На правах рукописи

ЗАЙКО ЕЛЕНА ВИКТОРОВНА

ОЦЕНКА И УПРАВЛЕНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМИ РИСКАМИ ПРИ ПРОИЗВОДСТВЕ СЫРОКОПЧЕНЫХ КОЛБАСНЫХ ИЗДЕЛИЙ, ВОЗНИКАЮЩИХ ПРИ НАЛИЧИИ В МЯСЕ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Специальности 05.18.04 – технология мясных, молочных и рыбных продуктов и холодильных производств

05.02.23 – стандартизация и управление качеством продукции

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» Российской академии наук.

Научные руководители:	доктор технических наук **Кузнецова Оксана Александровна** кандидат технических наук, доцент **Батаева Дагмара Султановна**
Официальные оппоненты	**Абдуллаева Асият Мухтаровна** доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Московский Государственный Университет пищевых производств», кафедра Ветеринарно-санитарная экспертиза и биологическая безопасность, профессор **Волошина Елена Сергеевна** кандидат технических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Российского государственного аграрного университета – МСХА имени К.А. Тимирязева», кафедра Управления качеством и товароведение продукции, доцент
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления»

Защита диссертации состоится «27» сентября 2022 г. в 13.00 ч. на заседании диссертационного совета Д 006.021.02 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М. Горбатова» Российской академии наук по адресу: 109316, Москва, ул. Талалихина, д. 26.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН www.vniimp.ru

Автореферат разослан «____» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат технических наук, А.Н. Захаров
старший научный сотрудник

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. На сегодняшний день отсутствует эффективная система управления рисками, возникающими при производстве пищевых продуктов с использованием мясного сырья с антибиотиками. Известно несколько тысяч разнообразных натуральных и синтетических веществ, применяемых в качестве антибиотиков. Однако методы контроля в пищевых продуктах разработаны для ограниченного списка этих веществ.

В мясной промышленности существуют технологии производства мясных продуктов, которые предполагают использование микроорганизмов стартовых культур, например сырокопченые колбасы. Как известно, антибиотики подавляют рост и развитие различных микроорганизмов, в том числе входящих в состав стартовых культур. Это особо актуально при производстве сырокопченых колбас. Подавление антибиотиками роста стартовых культур с последующим снижением ферментативной активности может привести к неконтролируемому процессу производства колбас.

Таким образом, исследования, направленные на идентификацию и оценку рисков при производстве сырокопченых колбас из мяса с остаточными количествами антимикробных веществ, являются актуальными.

Степень разработанности. Отдельные этапы настоящей диссертационной работы выполнены в рамках плана НИР ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН «Разработать систему оценки, управления, предупреждающих действий микробиологическими рисками, возникающими при производстве сырокопченых колбас при наличии антимикробных веществ в мясном сырье и в ингредиентах» (№ 0585-2014-0005) к государственному заданию и в рамках проекта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации «Фундаментальные исследования перемещений патогенных микроорганизмов и вирусов в пищевых системах и создание инновационных средств их предотвращения с использованием антимикробных материалов и физических методов

воздействий на биологические объекты» (Соглашение № 075–15–2020–775) 2020-2022 годы.

Методология разработки метода основана на работах: Батаевой Д.С., Куликовского А.В., анализ рисков – на работах: Чернухи И.М., Кузнецовой О.А., Кузлякиной Ю.А.

Цель и задачи исследований

Цель работы состоит в идентификации, оценке и управлении рисками, возникающими при производстве сырокопченых колбасных изделий при наличии в мясе антибиотиков.

Задачи:

1. Изучить чувствительность микробиологического метода для расширения возможности выявления различных групп антибиотиков в продуктах убоя животных.

2. Провести оценку мяса и фарша для сырокопченых колбас на наличие антимикробных веществ с идентификацией преобладающих групп.

3. Идентифицировать патогенные микроорганизмы в мясе и фарше для сырокопченых колбас. Определить состав сообщества микроорганизмов фарша для сырокопченых колбас с помощью метагеномного анализа.

4. Изучить чувствительность к антибиотикам выявленных патогенных микроорганизмов *(Salmonella* spp.*, Listeria monocytogenes*).

5. Изучить влияние антибиотиков на формирование качества и безопасности сырокопченых колбас.

6. Идентифицировать, оценить и разработать схему управления рисками. Оценить мероприятия по управлению рисками.

Научная новизна

Определен фенотипический профиль антибиотикоустойчивости патогенных микроорганизмов, выделенных из мяса, поступающего для производства сырокопченой мясной продукции.

Установлен уровень контаминированного антибиотиками мяса, поступающего на переработку, и идентифицированы их группы.

Определен состав бактериального сообщества фарша сырокопченых колбас методом метагеномного секвенирования.

На базе методологии FMEA проведен анализ видов, последствий и причин несоответствий, возникающих на этапах производства сырокопченых колбас, в случае присутствия антибиотиков в мясе.

Проведена идентификация и оценка рисков, возникающих при присутствии антибиотиков в мясе, используемом для производства сырокопченых колбас, и разработаны управляющие мероприятия.

Теоретическая и практическая значимость работы

Описан характер органолептических и физико-химических изменений сырокопченой продукции в случае ее производства из мяса с антибиотиками.

Внесены изменения в проект ГОСТ 55481 «Мясо и мясные продукты. Качественный метод определения остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ».

Разработан СТО 00419779-012-2022, в котором представлены методы отбора проб и методика быстрого выявления антибиотиков при входном контроле мяса.

Методология и методы исследования. Использованы общепринятые, стандартизованные и исследовательские методы.

Степень достоверности и апробация работы. Основные положения и результаты работы представлены и доложены на научной конференции: Международной конференции Food quality and food safety («Качество и безопасность продуктов питания») (Москва, 2021); 61 The International Meat Industry Conference MEATCON 2021 (Zlatibor, Serbia 2021).

Публикации. Основное содержание диссертации опубликовано в 15 печатных работах, в т.ч. 6 статьях в журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки РФ и 4 статьи в международных изданиях наукометрических базах Scopus and Web of Sciense.

Структура и объем диссертационной работы

Диссертация состоит из 3-х глав, в т.ч. введения, аналитического обзора информационных источников, методологической части, результатов собственных исследований, а также выводов, списка использованных информационных источников и приложений. Основное содержание изложено на 161 стр. и включает 34 таблицы и 42 рисунка, 2 приложения на 14 стр., списка цитируемой литературы из 95 наименований.

Содержание работы

Во **введении** обоснованы актуальность и целесообразность проводимой работы, сформулирована цель и задачи исследований.

В **литературном обзоре** представлен анализ отечественных и зарубежных источников по объемам использования антибиотиков в животноводстве. Изучены критерии оценки качества и безопасности сырокопченых колбас. Проанализирована проблема формирования устойчивости микроорганизмов к антибиотикам.

Во **второй главе** «Экспериментальная часть» представлены характеристики объектов исследований, организация и схема выполнения работы. Работа проводилась по схеме, представленной на рис. 1.

Объектами исследования являлись:

1) При изучении чувствительности микробиологического метода – 35 антибиотиков (Sigma Aldrich, Германия) в концентрациях (МДУ) согласно ТР ТС 034/2013 и выше.

2) Для оценки на наличие антибиотиков – мясо, используемое при производстве сырокопченых колбас: свинина (жилованная нежирная и полужирная, грудинка), говядина (жилованная высшего и первого сорта), мясо птицы (филе грудки); фарш до внесения не мясных ингредиентов.

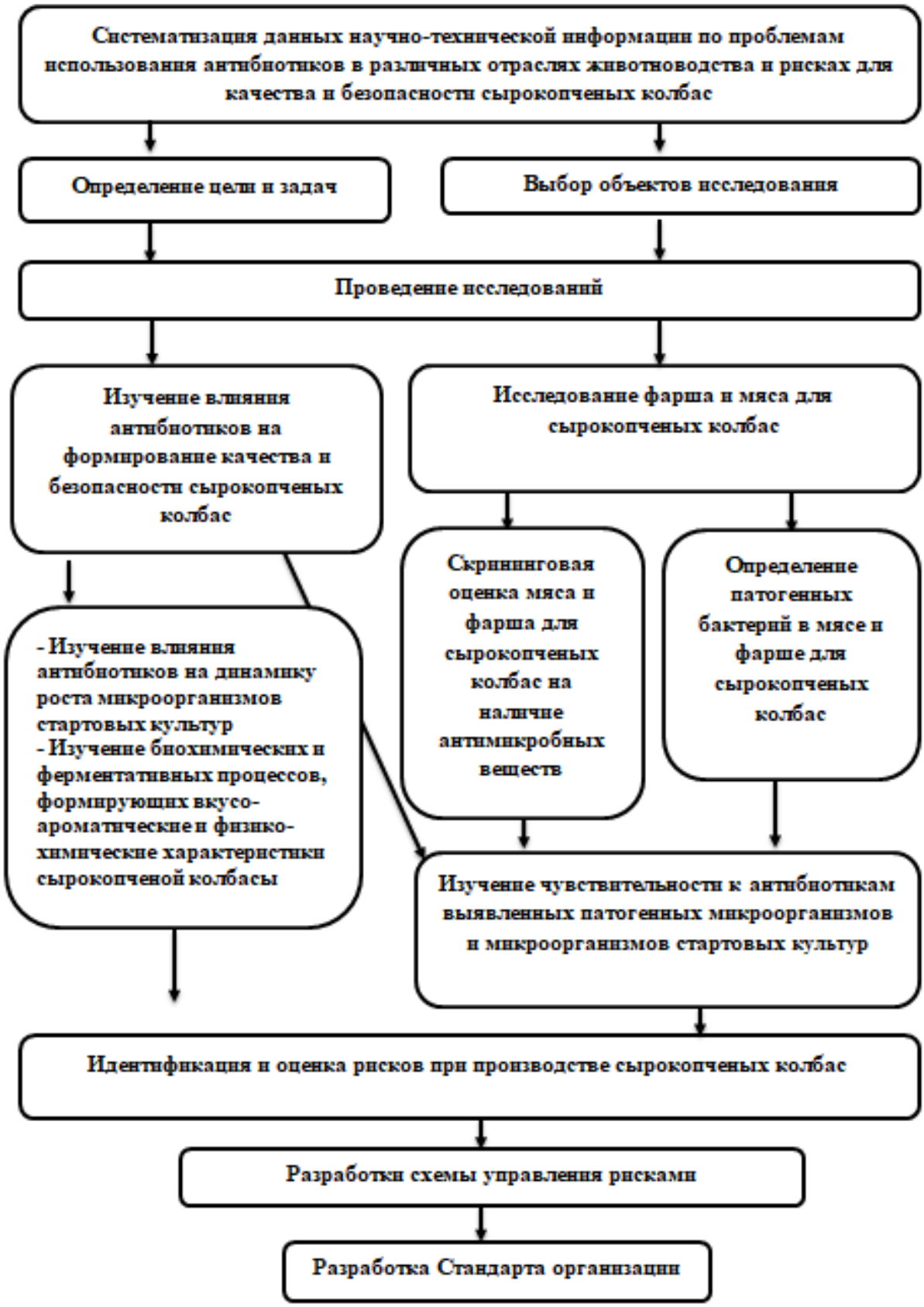


Рисунок 1 – Схема диссертационного исследования

3) Для идентификации групп антибиотиков – образцы мяса положительные на наличие антимикробных веществ качественным методом.

