

РАЗРАБОТКА МЕТОДА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ БИОКОНВЕРСИИ МЯСА С ПРИМЕНЕНИЕМ ФАГОВОГО БИОПРЕПАРАТА

Наврузов М. Н., магистрант

Научный руководитель – Майоров П.С. к.б.н., доцент
ФГБОУ ВО Ульяновский ГАУ

Ключевые слова: качество, бактерии, бактериофаги, мясо, *E. coli*, КМАФАнМ, биопрепарат.

В статье представлены результаты разработки метода и оценки эффективности биоконверсии мяса с применением фагового биопрепарата. Установлена эффективность сконструированного фагового биопрепарата в отношении условно-патогенной микрофлоры, в то время как коммерческие фаговые биопрепараты в целом показали лучшие результаты на снижение показателя общего обсеменения мясного сырья.

Введение

В последнее время пищевая промышленность заинтересовалась поиском новых технологий обеззараживания. Бактериофаги - это бактериальные вирусы, которые обладают большим потенциалом для использования в качестве агентов биоконтроля в пищевых продуктах [9]. Они обладают рядом желаемых свойств, таких как специфичность к целевым бактериям, неспособность инфицировать клетки человека, способность к самовоспроизведению и самоограничению, а также повсеместное присутствие в природе, что делает их отличными инструментами для обеспечения безопасности пищевых продуктов. Концепция снижения содержания патогенных микроорганизмов в пищевых продуктах с помощью фагов в основном касалась сырого мяса и готовых к употреблению продуктов, а также обеззараживания туш [10].

В настоящее время существует ряд коммерческих фаговых препаратов против *Listeria monocytogenes*, сальмонелл, шигелл и

кишечной палочки, в которых фаги используются в качестве биоконсервантов пищевых продуктов [11]. Эффективность различных фаговых препаратов для инактивации различных патогенов пищевого происхождения, включая сальмонеллу, была изучена при предуборочной и послеуборочной обработке [12]. Исследования, появившиеся в научной литературе в последние годы, демонстрируют перспективность использования бактериофагов для предотвращения образования биопленок [14; 15]. Все эти исследования показывают, что литические бактериофаги могут быть эффективными агентами для биоконтроля патогенов пищевого происхождения в различных пищевых продуктах. [17].

В связи с этим целью исследования являлось разработка метода и оценка эффективности биоконверсии мяса с применением фагового биопрепарата.

В качестве целевого объекта наших исследований были использованы образцы говяжьего и куриного мяса.

Материалы и методы

В качестве объектов для исследования использовали образцы говяжьего и куриного мяса. Поскольку мясо в процессе хранения подвержено порче под воздействием очень широкого круга микроорганизмов, было принято решение использовать фаговый биопрепарат, оказывающий воздействие на санитарно-показательные микроорганизмы.

Для целей конструирования фагового биопрепарата в работе использовали 8 коллекционных бактериофагов, активных в отношении бактерий *E.coli*, *Salmonella* и *Enterobacter*.

Для изучения биологических свойств бактериофагов в работе использовали 8 штаммов бактерий вида *E.coli*, 4 штамма бактерий рода *Salmonella* и 6 штаммов бактерий рода *Enterobacter*

В работе были фаговые биопрепараты, представленные двумя коммерческими вариантами – секстафаг и пиофаг (рис.1), а также использовали биопрепарат собственной разработки.



Рис. 1. Коммерческие фаговые биопрепараты Секстафаг и Пιοфаг

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.

В работе применяли как общепринятые методы лабораторных исследований, так и разрабатывали собственные методы постановки экспериментов.

Выделение из объектов окружающей среды и изучение биологических свойств бактериофагов проводили по методикам С.Н. Золотухина, Э. Каттер. Для изучения литической активности использовали методы Аппельмана и Грациа [1-12]. Параметры постановки реакции нарастания титра фага для индикации бактерий *E. coli* определяли по методикам, опробованным сотрудниками кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновского ГАУ. Конструирование биопрепарата проводили по методу С.Н. Золотухина.

