

**ГОУ ВПО «МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ПРИКЛАДНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ»**

На правах рукописи



Ментюков Григорий Александрович



**ЛАКТОКОККОФАГИ И САНИТАРНОЕ СОСТОЯНИЕ В
КИСЛОМОЛОЧНОМ ПРОИЗВОДСТВЕ ТВОРОГА**

**16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология**

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание учёной степени
кандидата ветеринарных наук**

30 ОКТ 2008

МОСКВА 2008

Работа выполнена на кафедре микробиологии и иммунологии ветеринарно-санитарного факультета ГОУ ВПО «Московский государственный университет прикладной биотехнологии»

Научный руководитель:

доктор ветеринарных наук,
профессор

Степаненко Пётр Петрович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор (МГУПБ)

Валихов Алексей Фёдорович

доктор ветеринарных наук,
профессор (ВИЭВ)

Субботин Владимир Викторович

Ведущая организация:

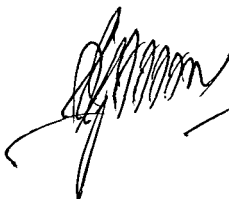
ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии, гигиены и экологии»

Защита диссертации состоится «21» ноября 2008г.
в 15³⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 212.149.03 при
ФАО ГОУ ВПО «Московский государственный университет прикладной
биотехнологии» (МГУПБ), по адресу: 109316, г. Москва, ул. Талалихина,
д.33.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУПБ.

Автореферат разослан «7» сентября 2008г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
к. в. н., проф.



Серёгин И.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Важнейшим требованием современного рынка молочной продукции является её стабильное качество и микробиологическая безопасность. Одним из факторов их обеспечения при производстве кисломолочных продуктов является интенсивность и направленность процесса сквашивания.

Главными причинами снижения интенсивности кислотообразования при сквашивании являются: использование молока, содержащего ингибирующие вещества и молока с недостаточным количеством сухих веществ, несоблюдение технологических режимов и, наконец, несоответствие качества сырья и условий производства санитарно-гигиеническим требованиям, а также использование молока, пораженного бактериофагами полезной микрофлоры (В.И. Ганина, В.Ф. Семенихина МГУПБ, 1999). Как показывает повседневная производственная практика, проблема бактериофагии на молокоперерабатывающих предприятиях в настоящее время стоит достаточно остро, что обуславливает необходимость проведение фагового мониторинга с целью снижения рисков экономических потерь, связанных с фаговой инфекцией.

Теоретические и практические основы в изучении явления бактериофагии в молочной промышленности заложены в трудах В.З. Ахвердяна, Л.А. Банниковой, В.И. Ганиной, А.В. Гудкова, И.Р. Волковой, Н.С. Королевой, Н.Ф. Кувалдиной, Л.Г. Мытник, Г.Д. Перфильева, В.Ф. Семенихиной, П.П. Степаненко, Д.А. Яковлева, Н. Ackermann, V. Braun, A. Coffey, C. Hill, A. Jarvis, T.R. Klaenhammer, P. Laux, S. Moineau, H. Neve, B. Terzaghi, M. Teuber и др.

Изучением явления бактериофагии учёные занимаются несколько десятилетий, тем не менее, существует ряд нерешённых проблем, определивших цель и задачи настоящего исследования.

Цель работы и задачи исследований. Целью настоящей диссертационной работы явилось определение источников и интенсивности контаминации объектов кисломолочного производства творога лактококкофагами, санитарно-показательными и другими микроорганизмами, характеризующими санитарное состояние производства и предложение практических рекомендаций по его улучшению.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи:

- изучить микрофлору и оценить санитарное состояние заготавливаемого сырого и сухого обезжиренного молока;
- определить источники и интенсивность контаминации лактококкофагами основных объектов кисломолочного производства творога;
- определить наиболее эффективный метод выявления лактококкофагов в объектах кисломолочного производства творога;

- подобрать наиболее приемлемую заквасочную культуру для обнаружения лактококкофагов;
- проанализировать динамику микрофлоры на различных этапах производства творога;
- определить оптимальный метод выявления микроорганизмов в воздухе;
- для снижения контаминации объектов производства предложить усовершенствованный метод дезинфекции производственных цехов и молочного оборудования.

Научная новизна. Впервые выявлена достоверная зависимость между общей бактериальной обсеменённостью, концентрацией молочнокислых бактерий и титром лактококкофагов в объектах производства творога, определены основные источники и интенсивность контаминации лактококкофагами объектов кисломолочного производства творога, что позволит объективно оценивать фаговую ситуацию на молокоперерабатывающих предприятиях.

