

PACKAGING FRESH AND CURED MEAT

K1.

THE XXth EUROPEAN MEETING OF MEAT RESEARCH INSTITUTES
 THE ALL-UNION RESEARCH INSTITUTE OF MEAT INDUSTRY USSR
 MORPHOLOGICAL CHANGES IN PSYCHROPHILE BACTERIA DURING CHILLED
 MEAT NITROGEN-STORAGE

L.V.KOULIKOVSKAYA, G.A.BALANDINA, A.I.PISKARYOV

SUMMARY

The inhibiting effect of 99%-nitrogen-containing atmosphere upon chilled meat aerobic psychrophiles was established microbiologically.

Electron microscopy indicated that the above atmosphere caused changes in aerobic psychrophiles' morphology. Prolonged exposure to the nitrogen atmosphere resulted in the fact that the majority of these microorganisms underwent various morphological changes characterizing the process of cell death.

Long absence of oxygen affected aerobes' metabolism, this, in its turn, decreasing their electron-optical density and causing lysis and autolysis.

Such phenomena prove deep biochemical re-arrangements inside the cells, which are connected with the disintegration of high-molecular compounds and their conversion into low-molecular ones.

The determination of the quantitative and qualitative compositions of the microflora growth of lactobacilli on meat by the 20th day of storage.

RESUME

L'étude microbiologique a démontré l'action accablante de l'atmosphère à teneur en azote de 99% sur le développement des aérobies psychrophiles de la viande réfrigérée.

Les recherches à microscope électronique ont révélé que l'atmosphère de l'azote de 99% de concentration provoque de changements de la morphologie des aérobies psychrophiles. La plupart de ces microorganismes subit de différentes transformations morphologiques caractérisant le processus de la disparition des cellules à la suite d'un long séjour à l'atmosphère de l'azote.

Une absence prolongée de l'oxygène se ressent sur le métabolisme des aérobies ce qui amène à son tour à la diminution de la densité électrono-optique, à la lysis et à l'autolyse.

Les phénomènes pareils témoignent de profondes transformations biochimiques survenant à l'intérieur de la cellule, liées à la désintégration des liaisons macromoléculaires et à leur passage à celles micromoléculaires.

La détermination du contenu qualitatif et quantitatif de la microflore prélevée de la viande réfrigérée a montré que vers la fin de 20 jours de la conservation il est observé sur la viande la croissance des bactéries du type Lactobacillus.

DER XX. EUROPÄISCHE KONGRESS DER FLEISCHFORSCHUNGSINSTITUTE
 ALLUNIONS-FORSCHUNGSINSTITUT DER FLEISCHWIRTSCHAFT DER UdSSR
 MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN VON PSYCHROPHILEN BAKTERIEN BEI DER
 LAGERUNG DES ABGEKÜHLTEN FLEISCHES IN DER STICKSTOFFATMOSPHERE

L.V.KULIKOVSKAYA, G.A.BALANDINA, A.I.PISKAREV

ZUSAMMENFASSUNG

Bei mikrobiologischen Untersuchungen wurde es festgestellt, daß die Stickstoffatmosphäre (99%) die Entwicklung von aeroben psychrophilen Bakterien im abgekühlten Fleisch hemmt.

Die elektronen-mikroskopischen Untersuchungen ergaben, daß die Stickstoffatmosphäre bei 99%-iger Konzentration zur Veränderung der Morphologie von aeroben psychrophilen Bakterien führt. Beim längeren Aufenthalt in der Stickstoffatmosphäre unterliegt der größte Teil dieser Mikroorganismen den unterschiedlichen morphologischen Veränderungen, die den Zellenabsterbevorgang charakterisieren.

Die lange Sauerstoffabwesenheit wirkte auf den Metabolismus von aeroben Bakterien ein, was seinerseits zur Herabsetzung deren elektronen-optischen Dichte, Lysis und Autolyse führte.

Diese Erscheinungen zeugen von den tiefen biochemischen Umwandlungen im Zellinneren, die mit der Desintegration von hochmolekularen Verbindungen und deren Übergang in die niedermolekularen zusammenhängen.

Die Bestimmung der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung der aus dem abgekühlten Fleisch isolierten Mikroflora ergab, daß es zum 20. Lagerungstag das Wachstum der Bakterien der Lactobacillus-Gruppe hauptsächlich beobachtet wird.