Инокуляция образцов фаговым препаратом

Кусочки мяса взвешивали ($30 \pm 0,5$ г) и обрабатывали фаговым биопрепаратом. Было поставлено несколько экспериментов с применением различного количества биопрепарата и целевого микроорганизма (1, 2, 3, 5 мл на один образец мяса). Контрольные образцы обрабатывали в отдельных случаях исключительно суспензией микроорганизмов, биопрепаратом или физ.раствором (для контроля естественной микрофлоры).

Для подсчета целевых микроорганизмов каждую 30-граммовую пробу добавляли в 270 мл 0,1%-ной пептонной воды и гомогенизировали в течение 2 минут. Аликвоты по 0,1 мл гомогената распределяли по поверхности МПА и среды Эндо, которые инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Выживаемость бактерий в обработанных и необработанных (контрольных) образцах определяли путем подсчета колониеобразующих единиц (КОЕ).

Результаты исследований

Были проведены эксперименты, посвященные определению эффективности применения фаговых биопрепаратов с целью биоконсервации мяса. Для обработки мяса применяли фаговый

препарат собственного производства, либо коммерческий вариант, в концентрации в пределах 10^8 БОЕ/мл и бактериальную суспензию из бактерий *E.coli*, *Enterobacter* и *Salmonella* в концентрации 10^8 КОЕ/мл. Общая схема эксперимента представлена на рисунке 1.

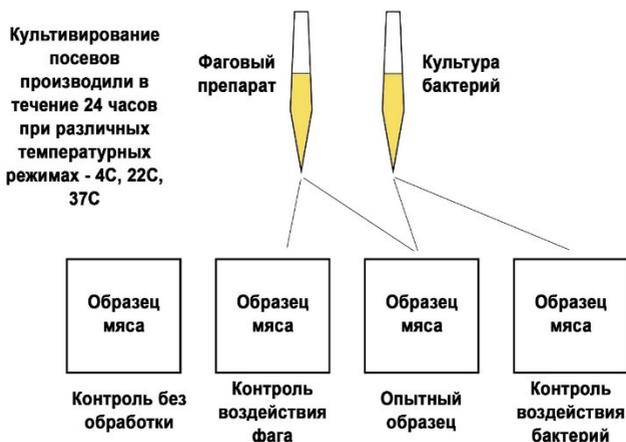


Рис. 1. Схема постановки эксперимента с воздействием на образцы мяса фагового биопрепарата

Эксперимент проводили в течение 8 суток с фиксацией результата каждые 2 суток. В первую очередь отмечали наличие роста целевой микрофлоры и показателя БГКП. Результаты проведенных экспериментов представлены в таблицах 13-15.

Из представленных в таблице данных видно, что в образцах мяса, подвергнутых обработке фаговым биопрепаратом собственной разработки, роста бактерий группы кишечная палочка отмечено не было. При этом в контрольных образцах рост данного показателя был отмечен только в образцах курятины на 8 сутки хранения. При искусственной контаминации исследуемых образцов мяса бактериальной суспензией наблюдался постепенный рост бактериальной обсемененности на протяжении всего эксперимента. При это после внесения в искусственно контаминированные образцы фагового биопрепарата отмечалось обратное, показатель БГКП

снижался в процессе хранения исследуемых образцов. Подавить данную группу бактерий полностью не удалось, однако наблюдалась устойчивая тенденция к снижению показателя БГКП.