4) Для выявления патогенных бактерий (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*): свинина (жилованная нежирная и полужирная, грудинка), говядина (жилованная высший и первый сорт), мясо птицы (филе грудок куриных) и фарш (из говядины, свинины, мяса птицы).

5) При изучении состава микробного сообщества – образцы фарша до внесения стартовой культуры.

6) При оценке чувствительности к антибиотикам – микроорганизмы *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes*, выделенные из мяса птицы и фарша, а также 32 штамма *Salmonella* spp., выделенные из пищевых продуктов.

7) Для оценки чувствительности к антибиотикам – микроорганизмы стартовых культур: *Staphylococcus carnosus* (7 шт.), *Lactobacillus sakei* (4 шт.), *Staphylococcus xylosus* (5 шт.), *Lactobacillus plantarum* (1 шт.), *Lactobacillus curvatus* (1 шт.).

8) При изучении влияния антибиотиков на динамику роста микроорганизмов стартовых культур: гентамицин 0,05 мкг/см^3, амоксициллин 0,05 мкг/см^3, неомицин 0,5 мкг/см^3, стрептомицин 0,5 мкг/см^3 и микроорганизмы *Staphylococcus carnosus* (L-2), *Lactobacillus sakei* (L-18), *Staphylococcus xylosus* (L-8), *Lactobacillus plantarum* (L-20).

9) При изучении влияния антибиотиков на снижение pH микроорганизмами стартовых культур: стрептомицин 0,5 мкг/см^3, амоксициллин 0,05 мкг/см^3, неомицин 0,5 мкг/см^3, канамицин 0,1 мкг/см^3, гентамицин 0,05 мкг/см^3 и микроорганизмы *Lactobacillus plantarum* (L-20) и *Lactobacillus sakei* (L-18).

10) Для изучения влияния антибиотиков на процесс ферментации: неомицин (0,5 мг/кг) и модельные образцы ($К_1$-$К_6$), приготовленные согласно СТО 00419779-002-2013 «Метод ускоренного тестирования технологических свойств стартовых культур».

11) Для апробации СТО 00419779-012-2022 – образцы сырокопченых колбас, выработанные из мяса с антибиотиками.

В **третьей главе** «Результаты исследований и их обсуждение» приведены полученные экспериментальные данные.

Изучение чувствительности микробиологического метода для расширения возможности выявления различных групп антибиотиков в продуктах убоя животных

Для расширения возможности использования микробиологического скринингового метода для мониторинга мяса на наличие антибиотиков на первом этапе была проведена работа по оценке чувствительности метода ГОСТ Р 55481-2013. Из протестированных 35 антибиотиков, была установлена чувствительность метода к 22 антибиотикам на максимально допустимом уровне (МДУ) согласно приложению 5 ТР ТС 034/2013. Антибиотики представлены такими классами, как цефалоспорины, антибиотики тетрациклиновой группой, пенициллиновой группы, а также аминогликозиды, нитрофураны и линкозамиды (рис. 2).

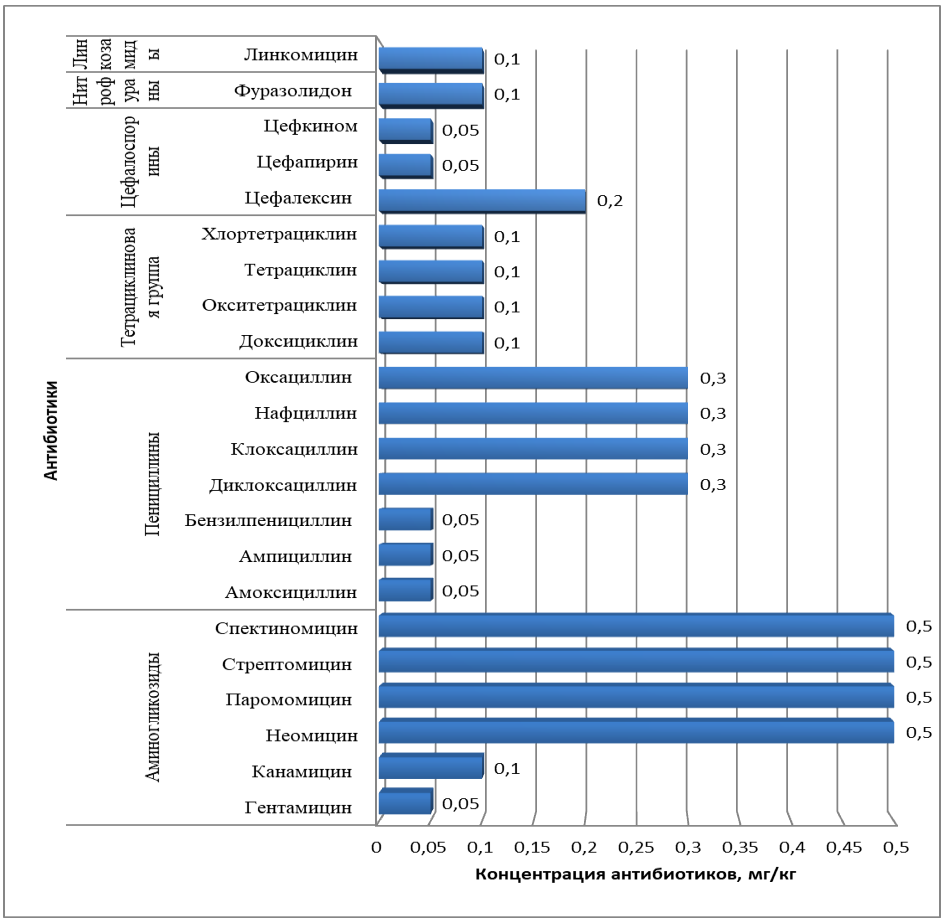


Рисунок 2 – Результаты исследования ингибирования роста спор *Geobacillus stearothermophilus* (более 2 мм) антибиотиками различных групп на уровне МДУ

Антибиотики, которые не проявили ингибирующую способность в концентрациях МДУ, были исследованы в концентрациях, превышающих МДУ. Были установлены следующие ингибирующие рост спор *Geobacillus stearothermophilus* концентрации антибиотиков: данофлоксацин 4 мг/кг, марбофлоксацин 3 мг/кг, ципрофлоксацин 3 мг/кг, тилозин 0,2 мг/кг, тилмикозин 5 мг/кг, спирамицин 20 мг/кг, вальнемулин 0,5 мг/кг, тиамулин 10 мг/кг, тиамфеникол 5 мг/кг, триметоприм 0,2 мг/кг, бацитрацин 3 мг/кг, колистин 15 мг/кг, флорфеникол 20 мг/кг.

Было установлено, что качественным микробиологическим методом можно выявить в мясе, в т.ч. мясе птицы, 14 групп антибиотиков одновременно.

Оценка мяса и фарша для сырокопченых колбас на наличия антимикробных веществ

На следующем этапе был определен уровень контаминированного антимикробными веществами мяса, используемого для производства сырокопченых колбас. Образцы отбирали на протяжении трех лет с 2018 по 2020 годы. Ранжирование проб проводилось по виду сырья: свинина, говядина, мясо птицы, а для фарша по виду сырья – в составе: фарш из свинины, фарш из говядины и фарш из мяса птицы.

В результате было установлено, что 25,3 % (n = 74) образцов свинины, 18,4 % образцов говядины (n = 102) и 29,4 % мясо птицы (n = 79) контаминировано антимикробными веществами, что составляет 22,8 % всего исследованного мяса. Результаты представлены на рис. 3.

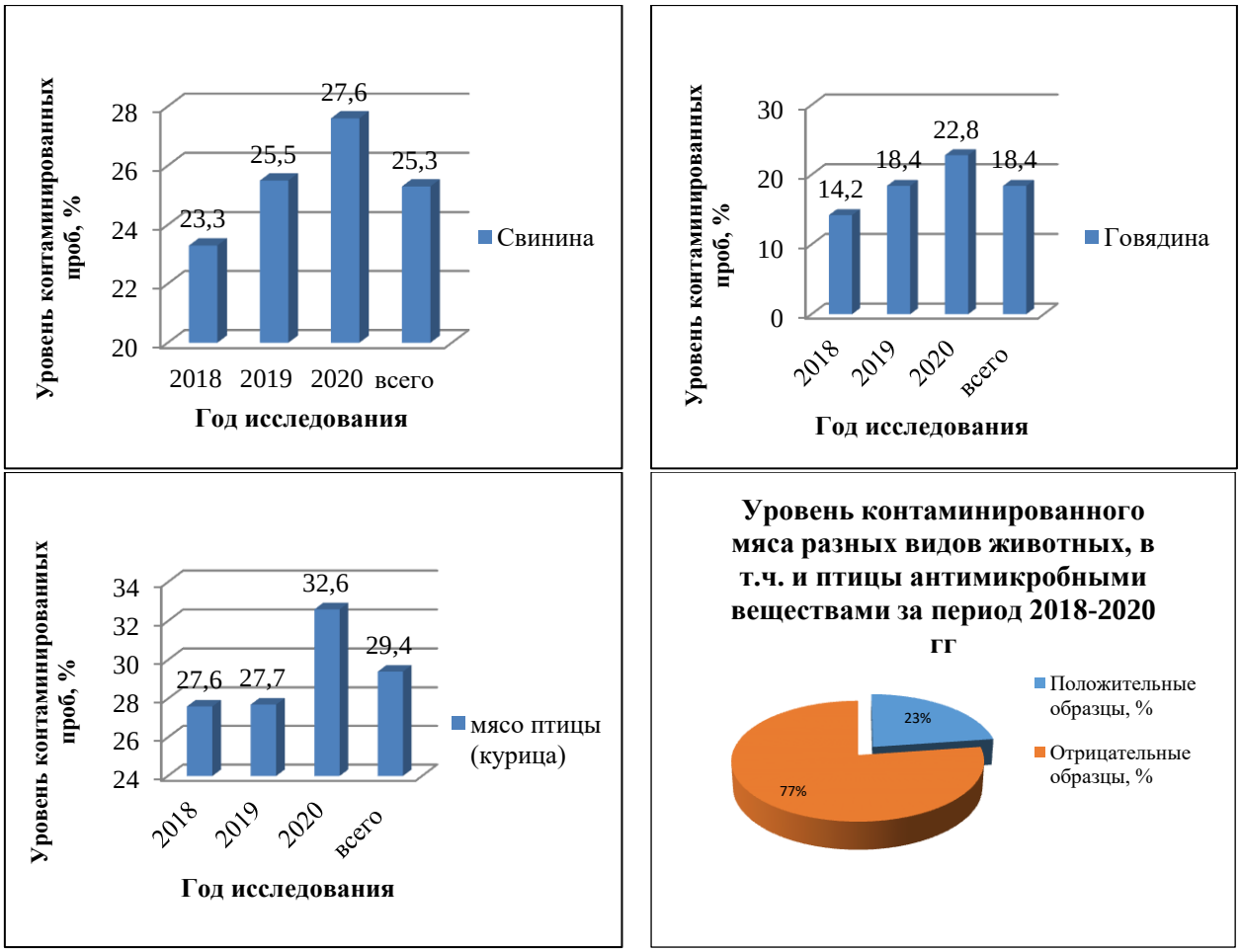


Рисунок 3 – Динамика изменения уровня контаминированного мяса, используемого для производства сырокопченых колбас, антимикробными веществами с 2018 по 2020 гг.

Результаты исследования образцов фарша сырокопченых колбас на наличие остаточных количеств антимикробных веществ представлены на рис. 4.