Предложен новый научно - обоснованный эффективный метод выявления лактококкофагов в различных объектах кисломолочного производства, позволяющий точно определять источники и интенсивность контаминации производимой продукции лактококкофагами: в частности, подобрана тест-культура, использование которой обеспечивает высокую эффективность метода определения лактококкофагов.

Изучена динамика микрофлоры на различных этапах производства творога, что позволяет оценивать микробиологическую ситуацию и осуществлять профилактику развития возбудителей порчи и условно-патогенных микроорганизмов.

Практическая значимость работы. Разработана рабочая инструкция методов обнаружения бактериофагов, что даёт возможность быстро и эффективно проводить анализ и оценивать фаговую ситуацию на различных этапах кисломолочного производства творога.

В условиях молокоперерабатывающего предприятия определено санитарное состояние сырья, других объектов производства творога и даны практические рекомендации по его улучшению.

Предложен эффективный метод определения микроорганизмов в воздухе, позволивший значительно повысить выявляемость различных групп микроорганизмов.

Внедрён в производственную практику усовершенствованный метод дезинфекции производственных цехов и молочного оборудования, в результате чего уменьшается общая микробная обсеменённость и количество лактококкофагов в указанных объектах производства.

Апробация работы. Материалы диссертации представлены и обсуждены на Международных научно-практических конференциях: «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарного контроля и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции», (М., МГУПБ,

2004); «Живые системы и биологическая безопасность населения», (М., МГУПБ, 2006).

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена на _____ страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, выводы, практические предложения, список литературы, приложения. Диссертация содержит 22 рисунка, 17 таблиц. Список литературы включает 155 источников, в том числе 52 иностранных.

Положения, выносимые на защиту. Изучена микрофлора и оценено санитарное состояние заготавливаемого сырого и сухого обезжиренного молока. При этом статистически доказано, что лактококкофаги и колифаги могут служить показателем санитарного состояния перерабатываемого молока.

Определены основные источники обсеменения и интенсивность контаминации лактококкофагами других объектов кисломолочного производства творога: молочное сырьё, не подвергавшееся тепловой обработке.

Определён эффективный метод выявления лактококкофагов в различных объектах кисломолочного производства: метод агаровых слоёв с использованием в качестве тест-культуры штамма *Lactococcus lactis*.

Изучена динамика изменения микрофлоры на различных этапах производства творога: инаktivация фагов сырого молока в процессе пастеризации с последующим возрастанием их титров в процессе сквашивания.

Определён оптимальный метод выявления микроорганизмов в воздухе производственных помещений: аспирационный отбор проб с использованием прибора MAS-100Еco.

Предложен и внедрен усовершенствованный метод дезинфекции молочного оборудования и цехов производства средством «Неосептал ПЕ - 15» в концентрации рабочего раствора 0,12% с экспозицией 10 минут.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

Экспериментальные исследования проводили в микробиологической лаборатории ОАО «Вимм-Билль-Данн» г. Москвы и на кафедре микробиологии ГОУ «Московский государственный университет прикладной биотехнологии» в период 2003 – 2007гг.

Материалом и объектами исследований служили образцы сырого молока (в количестве 370 проб, n=370); сливок (n=200); бактофугированного молока (n=160); пастеризованного молока (n=260); сухого обезжиренного молока (n=506); творога (n=450); творожной сыворотки (n=200); закваски (n=200); сахарного песка (n=100); джемов (n=100); смывов с оборудования (n=510); воздуха (n=1060), а также два штамма *Escherichia coli* (K-12,

полученный из ВКПМ, ФГУП «ГосНИИ генетика», и выделенный из объектов производства); чистая культура *Lactococcus lactis*, выделенная из закваски СНООZIT 230 производства фирмы «Danisco» (Германия); бактериофаги в количестве 11 штаммов, выделенные из исследуемых образцов.