Таблица 13. Изменение показателя БГКП в образцах мяса при обработке разработанным фаговым препаратом, КОЕ/г

Образец мяса	Время хранения, сут	Без обработки	Обработка биопрепаратом	Обработка культурой бактерий и биопрепаратом	Обработка культурой бактерий
Говядина, цельный образец	0	x	x	1x106	1x106
	2	x	x	3x105	3x106
	4	x	x	5x104	6x106
	6	x	x	9x103	8x106
	8	x	x	2x103	1x107
Говядина, кусковые образцы	0	x	x	1x106	1x106
	2	x	x	5x105	4x106
	4	x	x	9x104	7x106
	6	x	x	2x104	2x107
	8	x	x	5x103	7x107
Говядина, фарш	0	x	x	1x106	1x106
	2	x	x	6x105	6x106
	4	x	x	9x104	1x107
	6	x	x	3x104	6x107
	8	x	x	6x103	9x107
Курятина, цельный образец	0	x	x	1x106	1x106
	2	x	x	5x105	7x106
	4	x	x	8x104	1x107
	6	x	x	2x104	5x107
	8	x	x	6x103	9x107
Курятина, кусковые образцы	0	x	x	1x106	1x106
	2	x	x	4x105	8x106
	4	x	x	6x104	3x107
	6	x	x	1x104	9x107
	8	3x101	x	5x103	2x108
Курятина, фарш	0	x	x	1x106	1x106
	2	x	x	4x105	8x106
	4	x	x	8x104	4x107
	6	x	x	1x104	1x108
	8	1x102	x	5x103	5x108

x – не отмечалось роста

Таблица 13. Изменение показателя БГКП в образцах мяса при обработке биопрепаратом Секстафаг, КОЕ/г

Образец мяса	Время хранения, сут	Без обработки	Обработка биопрепаратом	Обработка культурой бактерий и биопрепаратом	Обработка культурой бактерий
Говядина, цельный образец	0	х	х	2×10^6	1×10^6
	2	х	х	8×10^5	4×10^6
	4	х	х	1×10^5	7×10^6
	6	х	х	6×10^4	9×10^6
Говядина, кусковые образцы	0	х	х	1×10^6	1×10^6
	2	х	х	9×10^5	3×10^6
	4	х	х	3×10^5	5×10^6
	6	х	х	8×10^4	1×10^7
Говядина, фарш	0	х	х	1×10^6	1×10^6
	2	х	х	9×10^5	5×10^6
	4	х	х	6×10^5	9×10^6
	6	х	х	1×10^5	2×10^7
Курытина, цельный образец	0	х	х	1×10^6	1×10^6
	2	х	х	8×10^5	5×10^6
	4	х	х	2×10^5	9×10^6
	6	х	х	7×10^4	3×10^7
Курытина, кусковые образцы	0	х	х	1×10^6	1×10^6
	2	х	х	7×10^5	6×10^6
	4	х	х	2×10^5	1×10^7
	6	х	х	7×10^4	8×10^7
Курытина, фарш	0	х	х	1×10^6	1×10^6
	2	х	х	8×10^5	9×10^6
	4	х	х	2×10^5	5×10^7
	6	х	х	6×10^4	2×10^8
	8	9×10^1	х	1×10^4	7×10^8

Результаты последующих экспериментов, проведенных с коммерческими фаговыми биопрепаратами, показали схожие результаты. Основным отличием от биопрепарата, сконструированного нами, было то, что наблюдалось менее активное снижение показателя БГКП в случае обработки образцов мяса бактериальной суспензией и биопрепаратом. В образцах мяса без искусственной контаминации также отмечался рост бактерий БГКП только в последний день

эксперимента в образцах мясного фарша. В контрольном образце, искусственно контаминированном бактериальной суспензией и без внесения биопрепарата наблюдался постепенный рост показателя БГКП. В процессе эксперимент росту сопутствующей микрофлоры внимания не уделяли. По окончанию выдержки мяса дополнительно был определено только общее микробное число.

