерабатывающей промышленности, общественного питания и торговли : В. А. Доценко. - 4-е изд., стер. - СПб. : ГИОРД, 2013. - 832 с
6. Золотухин С.Н. Создание и разработка схем применения диагностических биопрепаратов на основе выделенных и изученных бактериофагов энтеробактерий: автореф. дис. ... д-ра биол.наук / Ульяновск, 2007. 39 с.
7. Иконникова Н.В. Бактериофаги – вирусы бактерий: учеб. пособие // Минск: ИВЦ Минфина. 2017. 41 с.
8. Исабаев А. Ж. Ветеринарно-санитарная экспертиза продукции птицеводства. Учебно-методическое пособие по специальности 5В120200 - Ветеринарная санитария - Костанай, 2016. - 120 с.
9. Каттер Э., Сулакведзе А. Бактериофаги: биология и практическое // М.: Научный мир. 2012. 636 с.
10. Киселев Л. Ю. Основы технологии производства и первичной обработки продукции животноводства / Л. Ю. Киселев. - Москва : Лань, 2012.

11. Лысакова И.А. Ветеринарно-санитарная экспертиза сырья и продуктов животного и растительного происхождения. Лабораторный практикум: Учебное пособие. – 2-е изд., перераб. – СПб.: Лань, 2015.- 304 с.

12. Молофеева Н.И., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. Фагоидентификация бактерий *Escherichia coli* O157 // Инфекция и иммунитет, 2014. №5. С.98.

13. Arthur M.T., Kalchayanand N., Agga E.G., et al. Evaluation of bacteriophage application to cattle in lairage at beef processing plants to reduce *Escherichia coli* O157:H7. Prevalence on hides and carcasses. Foodborne Pathog Dis. 2017;14:17–22

14. Arthur, T.M., Barkocy-Gallagher, G.A., Rivera-Betancourt, M., Koohmaraie, M. Prevalence and characterization of non-O157 shiga toxin production *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants. Applied and Environmental Microbiology, 2002. 68, 4847–4852.

ASSESSMENT OF THE IMPACT OF A PHAGE BIOPREPARATION AND METHODS OF ITS APPLICATION FOR THE PURPOSE OF BIOPROCESSING MINCED MEAT

Khakimov N.T. Rodicheva A.N.

Keywords: *quality, bacteria, minced meat, E. coli, KMAFAnM, biosafety.*

The article presents the results of an assessment of the effect and rate of development of the E.coli in minced meat. A decrease in bacterial contamination occurs when the amount of a biological product exceeds the number of bacteria by 2 or more times, but at the same time a decrease was noted by only 1 order of magnitude. After 48 hours of storage, the samples treated with the biopreparation and bacteria were observed to be more effectively suppressed by bacteriophages of the target bacteria. Thus, with the ratio of the introduced suspension of bacteria and the biological product 1 to 1, a decrease in microbial contamination has already been observed. At the same time, with a decrease in the amount of the biopreparation in relation to the bacterial suspension, it did not lead to a positive result.