

XIII Европейский конгресс работников НИИ мясной промышленности

Всесоюзный научно-исследовательский институт
мясной промышленности СССР

К ВОПРОСУ О ВЫЖИВАЕМОСТИ, РАЗВИТИИ И ТОКСИНООБРАЗОВАНИИ
Cl. perfringens В СЫРОКОПЧЕНОЙ КОЛБАСЕ
В ПРОЦЕССЕ ЕЕ ПРОИЗВОДСТВА И ХРАНЕНИЯ

Всесоюзный научно-исследовательский институт
мясной промышленности

Е.Ф. Цыс, П.В. Петрова, М.М. Логина

Московский государственный медицинский
институт имени Н.И. Пирогова

Ю.П. Пивоваров

Московский технологический институт мясной
и молочной промышленности
В.С. Ничипорук

А Н Н О Т А Ц И Я

Изучались выживаемость, развитие и токсинообразование *Cl. perfringens* типа А, экспериментально инокулированных в фарш, в процессе изготовления колбасы из этого фарша и хранении ее при различных температурах. Приводятся результаты экспериментов *in vitro* по влиянию на этот микроорганизм поваренной соли, нитритов и копильной жидкости ВНИИМПа в концентрациях, обычно имеющих в сырокопченой колбасе. Установлено, что *Cl. perfringens* выживают в сырокопченой колбасе, как в процессе ее изготовления, так и при хранении. Для быстрого обнаружения *Cl. perfringens* в продукте рекомендуется применять среду СПН (модифицированную среду TSN).

THE ALL-UNION RESEARCH INSTITUTE OF MEAT INDUSTRY
U S S R

ON THE QUESTION OF THE SURVIVAL, DEVELOPMENT AND TOXIN
PRODUCTION OF CL.PERFRINGENS IN SMOKED DRY SAUSAGE DURING
ITS MANUFACTURE AND STORAGE

E.F.Tsyss, P.V.Perova, M.M.Loginova,
The All-Union Research Institute of Meat Industry;

Yu.P.Pivovarov,
The IInd N.I.Pirogov Moscow State Medical Institute;
V.S.Nitchiporouk,
The Moscow Technological Institute of Meat and Dairy Industries

S U M M A R Y

The survival, development and toxin production of Cl.perfringens type A, experimentally inoculated into the minced meat, were studied during dry sausage manufacture and storage at various temperatures. The results of the in vitro experiments are given on the effect of NaCl, nitrites and the liquid smoke of the VNIIMP in concentrations, usually present in smoked dry sausage, on this microorganism. Cl. perfringens was found to survive in smoked dry sausage both during manufacture and storage of the latter. For a rapid detection of Cl. perfringens in products the "CHH"-medium (the modified TSM medium) is recommended.

ZUR FRAGE DES UBERLEBENS, DER ENTWICKLUNG UND TOXINBILDUNG
VON CL.PERFRINGENS IN ROHWURST WAHREND DEREN
HERSTELLUNG UND LAGERUNG

E.F.Zyss, P.W.Perowa, M.M.Loginowa,
Allunions-Forschungsinstitut der Fleischwirtschaft;

Yu.P.Piwowarow,

2. Moskauer Staatliches medizinisches Institut;

W.S.Nitschporuk,

Moskauer technologisches Institut der Fleisch- und
Milchwirtschaft

Z U S A M M E N F A S S U N G

Das Überleben, die Entwicklung und Toxinbildung von Cl. perfringens, Typ A, die in die Wurstmasse experimentell eingepflegt worden waren, wurden im Laufe der Herstellung und nachfolgender Lagerung der Wurst bei verschiedenen Temperaturen studiert. Die Ergebnisse der Versuche in vitro über den Einfluß von Kochsalz, Nitriten und Räucherpräparat von VNIIMP in den Konzentrationen, die gewöhnlich in Rohwurst enthalten sind, werden angeführt. Es wurde festgestellt, daß Cl. perfringens in der Rohwurst sowie während deren Herstellung als auch bei der Lagerung überleben. Für einen schnellen Nachweis von Cl. perfringens im Produkt wird der Nährboden CHH (der modifizierte Nährboden TSN) empfohlen.