Санитарно-микробиологическое состояние молочных продуктов и объектов производства оценивали по следующим микробиологическим показателям: общей бактериальной обсеменённости, наличию санитарно-показательных микроорганизмов (бактерий группы кишечных палочек (БГКП), эшерихий (*E. coli*), кишечных бактериофагов), а также концентрации молочнокислых бактерий, лактококкофагов, дрожжей и плесеней. Отбор и подготовку проб пищевых продуктов проводили по ГОСТ 26668, 26669; определение количества мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов - согласно ГОСТ 9225-84 и 10444.15-94; определение количества дрожжей и плесневых грибов - согласно ГОСТ 10444.12.88; молочнокислых микроорганизмов по ГОСТ 10444.11-89; наличие бактерий группы кишечных палочек (БГКП) согласно ГОСТ 9225-84; а количество бактерий вида *E. coli* - согласно ГОСТ 30726-2001 и ГОСТ 30518-97/ГОСТ Р 50474-93.

Выявление бактериофагов проводили методом агаровых слоёв, однослойным методом, тестом на сквашивание.

Метод агаровых слоёв позволяет установить количество фаговых частиц, способных образовывать негативные колонии.

Однослойный метод даёт возможность на одной чашки Петри с нанесённым газоном культуры исследовать несколько фильтратов продукта, смывов и количественно определить концентрацию бактериофагов.

Тест на сквашивание используется в тех случаях, когда в состав закваски входят несколько видов культур. Данный тест является результатом кислотного сквашивания молока под действием молочной кислоты, продуцируемой микроорганизмами. Он служит для непрямого (качественного) обнаружения бактериофага.

Результаты исследований статистически обработаны с помощью ППП «Statistica 6.0 for Windows».

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Микрофлора заготавливаемого сырого молока

Целью исследования микрофлоры сырого молока являлась оценка санитарно-микробиологических показателей заготавливаемого молока, полученного от 150 поставщиков. Определяли общую бактериальную обсеменённость, количество лактобактерий, бактерии группы кишечных палочек (БГКП) и *E.coli*, количество спор аэробных бацилл, количество солетолерантных стафилококков, а также титры лактококкофагов и колифагов.

Установили, что 57,3% хозяйств поставляли несортное молоко неудовлетворительного санитарного качества с общей микробной обсеменённостью свыше 4 млн. микробных тел в 1 см³. Заготавливаемое молоко 41,3% поставщиков было отнесено ко второму сорту, и только 1,3% хозяйств поставляли молоко первого сорта (табл. 1). Кроме того, в исследованном молоке выявлены также высокие (на уровне 10⁵ КОЕ/см³) концентрации солетолерантных кокков и спор мезофильных аэробных микроорганизмов (порядка 10⁴–10⁵ спор/см³ при норме не более 10² для выпуска стерилизованного молока).

Таблица 1

Качество молока различных поставщиков

Бактериальная обсеменённость (клеток в 1 см ³) Требования ГОСТ	Качество молока	Сорт	Количество хозяйств	
			Абсолютное количество	%
До 300 тыс. и от 300-500 тыс.	Очень хорошее, хорошее	Высший Первый	- 2	- (1,3±0,24%)
До 4 млн.	Удовлетворительное	Второй	62	(41,3±7,9%)*
Свыше 4 млн.	Неудовлетворительное	Несортное	80	(53,3±8,1%)*
Свыше 20 млн.	Очень плохое	Несортное	6	(4±1,5%)

*- различия статистически достоверны, $p < 0,05$.

Количество молочнокислых бактерий в заготавливаемом молоке различных поставщиков составляло от 2,0 до 25 млн. клеток в 1 см³. Наиболее типичными для исследуемой выборки оказались уровни обсеменённости сырого молока лактококками в пределах 2–2,5 и 6–9 млн. КОЕ/см³; остальные категории обсеменённости молока бактериями данной группы встречались с примерно одинаковой, достоверно не различающейся, частотой (табл. 2). Корреляционный анализ выявил достоверную положительную связь между титром лактококкофагов и концентрацией молочнокислых бактерий ($r=0,69$; $p=0,000016$), таким образом, по титрам лактококкофагов можно косвенно судить о содержании молочнокислых бактерий, и, следовательно, рассматривать лактококкофаги как показатель санитарного состояния сырого молока.

Таблица 2

Уровень обсеменения сырого молока лактобактериями и лактококкофагами

Количество молочнокислых бактерий (КОЕ/см ³)	Количество хозяйств		Титр лактококкофагов	
	Абсолютное количество	%	Тест на сквашивание	Метод агаровых слоев
2-2,5 млн.	41	(27,3±7,1%)*	10 ⁶	10 ⁶
2,5-6 млн.	24	(16,0±5,9 %)	10 ⁶	10 ⁶
6-9 млн.	46	(30,7±7,4 %)*	10 ⁶ - 10 ⁷	10 ⁶ - 10 ⁷
9-13 млн.	17	(11,3±5,1 %)	10 ⁷	10 ⁷
13 -25 млн.	22	(14,7±5,6 %)	10 ⁷ - 10 ⁸	10 ⁷ - 10 ⁸

*- различия статистически достоверны, p<0,05.