XX ЕВРОПЕЙСКИЙ КОНГРЕСС РАБОТНИКОВ НИИ МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ
 ВСЕСОЮЗНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
 МЯСНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ СССР
 МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПСИХРОФИЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ ПРИ ХРАНЕНИИ
 ОХЛАЖДЕННОГО МЯСА В АТМОСФЕРЕ АЗОТА

Л.В.КУЛИКОВСКАЯ, Г.А.БАЛАНДИНА, А.И.ПИСКАРЕВ

АННОТАЦИЯ

Микробиологическими исследованиями установлено угнетающее действие атмосферы с содержанием 99% азота на развитие аэробных психрофильных бактерий на охлажденном мясе.

Электронномикроскопические исследования показали, что атмосфера азота 99%-ной концентрации вызывает изменения в морфологии аэробных психрофильных бактерий. При длительном пребывании в атмосфере азота большая часть этих микроорганизмов подвергалась различным морфологическим изменениям, которые характеризуют процесс отмирания клеток.

Длительное отсутствие кислорода сказалось на метаболизме аэробных бактерий, что, в свою очередь, привело к снижению их электроннооптической плотности, лизису и автолизу.

Подобные явления свидетельствуют о происходящих глубоких биохимических перестройках внутри клетки, связанных с дезинтеграцией высокомолекулярных соединений и переходом их в низкомолекулярные.

Определение количественного и качественного состава микрофлоры, выделенной с охлажденного мяса, показало, что к концу 20-суточного хранения на мясе наблюдается преимущественно рост бактериальной группы Lactobacillus.

PACKAGING FRESH AND CURED MEAT

Наличие на охлажденном мясе психрофильных микроорганизмов является одной из основных причин нестойкости и изменения его товарного вида в процессе обычного аэробного холодильного хранения /1, 2/.

При некоторых изменениях условий роста микроорганизмов, например состава среды, потребность микроорганизмов в свободном кислороде и их отношение к его воздействию также могут меняться. В этой связи замещение кислорода газообразным азотом может оказать значительный эффект и удлинить сроки хранения охлажденного мяса. Концентрация азота в атмосфере 76% не препятствует росту психрофильных бактерий. Ранее было установлено, что в атмосфере азота 90%-ной концентрации (при температуре 0°C) активный рост микроорганизмов начинается на 6 сутки, а на 14 - общее содержание бактерий составляет 10^8 клеток на 1 см^2 поверхности мяса. При этом, органолептически отмечали потемнение, ослизнение и потерю товарного вида мяса, что ограничивало срок его хранения /3/.

Начало изменений товарного вида мяса при хранении его в атмосфере азота 95%-ной концентрации отмечали на 18 сутки, а общее количество бактерий к этому времени составляло 10^7 на 1 см^2 поверхности.

При хранении охлажденного мяса в атмосфере азота 99%-ной концентрации в течение 9 сут. общее количество бактерий оставалось на исходном уровне и лишь на 13 сут. наблюдалось увеличение их количества преимущественно за счет развития бактерий *Lactobacillus* группы *Betabacterium*.

Снижение содержания кислорода в атмосфере (замещение его азотом 99%-ной концентрации) способствовало угнетению роста типичной аэробной микрофлоры, вызывающей порчу мяса при хранении его на воздухе, а также приводило к изменению качественного состава микроорганизмов, что обеспечило продление срока хранения охлажденного мяса при температуре 0°C до 20 суток.

Механизм воздействия повышенного содержания азота на микробную клетку не выяснен.

Целью настоящей работы являлось наблюдение с помощью метода электронной микроскопии за морфологическими изменениями аэробных бактерий рода *Pseudomonas* в атмосфере с высоким содержанием азота.

Моделью служили бактерии вида *Pseudomonas fluorescens* штамм № 146, выделенные с поверхности мышечной ткани говядины.