Таблица 14. Изменение показателя БГКП в образцах мяса при обработке биопрепаратом Пиофаг, КОЕ/г

Образец мяса	Время хранения, сут	Без обработки	Обработка биопрепаратом	Обработка культурой бактерий и биопрепаратом	Обработка культурой бактерий
Говядина, цельный образец	0	x	x	2×10^6	1×10^6
	2	x	x	7×10^5	5×10^6
	4	x	x	2×10^5	8×10^6
	6	x	x	7×10^4	9×10^6
	8	x	x	2×10^4	1×10^7
Говядина, кусковые образцы	0	x	x	1×10^6	1×10^6
	2	x	x	8×10^5	4×10^6
	4	x	x	4×10^5	7×10^6
	6	x	x	9×10^4	2×10^7
	8	x	x	3×10^4	6×10^7
Говядина, фарш	0	x	x	1×10^6	1×10^6
	2	x	x	8×10^5	4×10^6
	4	x	x	5×10^5	8×10^6
	6	x	x	1×10^5	3×10^7
	8	x	x	7×10^4	8×10^7
Курытина, цельный образец	0	x	x	1×10^6	1×10^6
	2	x	x	8×10^5	4×10^6
	4	x	x	3×10^5	8×10^6
	6	x	x	9×10^4	3×10^7
	8	x	x	5×10^4	9×10^7
Курытина, кусковые образцы	0	x	x	1×10^6	1×10^6
	2	x	x	8×10^5	7×10^6
	4	x	x	3×10^5	1×10^7
	6	x	x	8×10^4	7×10^7
	8	1×10^1	x	4×10^4	2×10^8
Курытина, фарш	0	x	x	1×10^6	1×10^6
	2	x	x	9×10^5	8×10^6
	4	x	x	4×10^5	6×10^7
	6	x	x	9×10^4	1×10^8
	8	9×10^1	x	4×10^4	7×10^8