Бактерии группы кишечных палочек были обнаружены во всех исследованных пробах в концентрации от $2,0 \times 10^4$ КОЕ/см³ до $1,7 \times 10^7$ КОЕ/см³. Распределение образцов по трем градациям обсемененности представлено в таблице 3. Стоит отметить, что от 19 до 57% от общего количества выделенных штаммов составляли лактазаотрицательные кишечные палочки.

Таблица 3

Распределение хозяйств в зависимости от уровня микробного обсеменения сырого молока БГКП

Количество БГКП, КОЕ/см ³	Количество хозяйств	
	Абсолютное количество	%
От 20,2-22,7 тыс.	33	(22,0±6,7%)
От 124-203 тыс.	91	(60,6±7,9%)*
От 16-17 млн.	26	(17,3±6,1%)

*- различия статистически достоверны, p<0,05.

E. coli обнаружены в молоке всех исследованных проб. Их концентрация составляла от $1,5 \times 10^3$ до $2,3 \times 10^5$ КОЕ/см³; распределение образцов по градациям обсемененности данными бактериями приведено в таблице 4. Колифаги были обнаружены в молоке 124 хозяйств, т.е. в 82,6% исследованных проб, что подтверждает санитарно-показательное значение кишечных бактериофагов. (корреляция между количеством E. coli и титром колифагов на уровне $r=0,68$; $p=0,00031$).

Таблица 4

Распределение хозяйств по уровню присутствия в сыром молоке *E. coli* и колифагов

Количество <i>E. coli</i> , КОЕ/см ³	Количество хозяйств		Титр колифагов
	Абсолютное количество	% выявления	
От 1,5 - 10 тыс.	26	(17,3±6,1%)	-
От 11 - 92 тыс.	96	(64,0±7,7%)*	10 ⁴ - 10 ⁵
От 104 - 230 тыс.	28	(18,6±6,3%)	10 ⁵ - 10 ⁶

*- различия статистически достоверны, $p < 0,05$.

Микрофлора бактофугированного и пастеризованного молока

Для изучения влияния бактофугирования и пастеризации на микробную обсеменённость молока определяли общую бактериальную обсеменённость и количество спор аэробных бацилл. Данные исследования 240 проб молока (3 бактофуги) показывают, что в процессе бактофугирования сырого молока происходит закономерное снижение количества бактерий на 99,5% и бактериальных спор на 40%, а после пастеризации - на 99,87% и 87,5% соответственно, что обеспечивает длительное сохранение хорошего качества питьевого молока.

Таблица 5

Микробная обсеменённость сырого молока в процессе переработки**

Исследуемые образцы (n=80)	Общая микробная обсеменённость		Количество спор аэробных бацилл	
	КОЕ/см ³	% остаточной микрофлоры	КОЕ/см ³	% остаточной микрофлоры
Молоко до бактофугирования	$2,2 \times 10^7$	100	$1,5 \times 10^2$	100
Молоко после бактофугирования	$1,1 \times 10^3$ *	0,5	$9,0 \times 10^1$ *	60
Молоко до пастеризации	$3,5 \times 10^5$	100	$8,0 \times 10^1$	100
Молоко после пастеризации	$4,6 \times 10^2$ *	0,13	$1,0 \times 10^1$ *	12,5

* - различия статистически достоверны ($p < 0,05$).

**- на примере наиболее эффективной бактофугационной установки №1.

Микрофлора сухого обезжиренного молока

С целью изучения общей микробной обсеменённости, выявления лактококкофагов, присутствия бактерий группы кишечных палочек были проведены исследования 506 проб сухого обезжиренного молока, полученного от разных поставщиков.

Как следует из таблицы 6, преобладающее число проб сухого обезжиренного молока содержало микроорганизмы в концентрации менее 10⁵ КОЕ/г, что соответствует требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 предъявляемым к сухому обезжиренному молоку для промышленной переработки.

Титр лактококкофагов коррелировал с уровнем общей обсемененности данного сырья, а БГКП были обнаружены только в одном образце (0,19%) с максимальным уровнем обсемененности.