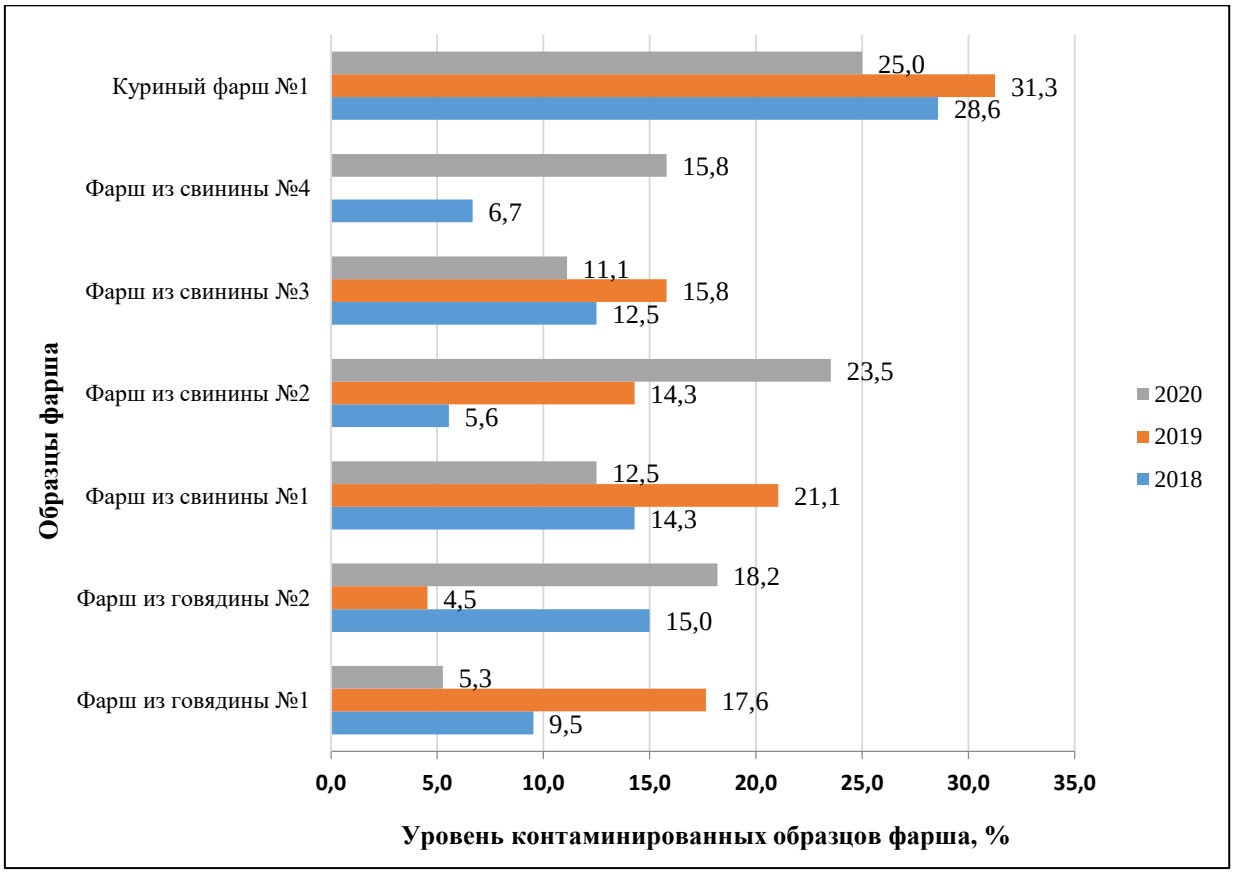


Рисунок 4 – Динамика изменения контаминации фарша, используемого для производства сырокопченых колбас, антимикробными веществами в период с 2018 по 2020 гг.

Установлено, что на производство сырокопченых колбас поступает до 23 % контаминированного антибиотиками мяса разных видов убойных животных, в т.ч. и птицы.

Результаты идентификации групп антибиотиков, выявленных в мясе и фаршах

Для установления групповой принадлежности антибиотиков, обнаруженных в мясе, все положительные образцы были проанализированы на проточно-цитометрическом анализаторе Beadyplex. В нашей стране эта методика была впервые апробирована в рамках данной диссертационной работы.

Полученные данные по выявленным в мясе с 2018 по 2020 год группам антибиотиков представлены на рис. 5.

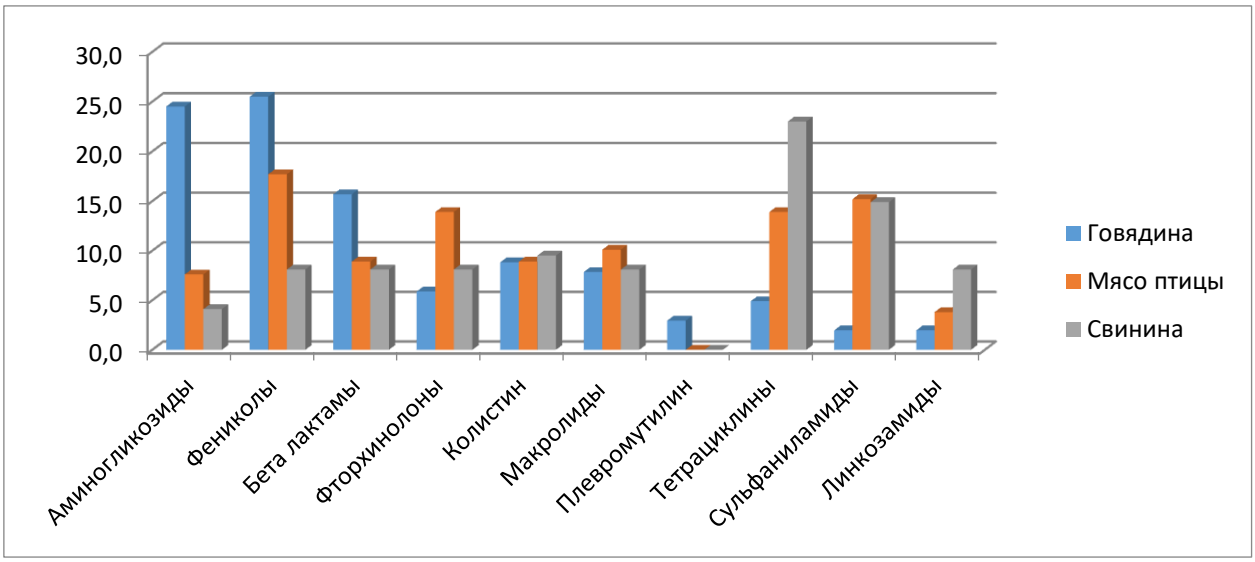


Рисунок 5 – Перечень групп антибиотиков, выявленных в мясе с 2018 по 2020 гг.

Установлено, что аминогликозиды, фениколы и бета-лактамы занимали лидирующие позиции по частоте обнаружения в говядине. Выявляемость аминогликозидов составляла 24,5 %, фениколов – 25,5 %, а бета-лактамов – 15,7 %. Частота обнаружения колистина (полипептидные антибиотики) составила 8,8 %, макролидов – 7,8 %, фторхинолонов – 5,9 %, а тетрациклиновой группы – 4,9 %. Наименее часто образцы были контаминированы сульфаниламидами и линкозамидами по 2,0 % каждым антибиотиком.

В образцах говядины установили присутствие всех 10 групп антибиотиков, тестируемых набором BEADYPLEX KIT187.

В образцах свинины наиболее часто идентифицировались тетрациклины – 23,0 %, сульфаниламиды – 14,9 % и колистин – 9,5 %. Бета-лактамы, фторхтнолоны, макролиды, линкозамиды и фениколы были обнаружены в равной степени по 8,1 % в исследованных образцах. Наименее распространенной группой антибиотиков являлись аминогликозиды – 4,1 %. Плевромутилины обнаружены не были. Таким образом, в свинине было установлено наличие 9 групп антибиотиков.

В образцах мяса птицы наиболее часто встречались фениколы – 16,2 %, сульфаниламиды и тетрациклиновая группа по 14,7 %. Фторхинолоны и макролиды содержались 13,9 и 10,1 % соответственно. Бета лактамы и колистин (полипептидные антибиотики) содержались в равных долях по 8,9 % каждого антибиотика. Аминогликозиды были обнаружены в 7,6 % образцов и менее распространенной группой в мясе птицы были линкозамиды. Они были выявлены в 3,8 % исследованных образцов. Плевромутилины обнаружены не были. В мясе птицы было установлено наличие 9 групп антибиотиков.

В фарше наиболее часто идентифицировали антибиотики тетрациклиновой группы – 20,0 % (рис. 6).

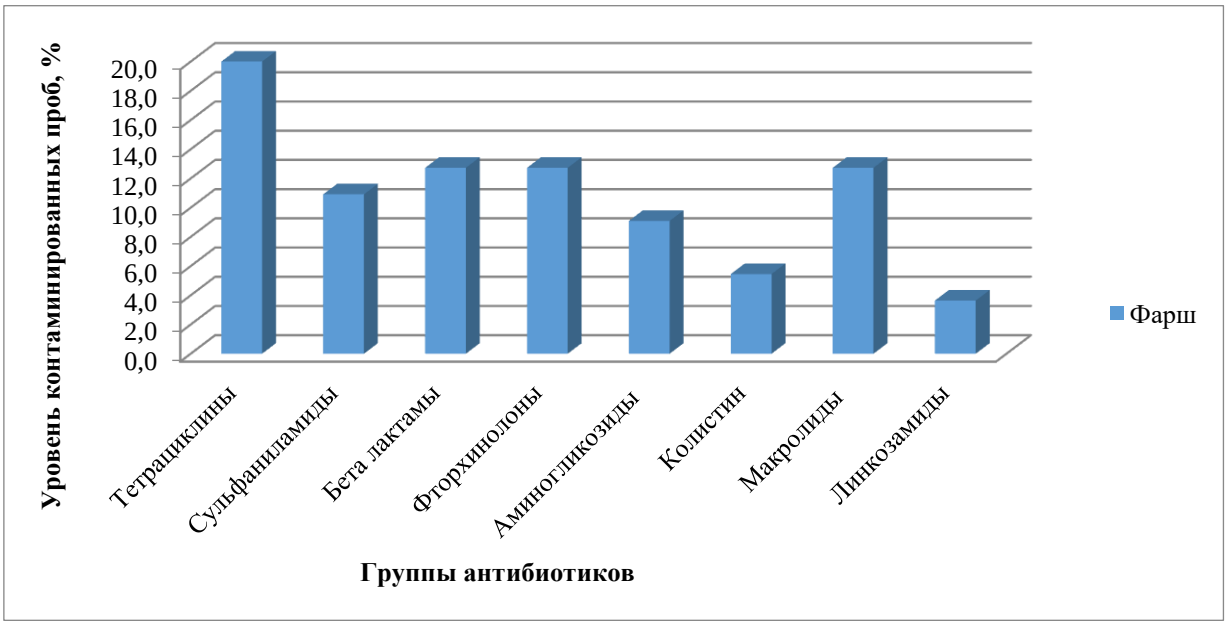


Рисунок 6 – Группы антибиотиков, выявленные в фарше за 2018-2020 гг.

Макролиды, бета-лактамы и фторхинолоны были представлены в образцах в равных количествах по 12,7 %, сульфаниламиды и аминогликозиды – по 10,9 и 9,1 % соответственно. В небольшом количестве образцов был идентифицирован колистин (полипептидные антибиотики) – 5,5 %. Менее распространенной группой в образцах фарша были линкозамиды. Они были выявлены в 3,6 % исследованных образцах. Плевромутилины обнаружены не были. Таким образом, установлено наличие в фарше 9 групп антибиотиков.