x – не отмечалось роста

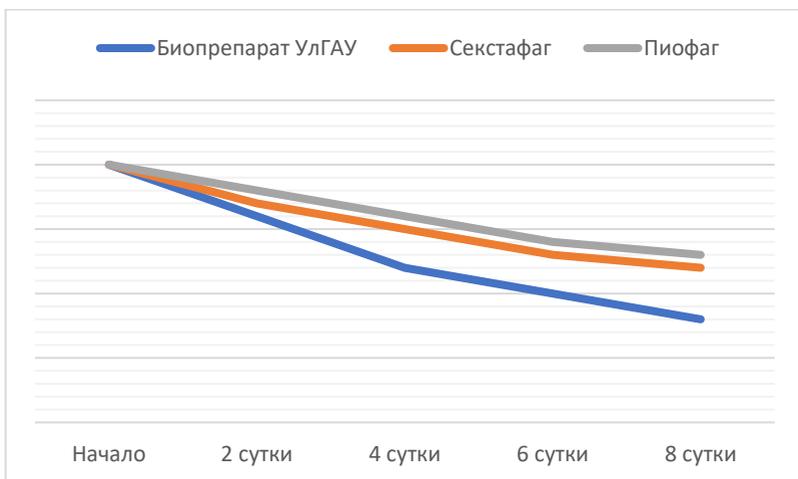


Рис. 11. Динамика снижения показателя БГКП в образцах говядины

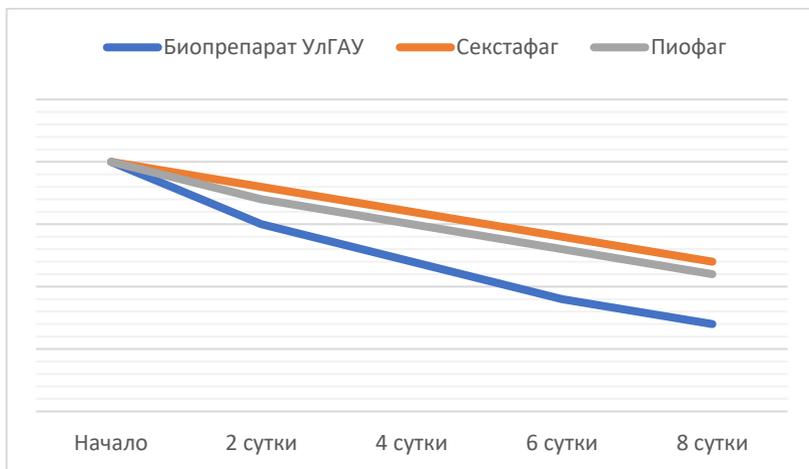


Рис. 12. Динамика снижения показателя БГКП в образцах курятины

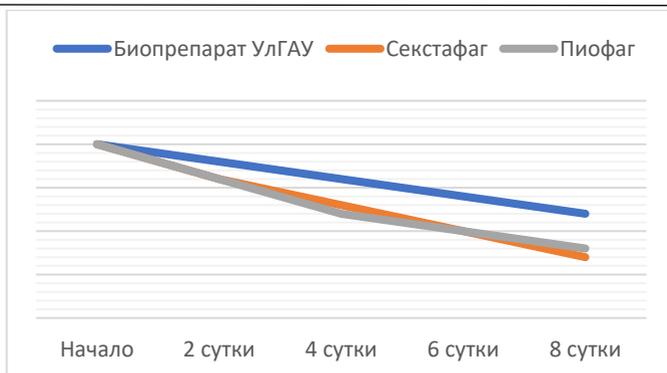


Рис. 13. Динамика снижения показателя КМАФАнМ в образцах говядины

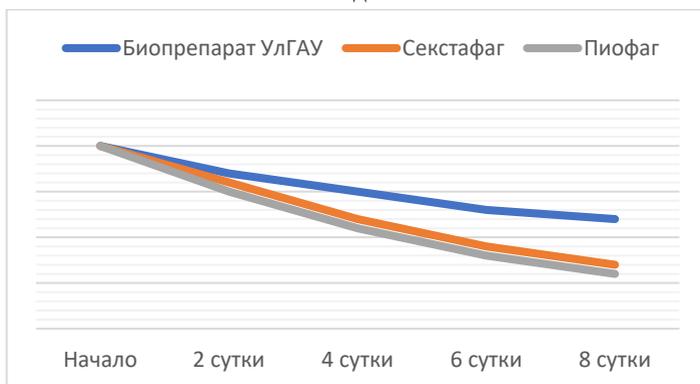


Рис. 14. Динамика снижения показателя КМАФАнМ в образцах курятины

Можно отметить, что коммерческие биопрепараты оказали лучшее влияние на показатель общего микробного обсеменения образцов мяса, в то время как разработанный нами биопрепарат был более эффективен в отношении условно-патогенной микрофлоры.

Заключение

Результаты проведенных исследования показали эффективность сконструированного фагового биопрепарата в отношении условно-патогенной микрофлоры, в то время как коммерческие фаговые биопрепараты в целом показали лучшие результаты на снижение

показателя общего обсеменения мясного сырья. Таким образом установлена эффективность фаговых биопрепарат в целях биоконсервации мясного сырья. Однако требуются дополнительные исследования для установления параметров применения фаговых биопрепаратов с целью биоконсервации отдельных видов мясной продукции.

Библиографический список:

1. Перспективы применения бактериофагов рода *Bacillus* / Н. А. Феоктистова, Д. А. Васильев, А. В. Меркулов [и др.] // Настоящее и будущее биотехнологии в решении проблем экологии, медицины, сельского, лесного хозяйства и промышленности : Научно-практический семинар с международным участием, Ульяновск, 18–20 мая 2011 года / Под общей редакцией В.В. Гулий, Л.К. Каменек. – Ульяновск: Ульяновский государственный университет, 2011. – С. 136–139. – EDN SFIDJB.