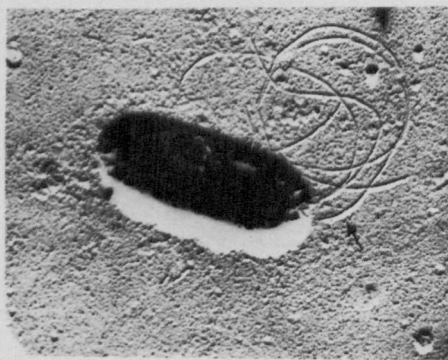


Рис. 1. Контрольные клетки *Pseudomonas fluorescens*. Бактерии имеют плотную гомогенную цитоплазму. Стрелкой показаны жгутики (увеличение в 40000 раз)

При высеве этих микроорганизмов на питательную среду через 48 час. наблюдали сплошной рост бактерий.

После 3 сут. пребывания микроорганизмов в атмосфере азота отмечена некоторая разлитость контуров их клеточной стенки. Бактерии принимали округлую форму. В цитоплазме хорошо просматривались гранулы различной электроннооптической плотности. Жгутики сохраняли видимую целостность (рис. 2). При высеве этих бактерий на питательную среду через 48 час. наблюдали рост бактерий, но менее густой, чем в контроле.

Пребывание бактерий в течение 6 сут. в атмосфере азота приводило у некоторых клеток к тому, что оболочки незначительно отходили от протопласта. Цитоплазма микроорганизмов имела пониженную и неравномерную электроннооптическую плотность, а жгутики сохраняли свою видимую целостность. На питательной среде через 48 час. отмечали меньшее число колоний, чем в контроле.

При длительном (9 сут.) нахождении бактерий в атмосфере с высоким содержанием азота значительно понижалась электронноопти-

Микроорганизмы выращивали в чашках на мясо-пептонном агаре (МПА) в течение 48 час. при 25°C. Затем чашки помещали в контейнер и создавали атмосферу с концентрацией газообразного азота 99,0% при 0°C. Заданную концентрацию азота контролировали и поддерживали в течение опыта на одном уровне. Контролем служили посевы аналогичных микроорганизмов, которые выдерживали в воздушной атмосфере.

Через 3, 6 и 9 сут. петлю бактериальной культуры из посева в чашках переносили в стерильный физиологический раствор, из которого высевали 1 мл взвеси на МПА для учета количества жизнеспособных клеток, и параллельно готовили образцы для электронной микроскопии. В последнем случае бактериальную взвесь наносили на металлические сеточки с коллодиевой подложкой и фиксировали в парах 10%-ного формальдегида в течение 15 минут.

Для очистки образцов от питательной среды использовали метод капельного диализа /4/.

Чтобы повысить контрастность исследуемого объекта при микроскопии, бактерии отеняли металлами. Напыление проводили в вакуумной камере типа ДЖЭМ-46. В качестве напылителя использовали фольгу фрамовую проволоку. Угол отенения - 45°. Образцы просматривали под электронным микроскопом УЭМБ - 100 Б. Электроннограммы получали на пластинках МР при инструментальном увеличении в 20000 и 30000 раз. Каждый опыт контролировали.

В культурах 48-часового возраста встречались клетки, находящиеся в различных стадиях онтогенеза. Однако, если большинство клеток в препаратах в поле зрения электронного микроскопа выглядело однотипно, то особенности строения именно этих клеток и принимались как характерные.

Изучение структуры клеток *Pseudomonas fluorescens*, выращиваемых в обычной атмосфере в течение 3, 6 и 9 сут., показало, что бактерии имели вид палочек с округленными концами. Клетки достигали в длину 2μ , в ширину - $0,5 \mu$. На одном из полюсов клетки располагались жгутики (1-3), с волнистыми контурами и в несколько раз длиннее клетки. Диаметр жгутиков достигал 250 \AA . Цитоплазма бактерий имела высокую электроннооптическую плотность (рис. 1).

Ческая плотность цитоплазмы бактерий, ее грануляция. Жгутики сохраняли видимую целостность (рис. 3а). Часто в поле зрения электронного микроскопа встречались лизированные клетки с полностью разрушенной оболочкой. Они имели вид бесформенных комочков, вероятно, остатков цитоплазмы (рис. 3б). Отмечали образование нитевидных форм бактерий, в 10-12 раз длиннее контрольных клеток. При высеве этих микроорганизмов на питательную среду наблюдали рост лишь единичных колоний.