Использование нового метода идентификации антибиотиков в мясе и фарше с помощью проточного цитометра NovoCyte (ACEA Biosciences и Unisensor, США) с программным обеспечением BeadyExpress и тест-системы BEADYPLEX. позволило выявить 9 групп антибиотиков за счет единой пробоподготовки. Данные, полученные с использованием этого подхода, ценны и представляют научную значимость.

Идентификация патогенных микроорганизмов в мясе и фарше для сырокопченых колбас. Изучение состава микробного сообщества фарша для сырокопченых колбас с помощью метагеномного анализа

На следующем этапе была проведена работа по идентификации микробного сообщества мяса и фарша, используемого для производства сырокопченых колбас, которая включала в себя идентификацию патогенных микроорганизмов и установление метагеномного профиля с помощью секвенирования гена 16S.

Уровень обсемененного мяса бактериями рода *Salmonella* составил 9,9-11,4 % в период с 2018 по 2020 годы. При этом больше всего бактерией *Salmonella* spp. до 20 % в 2019 году было выявлено в мясе птицы (рис. 7).

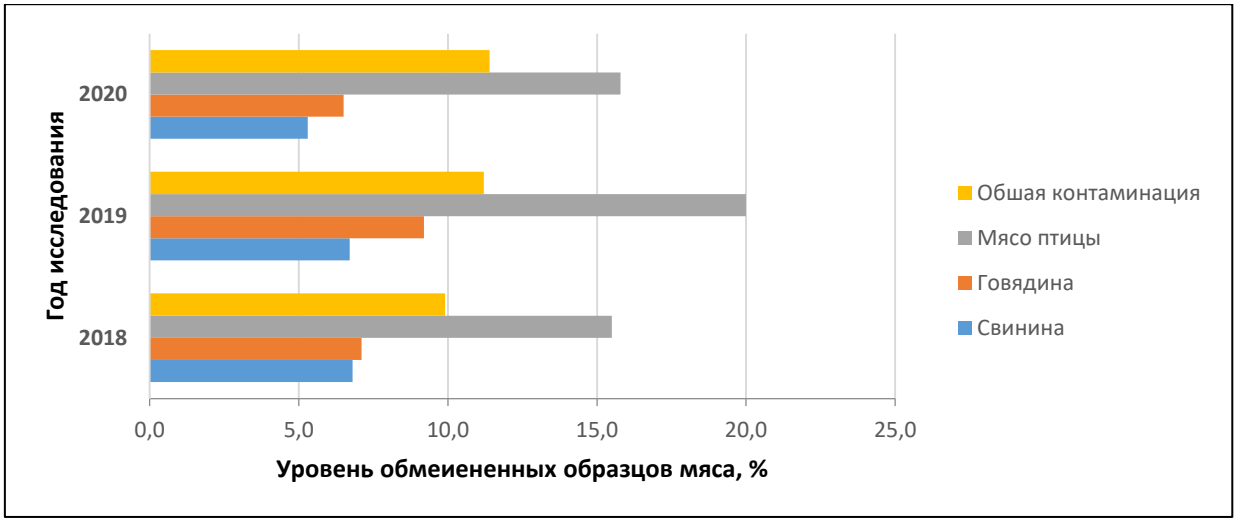


Рисунок 7 – Динамика выявляемости бактерий рода *Salmonella* в мясе для производства сырокопченых колбас в период с 2018 по 2020 гг.

В течение трех лет среди исследованных образцов мяса птицы этим патогеном было обсеменено не менее 15 % проб. По полученным данным

5,3-6,8 % свинины и 6,5-9,2 % говядины исследованных образцов содержали сальмонеллы.

При исследовании фарша уровень контаминированных проб за три года среди всех исследованных образцов составил 12,8-13,2 % (рис. 8).

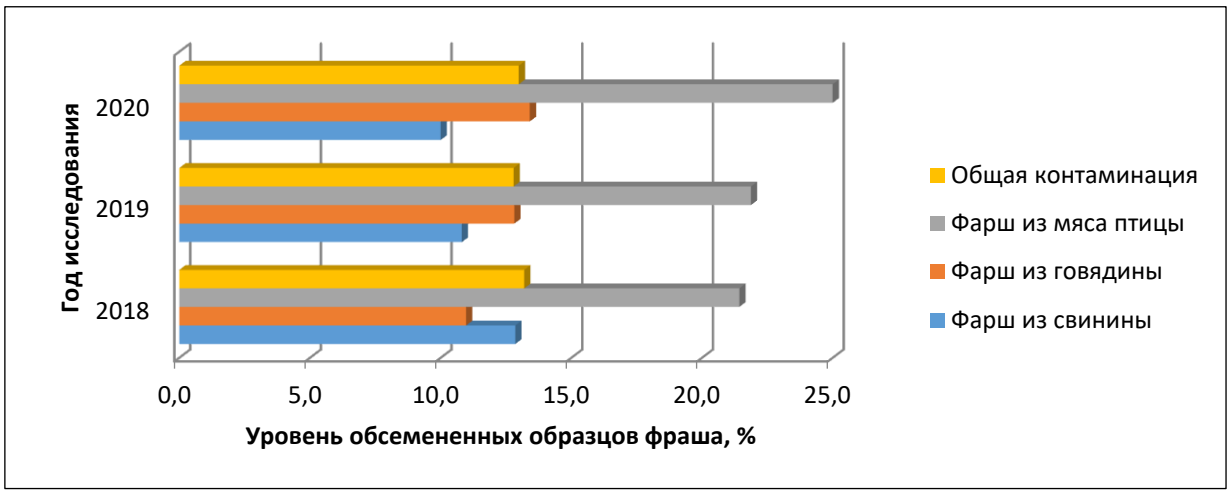


Рисунок 8 – Динамика выявляемости бактерий рода *Salmonella* в фарше для сырокопченых колбас в период с 2018 по 2020 годы

Тенденция высокой обсемененности мяса птицы сальмонеллами была сохранена и в фарше и составила от 21,4 % в 2018 году до 25,0 % в 2020 году. В то же время фарш из свинины был обсеменен в 10,0-12,9 %, а фарш из говядины – в 11,0-13,4 % среди исследованных образцов за весь период.

Количество обсемененного мяса бактериями *Listeria monocytogenes* за три года исследования находилась в пределах 8,8-11,0 %, что ниже уровня обсемененности сальмонеллами (рис. 9).

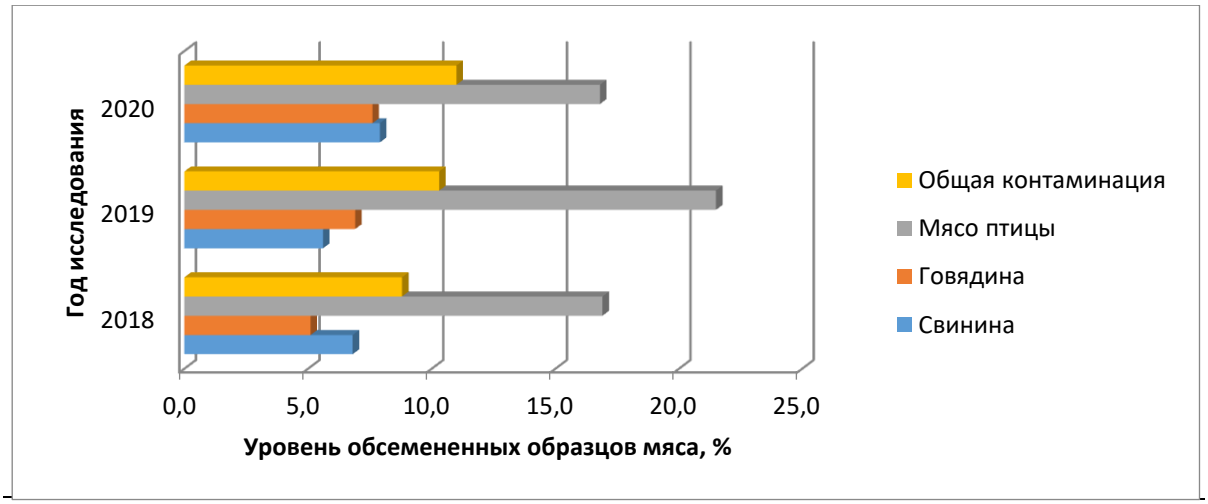


Рисунок 9 – Динамика выявляемости бактерий *Listeria monocytogenes* в мясе

для сырокопченых колбас в период с 2018 по 2020 годы

При этом наибольшее количество образцов, обсемененных листериями, – это мясо птицы. В 2019 году патогенные листерии были выявлены в 21,5 % исследованных образцов мяса птицы, а в 2018 и 2020 годах – 16,9 и 16,8 % соответственно.

Присутствие *Listeria monocytogenes* в мясе является риском их присутствия в готовых сырокопченых колбасах.

Также была проведена оценка фарша на обсемененность бактериями *Listeria monocytogenes*. Ежегодно листерии были обнаружены не менее чем в 11,4 % образцах фарша (рис. 10).

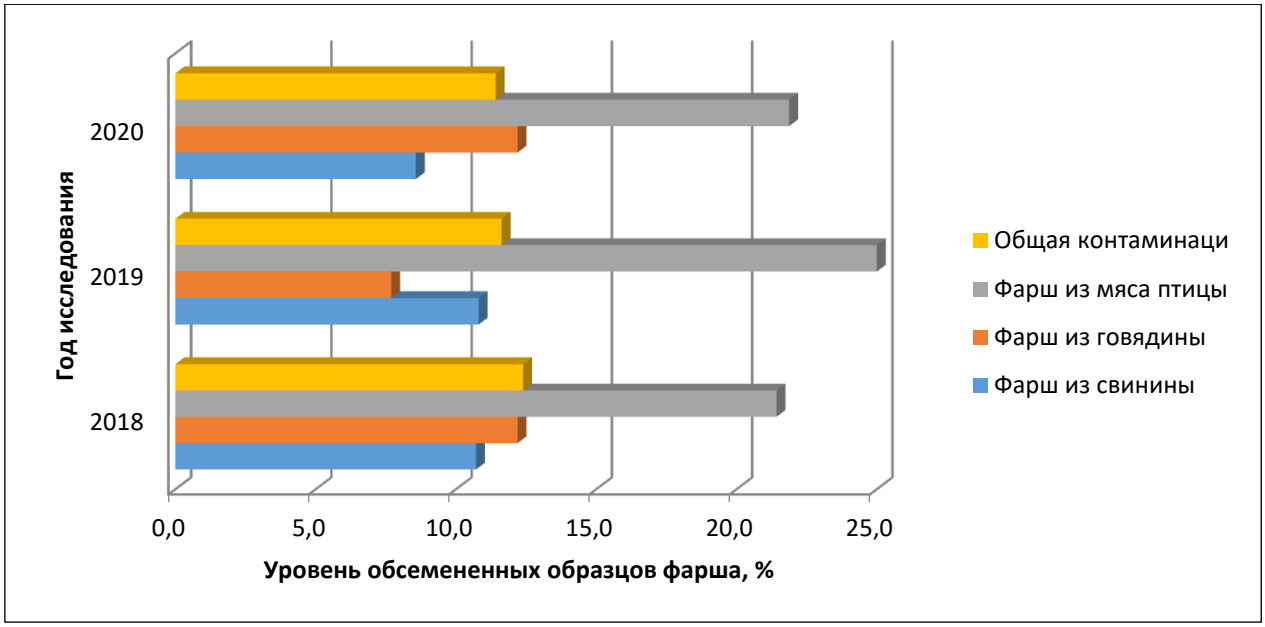


Рисунок 10 – Динамика выявляемости бактерий *Listeria monocytogenes* в фарше сырокопченых колбас в период с 2018 по 2020 годы

Как и в мясе птицы, так и в фарше из него наблюдали высокий уровень обсемененности бактериями *Listeria monocytogenes* от 21,4 % (2018 год) и до 25 % (2019 год). 12,2 % образцов фарша из говядины с *Listeria monocytogenes* было выявлено в 2018 и 2020 годах, однако в 2019 году количество положительных проб не превышало 7,7 %. Также было установлено присутствие бактерий *Listeria monocytogenes* в фарше из свинины в 2018 и

2019 годах в 10,7 и 10,8 % исследованных образцах соответственно. Однако в 2020 году количество положительных проб снизилось до 8,6 %.