Таблица 6

Результаты микробиологического исследования сухого обезжиренного молока

Общее микробное обсеменение сухого обезжиренного молока			Лактококкофаги			БГКП	
КОЕ/г	Количество проб	% выявления	Количество проб	Титр	% выявления	Количество проб	% выявления
$1,0 \times 10^1$	1	0,19	-		-	-	-
$1,0 \times 10^2$	5	0,89	-		-	-	-
$1,0 \times 10^3$	141	25,1	18	10^2	3,55	-	-
$1,0 \times 10^4$	339	60,5	42	$10^3 - 10^4$	8,3	-	-
$1,0 \times 10^5$	20	3,57	4	10^5	0,79	1	0,19

Эффективность методов выявления лактококкофагов с использованием различных заквасочных культур

Целью данного исследования была оценка подверженности заквасочных культур, используемых на производстве, воздействию лактококкофагов и определение наиболее чувствительного метода выявления последних.

Таблица 7

Результаты исследования эффективности методов выявления лактококкофагов

Заквасочная тест-культура	Методы исследования					
	Тест на сквашивание		Однослойный метод		Метод агаровых слоев	
	Частота выявления лактофага (%)					
	Творог	Смывы	Творог	Смывы	Творог	Смывы
Choozit 230	46,7	43,3	36,7	36,7	73,3*	70,0*
Choozit 240	40,0	43,3	43,3	33,3	76,7*	70,0*
Lactina (LAT CW)	40,0	33,3	36,7	30,0	66,7*	60,0*
R-604	46,7	33,3	40,0	33,3	76,7*	70,0*
L. lactis	46,7	50,0	50,0	50,0	76,7*	83,3*

*- различия статистически достоверны, $p < 0,05$.

По результатам исследования 60 проб (30 фильтратов творога и 30 смывов) с использованием в качестве тест-культур различных заквасок промышленного производства, а также чистой культуры *Lac. lactis*, обнаружено, что метод агаровых слоев достоверно чувствительнее (83,3%), чем тест на сквашивание и однослойный метод ($p < 0,05$), между которыми достоверных различий не выявлено (см. табл. 7). Наибольшую чувствительность анализу обеспечило использование в качестве тест-культуры штамма *Lac. lactis* и, в меньшей степени, заквасок Choozit 240 и R-604. Наиболее устойчивой к воздействию лактококкофагов (и, соответственно,

наименее пригодной в качестве тест-объекта) оказалась закваска *Lactina* (LAT CW).

Таким образом, наиболее эффективным методом выявления лактококкофагов является метод агаровых слоёв с использованием в качестве тест-культуры штамма *Lac. lactis*.

Сравнительный анализ методов выявления лактококкофагов при производстве творога

Далее, используя отобранную тест-культуру, провели сравнительный анализ трех методов выявления лактококкофагов: теста на сквашивание, однослойного метода и метода агаровых слоев. С их помощью проанализировали по 100 проб каждого наименования (см. табл. 8). Обнаружили, что наименьшее количество случаев выявления лактофагов наблюдалось при проведении анализа однослойным методом, а наибольшее – методом агаровых слоёв, однако достоверных различий в чувствительности методов не выявлено.

Таблица 8

Выявляемость лактококкофагов различными методами

Исследуемые образцы	Количество положительных проб					
	Тест на сквашивание		Однослойный метод		Метод агаровых слоев	
	Абсолютные числа	%	Абсолютные числа	%	Абсолютные числа	%
Сырое молоко	77	77± 8,2	73	73±8,7	79	79±7,9
Сырые сливки	73	73± 8,7	68	68±9,1	75	75 ± 8,5
Закваска	7	7 ± 1,8	7	7±1,8	7	7±1,8
Пастеризованное молоко	62	62± 9,5	57	57± 9,7	65	65±9,3
Заквашенная смесь	67	67± 9,2	60	60±9,6	69	69±9,1
Творог (колье)	69	69± 9,1	65	65±9,3	72	72±8,8
Творог (сепарированный)	70	70± 8,9	66	66±9,3	73	73±8,7
Творожная сыворотка	51	51± 9,8	48	48±9,7	55	55±9,7
Смывы с оборудования	27	27± 8,7	24	24±8,4	28	28±8,8
Воздух	н.д.		18	18±7,5	18	18±7,5

н.д. – нет данных.