L'INSTITUT DE RECHERCHES SCIENTIFIQUES SUR LES VIANDES
DE L'URSS

SUR LA QUESTION DE LA SURVIE, DU DEVELOPPEMENT ET DE LA
FORMATION DES TOXINES CL. PERFRINGENS DANS LE SAUCISSON
SEC PENDANT SA PRODUCTION ET CONSERVATION

E.F.Tsiss, P.V.Pérova, M.M.Loguinova,
L'institut de recherches scientifiques sur les viandes de l'URSS;
J.P.Pivovarov,
Le 2-ème institut de médecine d'Etat de Moscou;
V.S.Nitchiporouk,
L'institut technologique de l'industrie de viande et
de lait de Moscou

S O M M A I R E

On étudiait la survie, le développement et la formation des
toxines Cl. perfringens du type A, inoculées expérimentalement
dans la farce lors de la production du saucisson et sa conserva-
tion aux températures différentes. On donne des résultats des ex-
périences in vitro de l'influence sur ce microorganisme du sel
commun, des nitrites et de la fumée liquide de VNIIMP dans les
concentrations qui se trouvent généralement dans le saucisson sec.
On établit que Cl. perfringens survivent dans le saucisson sec
lors de sa production comme pendant sa conservation. Pour la ré-
vélation rapide de Cl. perfringens dans le produit on recommande
d'utiliser le milieu CMH (le milieu modifié TSV).

К ВОПРОСУ О ВЫЖИВАЕМОСТИ, РАЗВИТИИ И ТОКСИНООБРАЗОВАНИИ

Cl. perfringens В СЫРОКОПЧЕНОЙ КОЛБАСЕ

В ПРОЦЕССЕ ЕЕ ПРОИЗВОДСТВА И ХРАНЕНИЯ

Е.Ф. Цыс, П.В. Перова, Ю.П. Пивоваров,

М.М. Логинова, В.С. Ничипорук

Работами ряда авторов, опубликованными в последние годы, установлено, что нередко *Cl. perfringens* присутствуют в сырокопченых колбасах, причем штаммы типа А выделяют наиболее часто /3/. В доступной литературе мы не встретили работ, посвященных изучению выживаемости, развития и токсинообразования *Cl. perfringens* в сырокопченной колбасе в процессе ее производства и хранения.

Нами предыдущие исследования /4/ показали, что в вареной колбасе, изготовленной из фарша, зараженного *Cl. perfringens*, этот микроорганизм не только выживает, но в некоторых случаях даже развивается. Были основания предполагать, что в сырокопченных колбасах условия среды заведомо менее благоприятны для развития и токсинообразования *Cl. perfringens* в связи с меньшим количеством влаги, наличием копильного препарата, несколько большим содержанием соли и нитрита. Наряду с этим отсутствие обжарки и варки сырокопченной колбасы создает потенциальную опасность сохранения в ней более значительного количества *Cl. perfringens*. В связи с этим важно было изучить степень предполагаемого неблагоприятного воздействия перечисленных выше факторов на выживаемость, развитие и токсинообразование этого микроорганизма в процессе производства и хранения сырокопченной колбасы.

В настоящей работе изучали:

- 1) влияние поваренной соли, нитрита и копильного препарата ВНИИМПа на жизнеспособность *Cl. perfringens* типа А;
- 2) выживаемость, развитие и токсинообразование *Cl. perfringens*, инокулированных в фарш, в процессе изготовления колбасы из этого фарша;
- 3) выживаемость, развитие и токсинообразование *Cl. perfringens*, инокулированных в сырокопченную колбасу, в процессе хранения ее

при различных температурах.

В описываемых ниже экспериментах использовали большое количество токсигенных (от 2 до 20 ДЛМ/мл) штаммов *Cl. perfringens* типа А, большинство которых выделены из мяса и мясoproductов.