Состав и количество исходной микробной популяции мяса и фарша сырокопченых колбас зависит от многих факторов. Основные факторы – это санитарное состояние животных перед убоем, процесс убоя и переработки, санитарно-гигиеническое состояние объекты производственной среды и технологические операции. С помощью высокопроизводительного секвенирования был определен таксономический состав образцов фарша из мяса разных видов животных и птицы. Для этого были выбраны 4 фарша, содержащие в своем составе один из видов сырья: свинину, говядину и мясо птицы.

На основании полученных данных было установлено, что все ОТЕ (без учета ОТЕ растительных пластид) принадлежат бактериям филумов: *Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria и Tenericutes*. При этом из них два филума микроорганизмов являются ключевыми: *Proteobacteria и Firmicutes*, остальные представители микробных сообществ являются минорными.

Все исследованные образцы фарша характеризуются тем, что доминантными являются представители отрядов *Enterobacteriales и Pseudomonadales* (рис. 11). В наименьшем количестве были представители таких порядков, как *Aeromonadales, Lactobacillales, Flavobacteriales и Bacilales*.

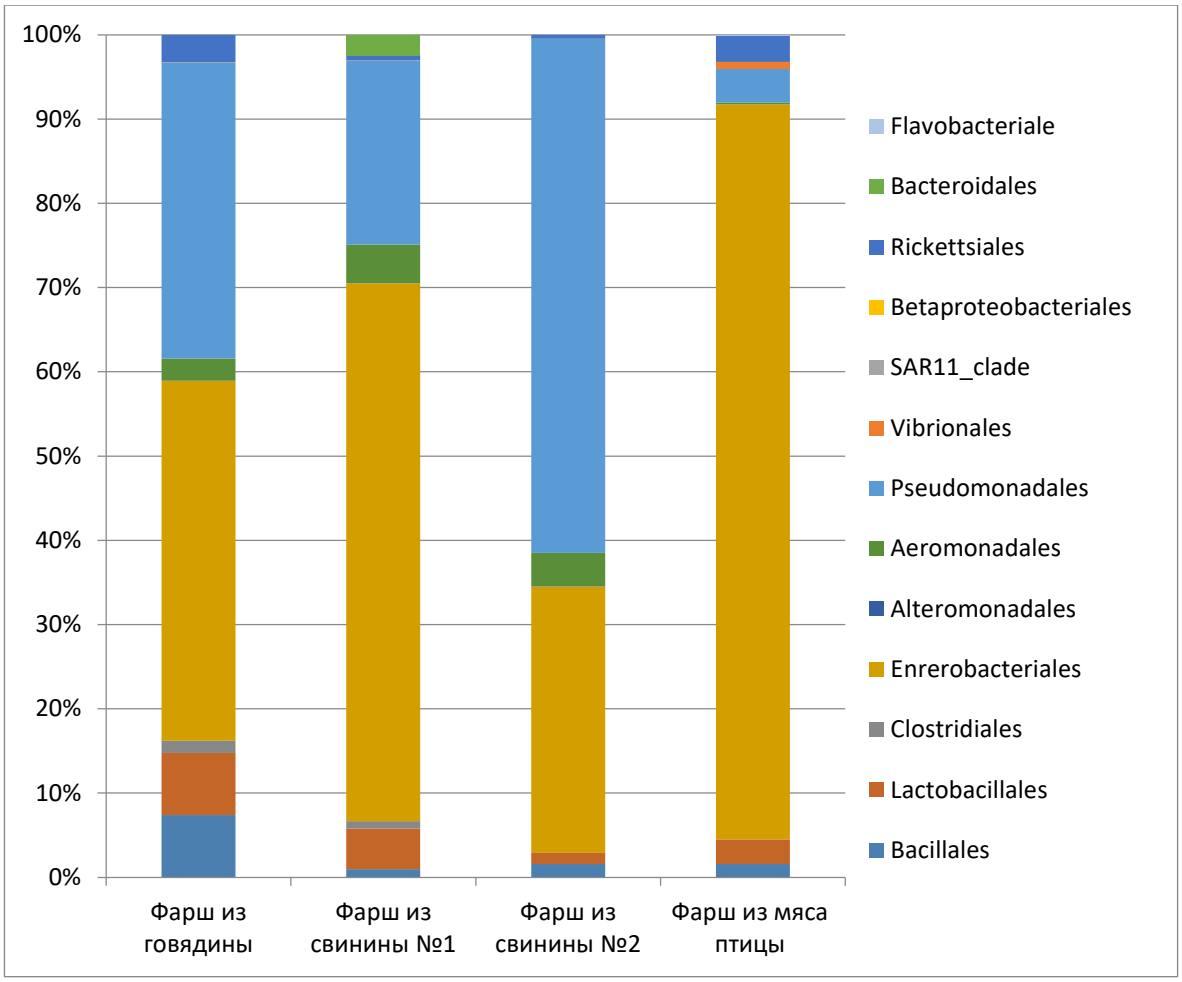


Рисунок 11 – Соотношение представителей различных бактериальных порядков в образцах фарша из разного вида мяса

Порядок *Enterobacteriales* в основном был представлен семейством *Enterobacteriaceae*, которое в свою очередь – 10 родами бактерий в различном соотношении. Наиболее распространенными родами в исследованных образцах были *Enterobacter и Escherichia-Shigella*.

Оценка чувствительности к антибиотикам штаммов *Salmonella* и *Listeria monocytogenes*, выделенных из мяса и фарша для сырокопченых колбас (на примере мяса птицы)

Для изучения этой проблемы была поставлена задача, оценить чувствительность к антибиотикам патогенных бактерий рода *Salmonella* и *Listeria monocytogenes*, выделенных из мяса и фарша для производства сырокопченых колбас.

Было исследовано 39 штаммов *Salmonella* на устойчивость к 13 антимикробным препаратам. Результаты исследований представлены в табл. 3.

Таблица 3 – Результаты оценки чувствительности бактерий *Salmonella* spp. к антибиотикам

Классы антибиотиков	Антибиотик	Количество штаммов (%)		
		Резистентные (R)	Промежуточные (I)	Чувствительные (S)
Пенициллин	Ампициллин	9 (23,1)	1 (2,6)	29 (74,4)
Карбапенемы	Имипенем	8 (23,1)	2 (2,6)	29 (74,4)
Аминогликозиды	Амикацин	7 (17,9)	19 (48,7)	13 (33,3)
	Стрептомицин	5 (12,8)	5 (12,8)	29 (74,4)
	Тобрамицин	6 (15,4)	1 (2,6)	32 (82,1)
Цефалоспорины	Цефотаксим	7 (17,9)	8 (20,5)	24 (61,5)
	Цефазолин	17 (43,6)	8 (20,5)	14 (35,9)
Антагонисты пути фолиевой кислоты	Триметоприм / сульфаметоксазол	13 (33,3)	0 (0)	26 (66,7)
Хлорамфеникол	Хлорамфеникол	8 (20,5)	5 (12,8)	26 (66,7)
Макролиды и азалиды	Азитромицин	11 (28,5)	-	28 (71,8)
β-лактамы / ингибиторы β-лактамаз	Амоксициллин-клавулановая кислота	3 (7,7)	4 (10,3)	32 (82,1)
Нитрофураны	Фурадонин	4 (10,3)	6 (15,4)	29 (74,4)
Тетрациклиновая группа	Тетрациклин	12 (30,8)	10 (25,6)	17 (43,6)

Изоляты микроорганизмов были классифицированы как резистентные к антибиотикам в следующей последовательности: к цефазолину 43,6 % (n = 17), к сульфаметоксазол/триметоприму 33,3 % (n = 13), к тетрациклину 30,8 % (n = 12) и к азитромицину 28,5 % (n = 11) всех исследованных сальмонелл. При этом наиболее чувствительны штаммы *Salmonella* spp. были к амоксициллин-клавулановой кислоте и тобрамицину 82,1 % (n = 32), нитрофурадонину и ампициллину 74,4 % (n = 29).

Один из штаммов сальмонелл проявлял устойчивость к 6 антимикробным препаратам, два штамма к 5 и восемь штаммов к 4 антимикробным препаратам. Среди всех изолятов 2 штамма сальмонелл

проявляли устойчивость к 7 противомикробным препаратам, относящихся к 6 классам антимикробных веществ.

На следующем этапе была оценена чувствительность *Listeria monocytogenes*, выделенных из мясного сырья, к 18 антибиотикам. Результаты представлены на рис. 12.

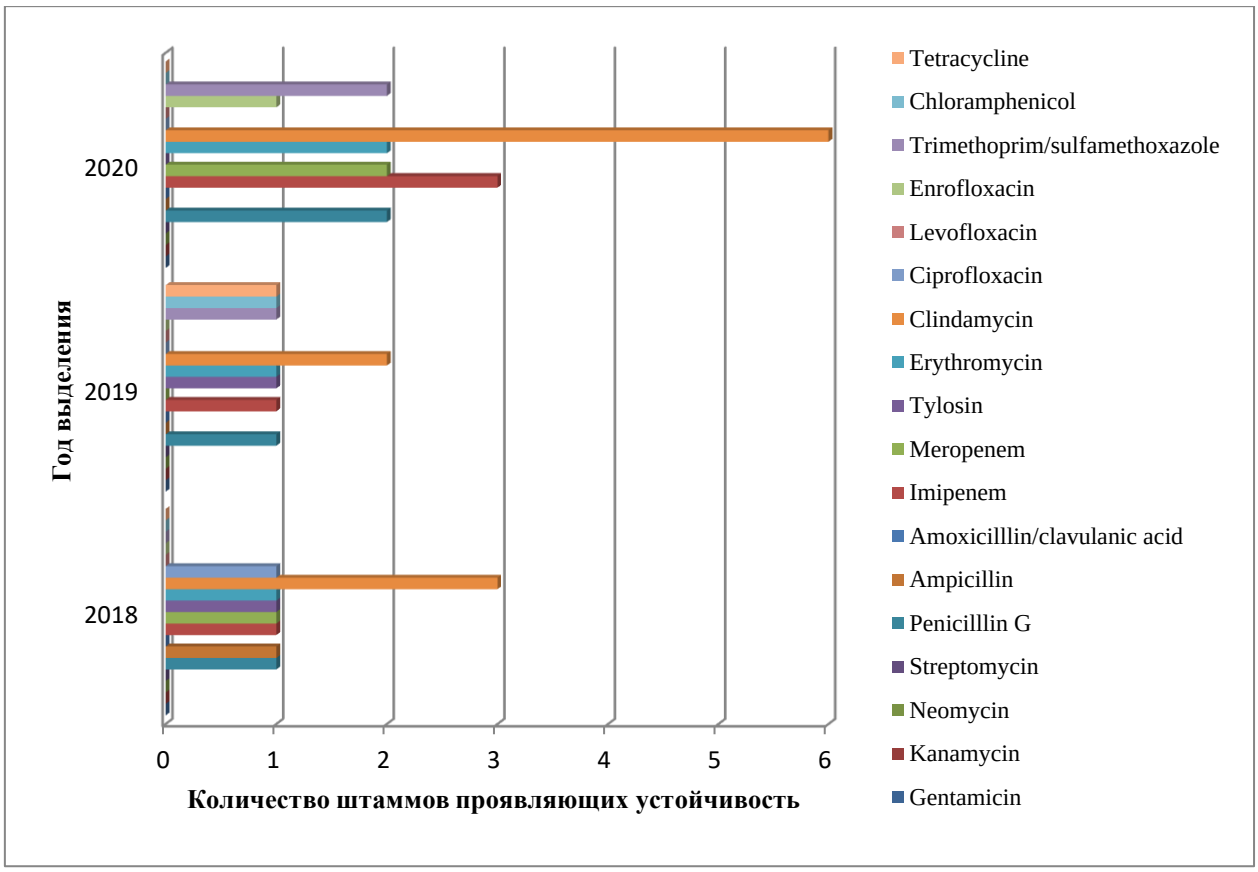


Рисунок 12 – Распределение устойчивости к антибиотикам у штаммов *Listeria monocytogenes*, выделенных в период с 2018 по 2020 годы