2. Характеристика бактериофагов бактерий *Enterobacter* spp. для оценки возможностей их использования в составе терапевтического биопрепарата / Е. В. Сульдина, Д. А. Васильев, Н. А. Феоктистова, А. В. Мاستиленко // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. – № 1(41). – С. 109–115. – DOI 10.18286/1816-4501-2018-1-109-115. – EDN YWXBAF.

3. Биологические особенности протейных бактериофагов / Н. А. Феоктистова, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – № 6. – С. 257. – EDN YNXZGF.

4. Биотехнологические параметры конструирования биопрепарата на основе фагов для индикации и идентификации *Bacillus subtilis* в пищевом сырье и продуктах питания / Н. А. Феоктистова, М. А. Лыдина, Д. А. Васильев [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 518. – EDN XIBMMX.

5. Васильев, Д. А. Выделение бактериофагов бактерий рода *Listeria* / Д. А. Васильев, Е. Н. Ковалева, Е. В. Сульдина // Инфекция и иммунитет. – 2014. – Т. 4, № 5. – С. 69–70. – EDN TGCHHX.

6. Выделение бактериофагов *Listeria monocytogenes* методом индукции / Е. Н. Ковалева, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин [и др.] //

Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013. – № 1(21). – С. 45-48. – EDN QAUUPX.

7. Ковалева, Е. Н. Разработка системы фаготипирования листерий / Е. Н. Ковалева, Д. А. Васильев, Е. В. Сульдина // Инфекция и иммунитет. – 2014. – Т. 4, № S. – С. 87-88. – EDN TG CXNV.

8. Конструирование бактериофагового препарата для биоконтроля *Pseudomonas syringae* в растениеводстве / Д. А. Васильев, А. К. Беккалиева, Н. А. Феоктистова, Е. В. Сульдина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. – № 2(50). – С. 130-137. – DOI 10.18286/1816-4501-2020-2-130-137. – EDN AQLLRB.

9. Разработка биотехнологических параметров создания бактериофаговых биопрепаратов для деконтаминации микрофлоры, вызывающей порчу пищевого сырья животного происхождения и мясных, рыбных, молочных продуктов(биопроессинг) / Д. А. Васильев, Н. А. Феоктистова, А. В. Алешкин [и др.]. – Ульяновск : Ульяновский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина, 2019. – 450 с. – ISBN 978-5-6041036-6-1. – EDN EIZJSZ.

10. Разработка метода фагоиндикации бактерии *Pseudomonas syringae* в объектах санитарного надзора / Н. А. Феоктистова, А. К. Беккалиева, Д. А. Васильев, Е. В. Сульдина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2020. – № 3(51). – С. 148-157. – DOI 10.18286/1816-4501-2020-3-148-157. – EDN GJKYYU.

11. Молекулярно-генетическая характеристика бактериофага *Bacillus cereus* FBC - 28 УГСХА / Н. А. Феоктистова, Д. А. Васильев, А. В. Мастиленко, Е. В. Сульдина // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. – № 2(42). – С. 216-222. – DOI 10.18286/1816-4501-2018-2-216-222. – EDN XREQLJ.

12. Выделение, изучение основных биологических свойств бактериофага *Bacillus anthracis* и конструирование на его основе экспериментального биопрепарата / Н. А. Феоктистова, Д. А. Васильев, С. Н. Золотухин [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5. – С. 312. – EDN WWVJQJ.

**DEVELOPMENT OF A METHOD AND EVALUATION OF THE
EFFECTIVENESS OF MEAT BIOCONVERSION USING A PHAGE
BIOPREPARATION**

Navruzov M.N.
FSBEI HE Ulyanovsk SAU

Keywords: *quality, bacteria, bacteriophages, meat, E. coli, KMAFAnM, biological product.*

The article presents the results of the development of a method and evaluation of the effectiveness of meat bioconversion using a phage biopreparation. The effectiveness of the designed phage biopreparation against conditionally pathogenic microflora was established, while commercial phage biopreparations generally showed the best results in reducing the total contamination of meat raw materials.