Для количественного определения *Cl. perfringens* и демонстрации его роста использовали среду СПН, т.е. среду TSN (триптон-сульфит-неомициновую), модифицированную Сидоренко и Пивоваровым, в которой в качестве питательной основы использовали казеин-грибную среду, к которой добавляли 0,05% сернокислого (закисного) железа, 0,1% сульфита натрия, а также 200 ЕД/мл полимиксина и 50 ЕД/мл неомицина.

С целью проверки влияния различных компонентов, входящих в состав сырокопченых колбас, нами были поставлены четыре серии экспериментов *in vitro*

С этой целью в пробирки с 10 мл среды СПН вносили по 1 млн. микробных тел суточной культуры. Пробы хранились при температурах 18-22 и 30-35°, благоприятных для развития этого микроба. О характере роста штаммов судили по интенсивности изменения окраски среды.

В первой серии опытов на 30 штаммах *Cl. perfringens* изучали влияние поваренной соли при ее содержании от 4 до 8%. Как показали результаты исследований при 4 и 6% содержания поваренной соли подавляющее большинство штаммов растет хорошо, а 8% поваренной соли оказывает сдерживающее влияние на их размножение. Однако и при этой концентрации поваренной соли, особенно при температуре 30-35°, наблюдается рост большинства взятых в эксперимент штаммов, хотя и менее интенсивный (рис. 1).

На 16 штаммах изучали влияние нитритов при содержании их в среде от 2 до 20 мг%. Нитриты в указанных количествах не оказывали существенного влияния на размножение *Cl. perfringens*, хотя при содержании 20 мг% часть штаммов давала несколько более слабый по интенсивности рост (рис. 2). Отсутствие размножения у двух штаммов при температуре 18-22° было связано, очевидно, с индивидуальными свойствами штаммов, ибо аналогичная картина наблюдалась и в контроле (в среде СПН без добавления нитритов).

Эксперимент с копильной жидкостью показал, что предусмотренная технологическими условиями концентрация ее не влияет на размножение *Cl. perfringens* (рис. 3).

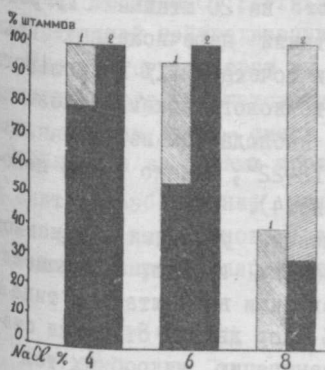


Рис. 1. Влияние поваренной соли на рост *Cl. perfringens*

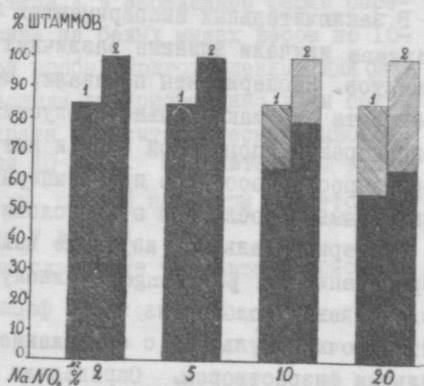


Рис. 2. Влияние нитритов на рост *Cl. perfringens*

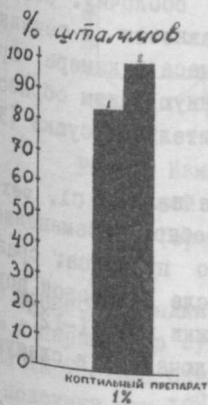


Рис. 3. Влияние копильного препарата на рост *Cl. perfringens*

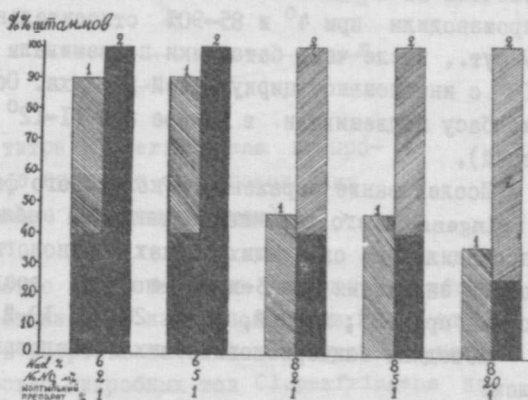


Рис. 4. Влияние различных сочетаний копильного препарата, поваренной соли и нитрита на рост *Cl. perfringens*