Была установлена устойчивость *Listeria monocytogenes* к 12 антибиотикам. За весь период исследования наибольшее количество штаммов *L. monocytogenes* проявляли устойчивость к клиндамицину. Стабильно с 2018 по 2020 годы отмечались проявления устойчивости патогенных для человека листерий также к пенициллину G, имипенему и эритромицину. Все выявленные *Listeria monocytogenes* были чувствительны к гентамицину, канамицину, неомицину, стрептомицину, амоксициллину/клавулановой кислоте, левофлоксацину. Это предполагает,

что данными препаратами может быть обеспечена эффективная терапия при листериозе людей.

Изучение чувствительности микроорганизмов стартовых культур к антибиотикам

Изучение влияния антибиотиков на формирование качества и безопасности сырокопченых колбас было начато с изучения чувствительности к ним микроорганизмов стартовых культур.

Из 10 бактериальных препаратов, применяемых при производстве сырокопченой продукции, была выделена 21 культура микроорганизмов.

Результаты исследования представлены в табл. 4.

Таблица 4 – Результаты исследования чувствительности микроорганизмов стартовых культур к антибиотикам

№	Бактериальный препарат	Вид выделенного штамма микроорганизма	Код образца
Коммерческие бактериальные препараты			
1	BITEC SM 96 аром (Фрутаром продакшен ГмбХ, Германия)	*Staphylococcus carnosus*	L-1
2	BITEC LS 25 (Фрутаром продакшен ГмбХ, Германия)	*Staphylococcus carnosus*	L-2
		Lactobacillus sakei	L-3
3	Простарт HS (М Профуд Зрт. Венгрия)	*Staphylococcus carnosus*	L-4
		Staphylococcus xylosus	L-5
4	Safe Pro B-LC-77 (Хр. Хансен ГмбХ, Германия)	*Staphylococcus carnosus*	L-6
5	Bactoferm SM-194 RU (Хр. Хансен ГмбХ, Германия)	*Staphylococcus carnosus*	L-7
		Staphylococcus xylosus	L-8
6.	Bactoferm T-SP (Chr. Hansen, Германия)	*Staphylococcus carnosus*	L-9
7.	ПротектСтарт (Moguntia Schweiz AG, Швейцария)	*Staphylococcus xylosus,*	L-10
		Staphylococcus carnosus	L-11
8.	MildSTART (Милдстарт) FB-CA4 (Швейцария)	*Lactobacillus sakel*	L-12

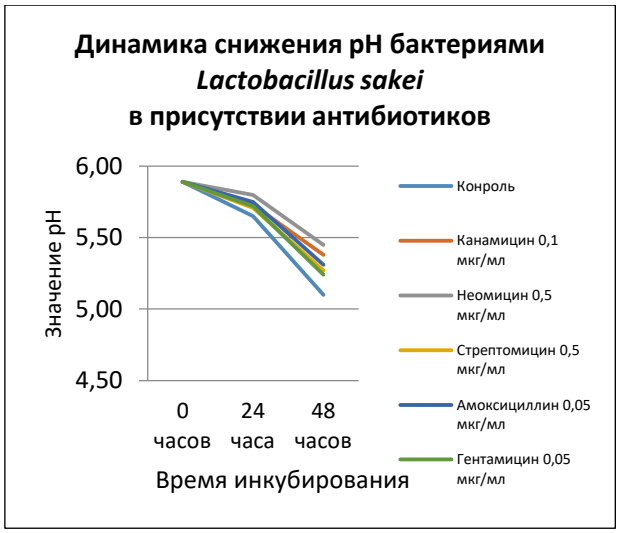
	MildSTART (Милдстарт) FB-CA4 (Швейцария)	*Staphylococcus carnosus*	L-13
		Staphylococcus xylosus	L-14
9.	PrestoSTART (Престостарт) (Moguntia, Швейцария)	*Staphylococcus carnosus*	L-15
		Lactobacillus sakei	L-16
10.	Fermarom R4/160 (Frutarom Savory Solutions GmbH" ("Фрутаром Сэвори Солюшэнс ГмбХ", Германия)	*Staphylococcus carnosus*	L-17
		Lactobacillus sakei	L-18
11.	Lyocarni VBL-97 (Sacco S.r.l., ИТАЛИЯ)	*Staphylococcus xylosus*	L-19
		Lactobacillus plantarum	L-20
		Lactobacillus curvatus	L-21

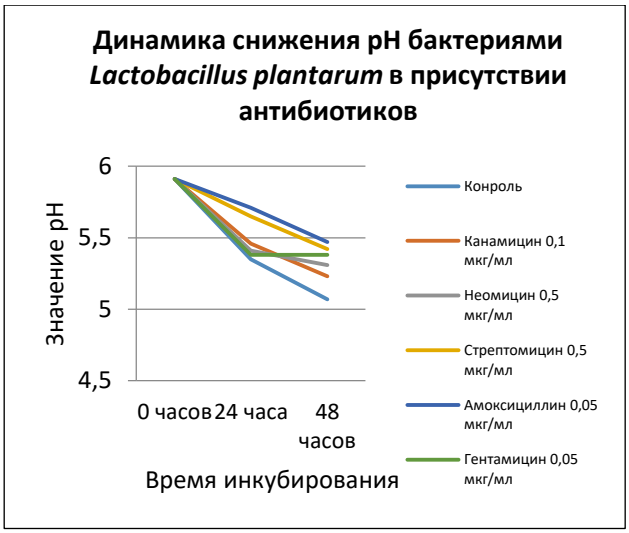
Чувствительность микроорганизмов стартовых культур к МДУ антибиотиков в мясе предполагает возникновение риска технологического характера за счет ингибирования их роста и как следствие неконтролируемый процесс созревания сырокопченых колбас в случае наличия остаточных количеств антимикробных веществ.

Изучение влияния антибиотиков на динамику роста микроорганизмов стартовых культур

Для аргументации предположения, что антибиотики являются причиной неконтролируемого процесса ферментации, была изучена динамика снижения pH бактериями *Lactobacillus sakei* и *Lactobacillus plantarum*, в присутствии антибиотиков в концентрации МДУ для мясного сырья (согласно ТР ТС 034/2013 приложение 5).

Результаты представлены на рис. 13.





а) бактериями *Lactobacillus sakei (L-18)*

б) бактериями *Lactobacillus plantarum (L-20)*

Рисунок 13 – Динамика снижения pH модельной среды в присутствии антибиотиков

При культивировании штамма *Lactobacillus plantarum (L-20)* в контрольном образце без антибиотиков за 48 часов было достигнуто значение pH равное 5,07±0,02. Однако в присутствии антибиотиков значения pH снижалось менее интенсивно. При наличии амоксициллина в концентрации 0,05 мкг/мл через 48 часов значение pH составило 5,45±0,02, стрептомицина в концентрации 0,5 мкг/мл – 5,42±0,02, гентамицина в концентрации 0,05 мкг/мл – 5,38±0,02.

Схожие результаты были получены при исследовании *Lactobacillus sakei (L-18).* При культивировании *Lactobacillus sakei (L-18)* за 48 ч значение pH достигло 5,10±0,02 в контрольном образце. В то же время, как при культивировании с неомицином за это же время значение pH составило 5,45±0,02, с канамицином – 5,38±0,02, а с амоксициллином – 5,31±0,02.

После установления факта влияния антибиотиков на скорость снижения pH микроорганизмами стартовых культур было определено количество клеток ингибируемых МДУ антибиотиков, установленных для мяса. Для этого изучили потенциал роста *Lactobacillus plantarum (L-20) и Lactobacillus sakei (L-18*), а также *Staphylococcus carnosus (L-2),*

Staphylococcus xylosus (L-8) как в присутствии антибиотиков, так и без них. Результаты представлены на рис. 14-17.

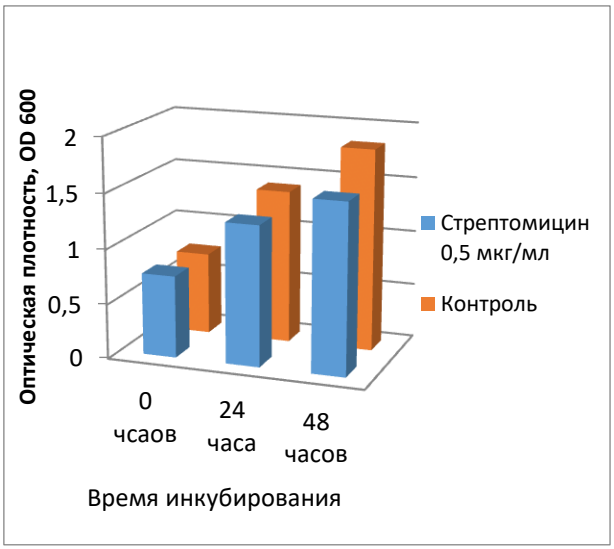


Рисунок 14 – Динамика роста *Staphylococcus carnosus* (L-2) в присутствии антибиотика стрептомицина (0,5 мкг/мл)

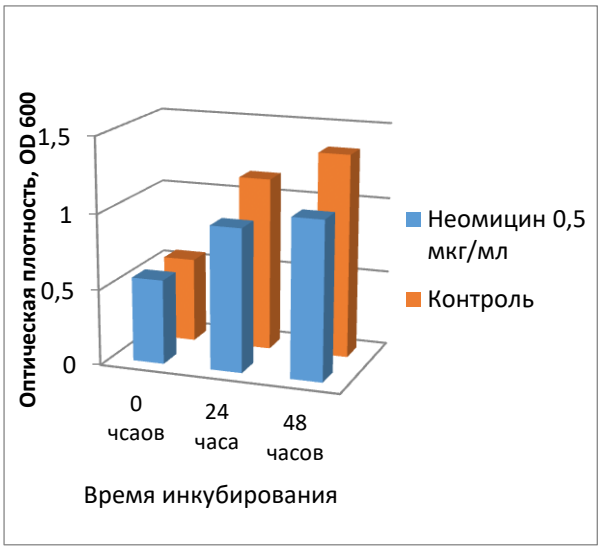


Рисунок 15 – Динамика роста *Staphylococcus xylosus* (L-8) в присутствии антибиотика неомицина (0,5 мкг/мл)