Кроме того, установили, что частота обнаружения бактериофага в закваске достоверно меньше, чем в других исследуемых объектах ($p<0,05$). Далее по возрастанию процента выявляемости лактококкофагов следуют смывы с оборудования и пробы воздуха. В сыром молоке, сырых сливках, пастеризованном молоке, заквашенной смеси, колье, твороге (сепарированном) и творожной сыворотке бактериофаги были обнаружены в половине и более от общего числа исследуемых проб, а частота выявления положительных проб

достоверно не различалась. Распределение лактококкофагов в объектах кисломолочного производства (с учетом данных исследований сырого и бактофугированного молока) показано на рисунке 1.



Рис. 1. Выявляемость лактококкофагов при производстве творога

Микрофлора воздуха цехов производства кисломолочных продуктов

Проведено исследование количества и частоты выявления различных групп микроорганизмов в воздухе транспортного коридора, участка производства кефира, ряженки и простокваши («диетцеа»), участка производства йогурта и творога. В каждом цехе исследовали по 240 проб воздуха. Посевы производили седиментационным методом (в течение 5 минут), а также аспирационным методом при помощи приборов ПУ-1Б и MAS-100Есо (каждым методом исследовали по 80 проб воздуха). В последних случаях воздух прокачивался на плотные питательные среды в течение 1 минуты, при этом количество пропускаемого через прибор воздуха составляло 100 л. При анализе результатов исследования производили перерасчет содержания общего количества микроорганизмов в 1 м^3 воздуха.

Наиболее эффективным методом выявления микроорганизмов в воздухе производственных цехов являлся аспирационный метод исследования при

помощи прибора MAS 100 Eco. Аспирационный метод с использованием прибора ПУ-1Б по эффективности обнаружения микроорганизмов в воздухе занимал промежуточное положение между седиментационным и аспирационным методом с использованием аппарата MAS 100 Eco.

Таблица 9

Микрофлора воздуха производственных цехов

Микробиологические показатели	Количество микроорганизмов											
	Транспортный коридор			Участок пр-ва кефира, ряженки, простокваши			Участок пр-ва йогурта			Участок пр-ва творога		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
КМАФАнМ												
Число положительных проб	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
% выявления	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
КОЕ/м ³	4600	5300	5900	1578	2110	2220	1000	1162	1178	567	620	644
Дрожжи												
Число положительных проб	38	55	60	19	26	31	13	18	23	10	14	16
% выявления	48*	69	75	24**	33	39	16	23	29	13	18	20
КОЕ/м ³	200	260	300	110	170	200	67	88	100	45	66	72
Плесени												
Число положительных проб	74	80	80	20	25	29	16	22	27	17	23	27
% выявления	93*	100	100	25	31	36	20	28	34	21	29	34
КОЕ/м ³	650	710	750	400	467	493	480	540	576	367	413	427
Лактококкофаги												
Число положительных проб	36	44	47	18	24	28	23	27	30	28	34	37
% выявления	45	55	59	23	30	35	29	34	38	35	43	46
БОЕ/м ³	200	260	280	164	203	213	78	111	117	68	100	108

КМАФАнМ – количество мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов.

БОЕ – бляшкообразующие единицы.

* - различия достоверны по сравнению с двумя другими методами, $p < 0,05$.

** - различия достоверны по сравнению с прибором MAS 100 Eco, $p < 0,05$.

1-седиментационный метод;

2-аспираторный метод прибор ПУ-1Б;

3- аспираторный метод прибор MAS 100 Eco.

При сравнении микрофлоры воздуха различных производственных помещений за основу брали показатели, полученные при использовании аппарата MAS 100 Есо. Наибольшая общая микробная обсеменённость воздуха была характерна для транспортного коридора; далее этот показатель снижался в ряду диетцех – участок производства йогурта – участок производства творога ($5266,7 \pm 375,6$, $1969,3 \pm 198,2$, $1113,3 \pm 56,9$ и $610,3 \pm 22,7$ КОЕ/м³ соответственно, указанные различия достоверны для $p=0,000245 \div 0,0012$).

По уровню обсемененности воздуха дрожжами, плесенями и лактококкофагами обследованные помещения образовывали аналогичный ряд: транспортный коридор – диетцех – участок производства йогурта – участок производства творога (содержание дрожжей: $253,3 \pm 29,1$, $160,0 \pm 26,5$, $85,0 \pm 9,6$ и $61,0 \pm 8,2$ КОЕ/м³ соответственно; содержание плесеней: $703,3 \pm 29,1$, $453,3 \pm 27,7$, $532,0 \pm 28,0$ и $402,3 \pm 18,1$ КОЕ/м³ соответственно; содержание лактококкофагов: $246,7 \pm 24,0$, $193,3 \pm 14,9$, $102,0 \pm 12,1$ и $92,0 \pm 12,2$ БОЕ/м³ соответственно), однако достоверность различий между участками по этим показателям варьировала.