Примечания к рис. 1, 2, 3 и 4:

I - при 18-22°; 2 - при 30-35°;

■ - интенсивная реакция на среде СПН;

▨ - незначительная реакция на среде СПН.

В заключительных экспериментах *in vitro* на 20 штаммах *Cl. perfringens* изучали влияние различных сочетаний перечисленных компонентов. Эксперименты показали, что при сочетании 1% копильного препарата и максимально допустимых технологическими условиями концентраций поваренной соли и нитритов наблюдается некоторая задержка роста, особенно при температуре 18–22°; однако около половины штаммов росли и в этих условиях (рис. 4).

Экспериментальное изучение выживаемости, развития и токсинообразования *Cl. perfringens*, инокулированных в фарш, в процессе изготовления колбасы из этого фарша проводили на 3 штаммах типа А. Пятисуточную культуру с содержанием 85% спор дважды отмывали стерильным физраствором. Определяли концентрацию микробных тел в суспензии, после чего ее разводили стерильным физраствором и вводили в фарш из расчета 10^5 микробных тел на 1 г. Зараженный фарш перемешивали, добавляли в него копильный препарат ВНИИМПа (из расчета 10 мл на 1 кг) и набивали в натуральную оболочку. Осадку производили при 4° и 85–90% относительной влажности в течение 7 сут., после чего батончики подвешивали на 3 часа в камере при 18° с интенсивной циркуляцией воздуха. Обработанную таким образом колбасу подвешивали в камере при 11–12° для длительной сушки (30 дней).

Исследование зараженного колбасного фарша на наличие *Cl. perfringens* и его токсина, а также на общее микробное обсеменение, проводили на следующих этапах технологического процесса: сразу после заражения; на 3-й и 7-е сутки осадки; после 3-часовой подсушки при 18°; на 5-й, 10-й, 20-й и 30-й дни сушки при 11–12°.

Методика бактериологических исследований заключалась в следующем.

Из каждого батона брали среднюю пробу весом 5 г, растирали ее в стерильных ступках с 45 мл стерильного физраствора и засеивали 0,5 мл на 4,5 мл жидкой среды СПН. После этого проводили последовательный пересев десятикратных разведений в среду СПН для определения титра культуры *Cl. perfringens*. Посевы инкубировали при 46° с ежедневным просмотром реакции в течение 10 сут.

Общее микробное обсеменение определяли посевом в МПА методом залива с подсчетом колоний через 48 час. инкубации посевов при 37°.

Наличие токсина *Cl. perfringens* типа А в зараженном фарше определяли реакцией нейтрализации токсина на белых мышах весом по 10-12 г. Для этого фильтрат из каждой пробы, подготовленный для бактериологического исследования, вводили внутривенно двум белым мышам, а другим двум - смесь фильтрата с антитоксической сывороткой. Наблюдение за мышами продолжали 10 дней. Положительной реакцией считали заболевание или гибель первой пары при отсутствии отклонений от нормального состояния у второй.

Указанные выше эксперименты дали следующие результаты (рис.5).