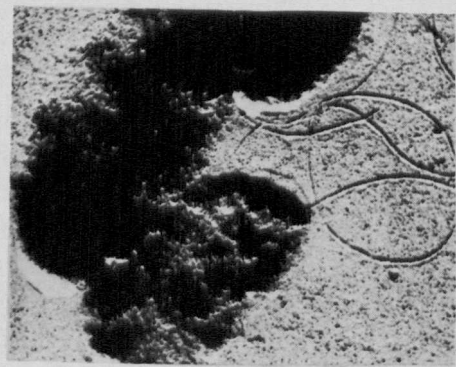
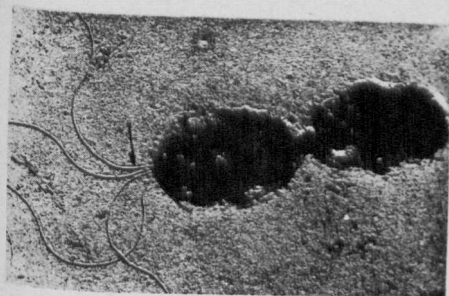


Рис. 2. Морфология *Pseudomonas fluorescens* спустя 3 сут. хранения в атмосфере азота. Видно просветленные цитоплазмы и ее грануляция (увеличение в 40000 раз)

PACKAGING FRESH AND CURED MEAT



а



б

Рис. 3. Морфология *Pseudomonas fluorescens* спустя 9 сут. хранения в атмосфере азота: а) цитоплазма бактерий просветлена; б) лизированные клетки (увеличение в 35000 раз)

Таким образом было установлено, что атмосфера азота 99%-ной концентрации вызывает изменение морфологии аэробных психрофильных бактерий *Pseudomonas fluorescens*. При длительном пребывании в атмосфере азота большая часть их подвергалась различным морфологическим изменениям, характеризующим процесс отмирания клеток. Это подтверждалось высевами на питательную среду и типичной морфологической картиной, так как известно, что отмирающие клетки под электронным микроскопом выглядят более прозрачными, иногда совсем пустыми, с немногочисленными плотными гранулами, в то время как живые - темные, с плотной гомогенной цитоплазмой/5/.

Можно предположить, что длительное отсутствие кислорода сказалось на метаболизме аэробных бактерий *Pseudomonas fluorescens*, что в свою очередь привело к снижению их электроннооптической плотности, лизису и автолизу, а это, согласно данным /6/, свидетельствует о происходящей глубокой биохимической перестройке внутри клетки, связанной с дезинтеграцией высокомолекулярных соединений и переходом их в низкомолекулярные.

Описанные морфологические изменения бактерий *Pseudomonas fluorescens* на охлажденном мясе при хранении его в атмосфере азота 99%-ной концентрации, возможно, еще усугублялись понижением pH на поверхности говядины /6/.

Что же касается образования нитевидных форм бактерий, то такое явление часто наблюдается в микробной популяции при воздействии различных неблагоприятных факторов и объясняется угнетением синтеза ДНК, ответственной за нормальный процесс деления клетки /6/.

ВЫВОДЫ

Атмосфера с 99%-ной концентрацией азота оказывает угнетающее действие на развитие психрофильных бактерий вида *Pseudomonas fluorescens*, что дает возможность продлить срок хранения охлажденного мяса до 20 суток.

Большинство бактерий, находящихся длительное время в атмосфере с высоким содержанием азота, постепенно претерпевает значительные морфологические изменения: от просветления и грануляции цитоплазмы до разрушения клеточных стенок и лизиса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hallett F., Ball G., Stier E. "Food Technol", 5, 12, 1958.
2. Носкова Г.Л. Микробиология мяса при холодильном хранении. М., "Пищевая промышленность", 1972.
3. Куликовская Л.В., Пискарев А.И., Вандина Г.А. The influence of caseous nitrogen atmosphere on chilled meat colour and microflora changes during storage. 18th Congress of meat industry, august, 1972, Ontario, Canada.
4. Бирюзова В.И. Электронномикроскопические методы исследования биологических объектов. М., АН СССР, 1963.
5. Мейсель М.Н. и др. О выявлении живых, поврежденных и мертвых микроорганизмов. "Микробиология", 30, вып. 5, 1961.
6. Крисс А.Е., Бирюзова В.И. Ускорение процессов распада бактериальной клетки под влиянием некоторых веществ. "Природа", 5, 1951.