Микрофлора и эффективность дезинфекции производственного оборудования

Целью данного исследования являлось определение эффективности дезинфекции производственного оборудования дезинфицирующим средством «Неосептал ПЕ - 15» (Германия). Данный препарат является водным раствором стабилизированной смеси перекиси водорода и надуксусной кислоты (НУК).

Объектами дезинфекции служили внешняя поверхность резервуаров молочных цистерн. В процессе исследования устанавливали наличие БГКП, *E. coli*, дрожжей, плесеней, лактофагов, колифагов до и после проведения дезинфекции (по 80 смывов).

Для проведения эксперимента готовили рабочие растворы средства с концентрацией 0,09%; 0,12%; 0,15% по препарату и 0,015%; 0,020%; 0,025% по надуксусной кислоте (НУК) соответственно.

Для удаления белково-жировых загрязнений с поверхностей оборудования проводили механическую мойку тёплой водой ($50-55^{\circ}\text{C}$) в течение 5 минут. Затем осуществлялась обработка щелочным средством «Деомол – А» (Воскресенский завод химических реагентов) с температурой 70°C в течение 5 минут, ручная механическая обработка поверхностей щётками, ополаскивание чистой водой с температурой $22-25^{\circ}\text{C}$ от щелочного средства в течение 5 минут. Далее на поверхности оборудования наносили

растворы «Неосептал ПЕ 15» с температурой 15-45⁰С. Расход рабочих растворов составлял 0,3 дм³ на 1 м², а экспозиция – 10 мин. Удаление дезинфицирующих растворов производили путём ополаскивания чистой водой с температурой 22-25⁰С в течение 10-15 минут.

Как видно из рисунка 2, обработка 0,09%-м раствором «Неосептал ПЕ - 15» обеспечивала полную инактивацию БГКП, E. coli и бактериофагов, и снижала частоту обнаружения дрожжей и плесеней в 14 и 4 раза соответственно. Использование растворов в концентрациях 0,12% и 0,15% приводило к полной дезинфекции поверхностей. Таким образом, наиболее эффективной и экономически обоснованной являлась дезинфекция с использованием средства в концентрации рабочего раствора 0,12% (0,020% надуксусной кислоты) с экспозицией 10 минут.

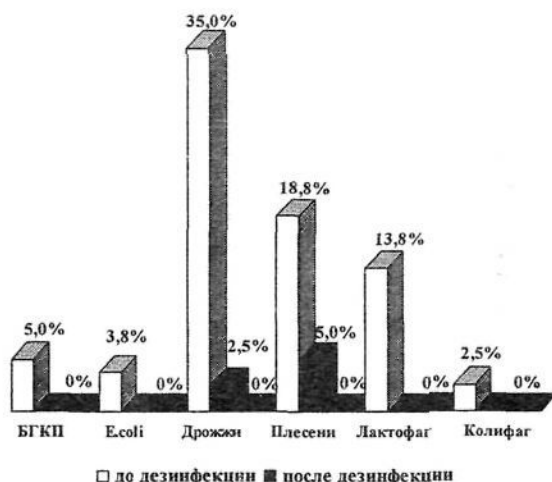


Рис. 2. Результаты изучения эффективности применения «Неосептал ПЕ - 15» в концентрациях 0,09%, 0,12%, 0,15% для дезинфекции молочного оборудования

ВЫВОДЫ

1. При исследовании микрофлоры заготавливаемого сырого молока выявлено, что достоверно большее число хозяйств поставляли несортное молоко и молоко второго сорта (53,3% и 41,3% соответственно).

Преобладающее число проб сухого обезжиренного молока, напротив, соответствовало требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01.

2. Установлено, что основными источниками лактококкофагов в объектах кисломолочного производства творога являлись: сырое молоко 99,9%, бактофугированное молоко 84%, сырые сливки 75%. В твороге, заквашенной смеси, пастеризованном молоке, творожной сыворотке частота выявления лактококкофагов составила 73%, 69%, 65%, 55% соответственно. В смывах с оборудования, воздухе, сухом обезжиренном молоке, закваске частота обнаружении составила 28%, 18%, 12,6%, 7% соответственно. Титры лактококкофагов и колифагов в заготавливаемом сыром и сухом обезжиренном молоке достоверно коррелировали с концентрацией соответствующих им бактерий и могут служить показателем санитарного состояния молока.