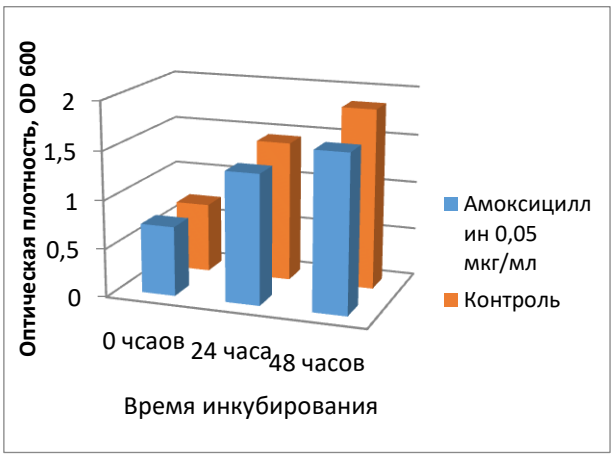


Рисунок 16 – Динамика роста *Lactobacillus plantarum* (L-20) в присутствии антибиотика амоксициллина (0,05 мкг/см^3)

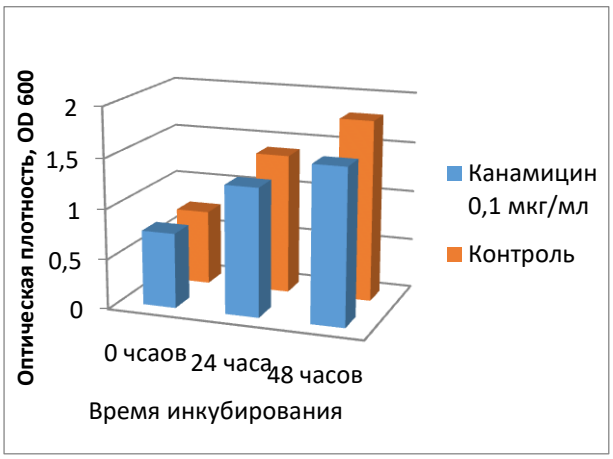


Рисунок 17 – Динамика роста *Lactobacillus sakei* (L-18) в присутствии антибиотика канамицина (0,1 мкг/см^3)

Через 48 часов культивирования микроорганизмов с антибиотиками по сравнению с контролем потенциал роста *Staphylococcus carnosus*,

Staphylococcus xylosus, Lactobacillus plantarum и Lactobacillus sakei снизился на 10, 22, 13 и 12 % соответственно.

Изучены биохимические и ферментативные процессы, формирующие вкусо-ароматические и физико-химические характеристики сырокопченой колбасы. Для исследования были приготовлены модельные образцы сырокопченых колбас согласно СТО 00419779-002-2013 «Метод ускоренного тестирования технологических свойств стартовых культур».

Изучено влияние антибиотиков на преобразование нитрита натрия в процессе ферментации модельных образцов ($К_1$-$К_2$, $К_5$-$К_6$). В результате проведенных экспериментов было установлено, что в опытных образцах массовая доля нитрита натрия снижалась менее интенсивно, чем в контрольных образцах без антибиотиков.

Изучение органолептических изменений аромата в образцах ($К_1$-$К_6$) проводили с использованием прибора «электронный нос». Было установлено, что площади «визуальных отпечатков» контрольных образцов больше, чем опытных образцов на 0,05-0,07 усл. ед*10^7. Это означает, что процесс формирования аромата опытных образцов в присутствии антибиотиков низкой интенсивности за счет снижения продуцирования ароматических летучих соединений.

На первом этапе анализа риска была проведена идентификация рисков возникающих при производстве сырокопченых изделий, при наличии в мясе остаточных количеств антимикробных препаратов.

Риски в случае присутствия антимикробных веществ в мясе, используемом для производства сырокопченых колбас, заключались в формировании антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов и ингибировании роста стартовых культур (при изготовлении полусухих колбас), а также желательной (молочнокислой) микрофлоры (при изготовлении сухих колбас без стартовых культур).

Для изучения и анализа потенциальных рисков была применена методика FMEA – анализа, количественной оценки риска.

Экспертным путем осуществлена оценка идентифицированных потенциальных рисков с точки зрения тяжести последствий, вероятности их реализации и вероятности обнаружения в процессе производства. Для определения критического фактора опасности определено предельное число риска (далее – ПЧР) (табл. 5).

Таблица 5 – Протокол FMEA анализа

Потенциально уязвимый этап	Причина уязвимости	Возможные последствия	Вероятная причина	S	O	D	ПЧР
Входной контроль и приемка сырья и материалов	присутствие антимикробных веществ в мясе, используемом для производства сырокопченых колбас	Использование мясного сырья с остаточными количествами антибиотиков	отсутствие контроля всех групп антибиотиков	3	4	3	36
Измель-чение мясного сырья		Последствия отсутствуют	-				
Посол		Последствия отсутствуют	-				
Последствия отсутствуют		Последствия отсутствуют	-				
Осадка		Последствия отсутствуют	-				
Климатизация и копчение (ферментация)		ингибирование роста вносимых стартовых культур, и собственной	отсутствие контроля всех групп антибиотиков, отсутствие	3	4	3	36

		полезной микрофлоры мяса	временной выдержки перед убоем после применения антибиотиков				
		формирование антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов	отсутствие контроля всех групп антибиотиков, незаконное использование антибиотиков в животноводстве,	4	4	3	48
Сушка		Последствия отсутствуют	-				
Охлаждение		Последствия отсутствуют	-				
Упаковка		Последствия отсутствуют	-				

Экспертным путем установлено граничное значение ПЧР (ПЧР гр) равное 8±1. Как видно из таблицы, наиболее уязвимыми этапами при производстве сырокопченых колбас являются ферментация (ПЧРэт 84), входной контроль, а также приемка сырья и материалов (ПЧРэт 36). Они определены как этапы, на которых возможно нанесение максимального ущерба качеству и безопасности готовой продукции (сырокопченых колбас) в случае присутствии антимикробных веществ в мясе.

На следующем этапе были составлены профили опасности в соответствии с методикой профилирования рисков, предложенных в [1].

Используя формулу расчета ранга риска и матрицы риска, было проведено ранжирование и составление профилей, для всех ранее оцененных опасных факторов (табл. 6).

Таблица 6 – Профили идентифицированных рисков

Характеристика	Значение	
	ингибирование роста стартовых культур	формирование антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов
Тяжесть последствия (Т)	7	7
Вероятность возникновения (В)	5	8
Возможность выявления (ВВ)	6	7
Приоритетное число риска	210	392
Вероятность реализации (Вр)	5	5
Тяжесть последствия (Тп)	2	4
Ранг риска	средний	высокий

Высокое значение приоритетного числа рисков показывает важность мер предотвращения рисков в обеспечении безопасности мясной продукции. Высокие значения вероятности возникновения и возможности выявления свидетельствуют о недостаточности научного изучения рассматриваемого риска.

На основе проведенного анализа и составления профиля рисков одним из ключевых факторов при оценке рисков является возможность их предотвращения.

На основе этого разработана схема управления идентифицированными рисками (рис. 23).

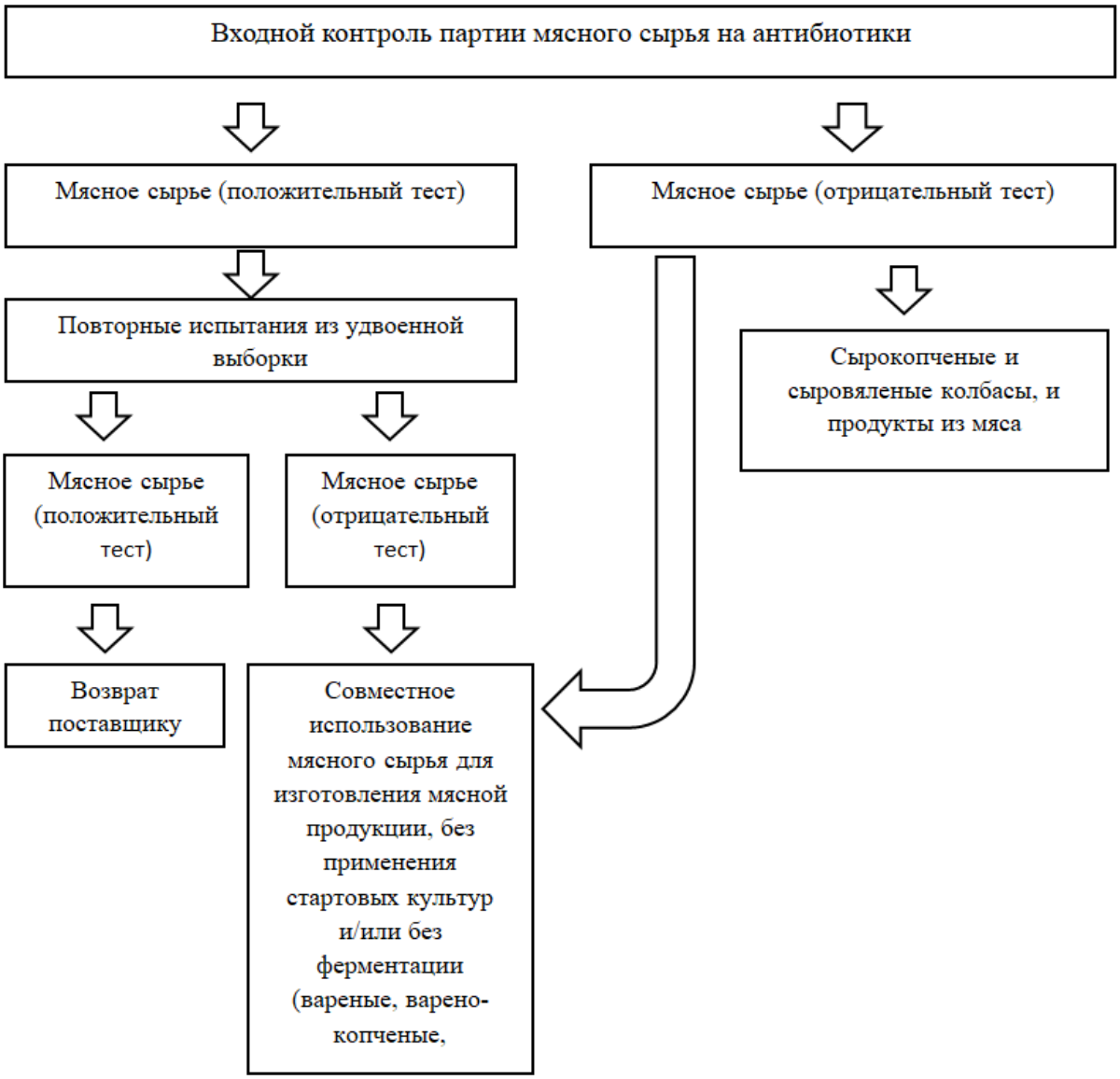


Рисунок 23 – Схема управления идентифицированными рисками

На основании разработанной схемы управления идентифицированными рисками было разработано СТО 00419779-012-2022 по организации и порядку проведения входного контроля мясного сырья, используемого для производства сырокопченых колбас на наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ.

Производственная апробация продемонстрировала работоспособность предпринятых мер. Образцы, выработанные согласно предложенной схеме, соответствовали всем требованиям, предъявляемым к сырокопченым колбасам. В то время как образцы, выработанные без использования СТО, не соответствовали как параметрам качества (нарушения органолептики

продукта, превышение значений амино-аммиачного азота, кислотного числа, перекисного числа), так и параметрам безопасности (присутствие *Escherichia coli*, сниженное количество МКБ).

После разработки действий по улучшению качества и предупреждению возникновения рисков проводили повторный анализ с использованием метода FMEA (табл. 7).

Таблица 7 – Протокол FMEA анализа (продолжение)

Возможные последствия	Меры по предотвращению	Меры по обнаружению	Предпринятые действия	S	O	D	ПЧР
Ингибирование роста вносимых стартовых культур, и собственной полезной микрофлоры мяса	Контроль присутствия антимикробных веществ в мясе, используемом для производства	Разработка СТО 00419779-012-2022 «Организация и порядок проведения входного контроля мясного сырья, используемого для производства сырокопченых колбас, на наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ»	Контроль входного сырья на наличие остаточных количеств антибиотиков и других антимикробных химиотерапевтических веществ	1	2	2	4
Формирование антибиотикоре-зистентности у патогенных микроорганизмов	Не допуск мяса с остаточными количествами антибиотиков для производства сырокопченых колбас			1	2	1	2
Использование мясного сырья с остаточными количествами антибиотиков	Контроль присутствия антимикробных веществ в мясе, используемом для производства			1	2	2	4

По результатам предпринятых действий по обнаружению и мер по предотвращению возникновения выявленных рисков произошло снижение уязвимости этапов ферментации (ПЧРэт – 6 баллов) и входного контроля, и приемки сырья и материалов (ПЧРэт – 4 баллов).

Выводы

1. Установлено, что микробиологическим качественным методом можно определить наличие 35 нормируемых антибиотиков одновременно. Определено, что методом можно установить наличие 22 антибиотиков в концентрации МДУ и 13 антибиотиков в концентрациях выше МДУ. Полученные результаты подготовлены для внесения в Приложение проекта ГОСТ 55481.
2. Определен уровень контаминированного мяса, используемого в производстве сырокопченых колбас, антимикробными веществами: свинины - 25,3 %, говядины- 18,4 %, мясо птицы - 29,4 %, фарша – 14,4 %. Установлены группы антибиотиков наиболее часто используемых и выявляемых в говядине: фениколы – 51,0 %, аминогликозиды – 49,0 % и бета-лактамы – 31,4%; в свинине: тетрациклины – 25,0 %, сульфаниламиды – 16,2 % и колистин – 10,3 %; в мясе птицы: фениколы – 16,2 %, сульфаниламиды и тетрациклиновая группа по 14,7 %; в фарше: тетрациклиновой группы – 20,0 %, макролиды, бета-лактамы и фторхинолоны по 12,7 %.
3. Установлено, что за три года мониторинга мяса разных видов животных, в т.ч. и птицы, а также фарша, используемого для производства сырокопченых колбас, на перерабатывающие предприятия поступило: 9,9-11,4 % мяса и 12,8-13,2 % фарша обсеменённого бактериями рода *Salmonella*, а также 8,8 – 11,0 % мяса и 11,4 – 12,4 % фарша обсеменённого *Listeria monocytogenes*. Определен метагеномный профиль микроорганизмов образцов фарша сырокопченых колбас, состоящий из основных филумов: *Actinobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria, Tenericutes.* Установлена таксономическая разнородность микроорганизмов образцов, в зависимости от вида сырья и ключевые группы микроорганизмов, несущих в себе как риск возникновения порчи (*Pseudomonas* spp., *Brochothrix thermosphacta*) продуктов питания, в

том числе сырокопченых колбас, так и риск возникновения пищевых отравлений: (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*).

4. Установлено наличие устойчивости у штаммов *Salmonella* к 13 и *Listeria monocytogenes* к 12 антибиотикам, в том числе используемых в терапии инфекционных заболеваний людей. Из мяса и фарша, используемого для производства сырокопченых колбас, выделены штаммы *Salmonella* spp. и *Listeria monocytogenes* обладающих мультирезистетностью. Определен их фенотипический профиль устойчивости.
5. Исследуя влияние антибиотиков на качество и безопасность сырокопченых колбас установлено: неконтролируемое изменение pH до 5,31-5,45; менее интенсивное снижение массовой доли нитрита натрия; снижение количества клеток микроорганизмов стартовых культур на 13-22 %; низкой интенсивности процесс формирования аромата модельных образцов микроорганизмами стартовых культур в присутствии антибиотиков за счет снижения образования ароматических летучих соединений; наибольшая интенсивность изменения показателя «светлоты», и пропорциональное уменьшение значения «красноты» в процессе ферментации. Установлена чувствительность микроорганизмов стартовых культур к МДУ антибиотиков установленный для мяса согласно ТР ТС 034.
6. Идентифицированы риски, которые могут возникнуть при наличии в мясе для изготовления сырокопченых колбасных изделий антибиотиков. Это риск ингибирования роста микроорганизмов стартовых культур и риск формирования антибиотикорезистентности у патогенных микроорганизмов мяса.
7. Составлен профиль рисков ингибирования роста микроорганизмов стартовых культур сырокопченых колбас и формирования антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов, выделенных из мяса. Тяжесть последствий ингибирования роста

микроорганизмов стартовых культур сырокопченых колбас и формирования антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов, выделенных из мяса составляет 7 баллов, вероятность их возникновения - 5 и 8 баллов соответственно, а возможность выявления – 6 и 7 баллов. Приоритетное число риска ингибирования роста стартовых культур составило 210 единиц, а формирования антибиотикорезистентности патогенных микроорганизмов, выделенных из мяса 392 единицы.

8. Разработана схема управления рисками, реализованная в СТО 00419779-012-2022.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации:

Статьи, индексируемые в международных базах данных Web of Science и Scopus

1. Rakitin, A.L. Evaluation of Antibiotic Resistance of Salmonella Serotypes and Whole-Genome Sequencing of Multiresistant Strains Isolated from Food Products in Russia / A.L. Rakitin, Y.K. Yushina, **E.V. Zaiko**, D.S. Bataeva, O.A. Kuznetsova, A.A. Semenova, S.A. Ermolaeva, A.V. Beletskiy, T.V. Kolganova, A.V. Mardanov, S.O. Shapovalov, T.E. Tkachik // Antibiotics. – 2022. – V. 11. – № 1. DOI:10.3390/antibiotics11010001.
2. **Zaiko, E.** Antibiotic resistant of microorganisms in fermented sausages / E.V. Zaiko, D.S. Bataeva, Yu.K. Yushina, A.A. Makhova, M.Yu. Minaev // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. – 2020. – V. 421. – P. 052013.
3. **Zaiko, E.** Prevalence, serovar, and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from meat and minced meat used for production smoked sausage / E.V. Zaiko, D.S. Bataeva, Yu.K. Yushina, M.A. Grudistova, B. Velebit // IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. – 2021. – V. 854. – P. 012108.
4. Kotenkova, E. Application of evagreen for the assessment of listeria monocytogenes атсс 13932 cell viability using flow cytometry / E. Kotenkova, D. Bataeva, M. Minaev, **E. Zaiko** // AIMS Microbiology.- 2019. -. 5. -№ 1.- P. 39-47.

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК

5. Батаева, Д.С. Расширение возможности использования мультискрининговогo микробиологического метода для определения химиотерапевтических препаратов в мясе / Д.С. Батаева, **Е.В. Зайко**, Ю.К. Юшина, В.Н. Горбунов // Все о мясе – 2019 – № 3 – С. 36-39. DOI: 10.21323/2071-2499-2019-3-36-39.
6. **Зайко, Е.В.** Изучение микробной популяции фаршей сырокопчёных колбас с помощью высокопроизводительного секвенирования / Е.В. Зайко, Ю.К. Юшина, Е.В. Груздев, А.В. Белецкий, А.В. Марданов, Д.С. Батаева, А.А. Семенова // Все о мясе. – 2021 – № 2 – С. 64-67. DOI: 10.21323/2071-2499-2021-2-64-67.
7. **Зайко, Е.В.** Распространённость и устойчивость к антибиотикам патогенных микроорганизмов, выделенных из мяса различных видов животных / Е.В. Зайко, А.А. Панченко, Д.М. Сатабаева, Д.С. Батаева // Все о мясе. – 2019. – № 3. – С. 42-45. DOI: 10.21323/2071-2499-2019-3-42-45.

8. **Зайко, Е.В.** Изучение фенотипического и генотипического профиля устойчивости сероваров *S. enteritidis и S. typhimurium*, выделенных из мясного сырья для производства сырокопчёных колбас / Е.В. Зайко, Д.С. Батаева, Ю.К. Юшина, Д.М. Сатабаева // Все о мясе. – 2020. – № 3. – С. 53-57. DOI: 10.21323/2071-2499-2020-3-53-57.
9. **Зайко, Е.В.** Моделирование влияния антибиотиков на развитие микроорганизмов стартовых культур / Е.В. Зайко, Д.С. Батаева, Ю.К. Юшина, Д.М. Сатабаева, М.А. Грудистова // Все о мясе. – 2021. – № 1. – С. 42-47. DOI: 10.21323/2071-2499-2021-1-42-47.
10. **Зайко, Е.В.** Идентификация антибиотиков в мясе. Возможности проточной цитометрии / Е.В. Зайко, О.А. Кузнецова, Д.С. Батаева, М.А. Грудистова // Все о мясе. – 2020. – № 5. – С. 56-60. DOI: 10.21323/2071-2499-2020-5-56-60.

Статьи и материалы конференций, индексированные в РИНЦ

11. **Зайко, Е. В.** Идентификация рисков связанных с сырьем животного происхождения / Е. В. Зайко, Д. С. Батаева // Теория и практика переработки мяса. – 2018. – Т. 3. – № 4. – С. 23-31. – DOI 10.21323/2414-438X-2018-3-4-23-31.
12. Батаева, Д. С. Влияние антибиотиков на развитие стартовых культур при производстве сырокопченых колбас / Д. С. Батаева, М. Ю. Минаев, **Е. В. Зайко** // Мясная индустрия. – 2017. – № 6. – С. 46-47.
13. Батаева, Д. С. Риски, связанные с наличием в мясе и в продуктах убоя животных остаточных количеств антимикробных препаратов / Д. С. Батаева, **Е. В. Зайко** // Теория и практика переработки мяса. – 2016. – Т. 1. – № 3. – С. 4-13. – DOI 10.21323/2414-438X-2016-1-3-4-13.
14. **Зайко, Е. В.** Роль показателя pH в процессе производства сырокопченых колбас при использовании мясного сырья с остаточными количествами антибиотиков / Е. В. Зайко, Д. С. Батаева // Безопасность и качество товаров: Материалы XII Международной научно-практической конференции, Саратов, 17 июля 2018 года .- 2018. – С. 67-73.
15. Батаева, Д. С. Проблемы, связанные с наличием о статочных количеств антимикробных препаратов в мясе и в продуктах убоя животных и метод их обнаружения / Д. С. Батаева, **Е. В. Зайко**, Ю. К. Юшина // Международная научно-практическая конференция, посвященная памяти Василия Матвеевича Горбатова. – 2016. – № 1. – С. 50-53.