3. Определено, что наиболее эффективным методом выявления лактококкофагов являлся метод агаровых слоёв. Частота выявления лактококкофагов этим методом составила от 60,0% – 83,3%.

4. Наибольшую чувствительность методам обнаружения лактококкофагов обеспечивало использование в качестве тест-объекта чистой культуры *Lactococcus lactis*.

5. Выявлено достоверное снижение общей бактериальной обсеменённости после бактофугирования в среднем в 91 раз (97,8%), после пастеризации - в 822 раза (99,8%); уменьшение количества бактериальных спор после бактофугирования в среднем в 1,6 раза (38,2%), после пастеризации - в 3,9 раза (58,9%). Таким образом, пастеризация в сравнении с бактофугированием обеспечивает более эффективное снижение общей микробной обсеменённости сырья, но статистически достоверное снижение содержания жизнеспособных спор наблюдали только в одной установке.

6. Установлено, что наиболее эффективным методом выявления микроорганизмов в воздухе являлся аспирационный метод исследования при помощи прибора MAS-100 Есо. Выявлено, что наиболее обсеменённым являлся воздух транспортного коридора молокоперерабатывающего предприятия, далее по микробной обсеменённости и выявленных частиц лактококкофагов следовали диетцех, участок производства йогурта и участок производства творога.

7. Наиболее эффективной и экономически обоснованной являлась дезинфекция с использованием средства «Неосептал ПЕ-15» в концентрации рабочего раствора 0,12% с экспозицией 10 минут.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. С целью осуществления систематического мониторинга фаговой ситуации на молокоперерабатывающих предприятиях компании «Вимм-Билль-Данн» разработана и утверждена рабочая инструкция методов обнаружения бактериофагов, что позволяет своевременно выявлять бактериофаги, оценивать фаговую ситуацию и осуществлять профилактику экономических потерь, связанных с нарушением кисломолочного процесса при производстве продукции.

2. Предложен эффективный метод выявления микроорганизмов в воздухе производственных помещений при помощи прибора MAS-100 Eco, что позволяет быстро и качественно провести оценку санитарного состояния воздушной среды производственных цехов и вспомогательных помещений.

3. Внедрён в производственную практику усовершенствованный метод дезинфекции производственных цехов и молочного оборудования при помощи дезинфицирующего средства «Неосептал ПЕ-15».

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Ментюков Г.А. Лакто- и колифаги как показатели санитарно-гигиенического качества сырого молока / Г.А. Ментюков, П.П. Степаненко // Материалы 5-ой Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарного контроля и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции». – М., 2004. - С. 77-78.
2. Ментюков Г.А. Санитарно-микробиологическое качество сырого молока, поступающего на переработку / Г.А. Ментюков, П.П. Степаненко // Материалы 5-ой Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарного контроля и биологической безопасности сельскохозяйственной продукции». – М., 2004. - С. 32-33.
3. Ментюков Г.А. Санитарное качество заготавливаемого молока / Г.А. Ментюков, П.П. Степаненко // Научно-практический информационный журнал Практик. - СПб, 2005. - С. 32-34.
4. Ментюков Г.А. Сравнительная микробиологическая характеристика сухого обезжиренного молока / Г.А. Ментюков, С.С. Шихов // Материалы 5-ой Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения». – М., 2006. - С. 276-277.
5. Ментюков Г.А. Сравнительная микробиологическая характеристика сырого молока разных регионов / Г.А. Ментюков, С.С. Шихов // Материалы 5-ой Международной научной конференции студентов и молодых ученых «Живые системы и биологическая безопасность населения». – М., 2006. - С. 277-278.
6. Ментюков Г.А. Оценка санитарно-микробиологических показателей заготавливаемого и бактофугированного молока / Г.А. Ментюков, С.С. Шихов // Гигиена и санитария. – 2007.- №6.- С. 62-64.
7. Ментюков Г.А. Эффективный метод выявления лактофага в смывах с молочного оборудования (танков) и в твороге / Г.А. Ментюков, П.П. Степаненко, С.С. Шихов // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2007. - №6. - С. 63-66.

Подписано в печать 01.10.2008 г.

Печать трафаретная

Заказ № 886

Тираж: 100 экз.

Типография «11-й ФОРМАТ»

ИНН 7726330900

115230, Москва, Варшавское ш., 36

(499) 788-78-56

www.autoreferat.ru