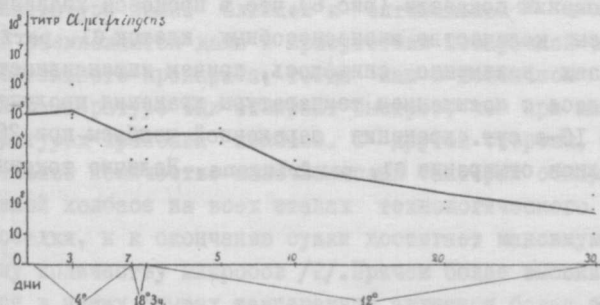


Рис.5. Изменение титра *Cl. perfringens* в сырокопченой колбасе в процессе ее изготовления (средние данные по трем штаммам)

В процессе осадки количество жизнеспособных клеток *Cl. perfringens* в первые 3-е сут. существенно не изменялось, а в конце этого этапа (к 7 сут.) снижалось в 10 раз. В течение последующей 3-часовой подсушки при 18° количество микробных тел *Cl. perfringens* незначительно увеличилось, а в процессе дальнейшей сушки при 12° неизменно уменьшалось. При этом в одном опыте уже на 10-е сут. сушки нам не удалось выделить жизнеспособных клеток *Cl. perfringens*, а в остальных опытах количество тест-культуры в колбасе к концу процесса (на 25-30 день) снизилось до $10-10^2$ микробных тел в 1 г. колбасы (рис.5).

Из экспериментально зараженной колбасы ни в одном случае не были выделены *B. proteus* и *B. coli*. Ни в одном случае не установлено также наличия токсина *Cl. perfringens* типа А.

Исследования выживаемости, развития и токсинообразования *Cl. perfringens* в сырокопченой колбасе в процессе ее хранения заключались в экспериментальном заражении готовой сырокопченой колбасы культурами 4 штаммов *Cl. perfringens* и последующем определении количества микробных тел этого микроорганизма и наличия в продукте токсина. Экспериментально зараженные колбасы хранились при трех температурных режимах (28-30, 18-20 и 4-6°) и исследовались через 6 и 12 час., 1, 2, 3, 5, 10 и 20 суток хранения. Методика исследований зараженной колбасы аналогична описанной выше.

Исследования показали (рис. 6), что в процессе хранения зараженной колбасы количество жизнеспособных клеток *Cl. perfringens* во всех случаях неизменно снижалось, причем интенсивность снижения увеличивалась с повышением температуры хранения продуктов. В одном случае на 10-е сут. хранения зараженной колбасы при 28-30° отмечалось полное отмирание *Cl. perfringens*. Наличие токсина не установлено.

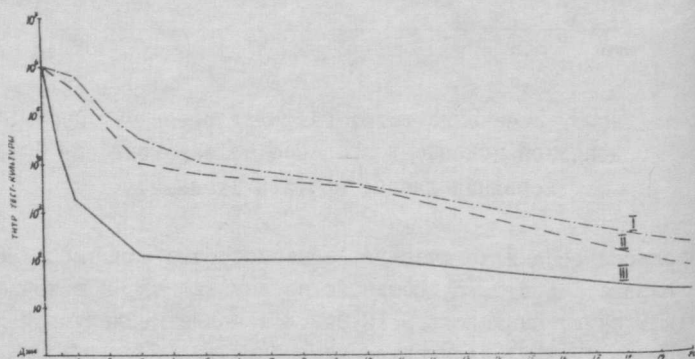


Рис. 6. Изменение титра *Cl. perfringens* в сырокопченой колбасе в процессе ее хранения: I - при 4-6°; II - при 18-22°; III - при 28-30° (средние данные)

Нами не установлено отрицательное влияние *Cl. perfringens* инокулированных в фарш сырокопченой колбасы, на органолептические показатели колбасы в процессе ее производства и хранения.

Анализ результатов всех описанных выше экспериментов позволяет

закл^ючить, что, в случае обсеменения мяса *Cl. perfringens* и изготовления из такого сырья сырокопченой колбасы, возможность развития этого микроба и накопления его токсина в колбасе к концу ее изготовления и в течение последующего хранения мало вероятна. Очевидно в комплексе факторов, влияющих на жизнеспособность *Cl. perfringens* в сырокопченой колбасе, ведущую роль в предупреждении развития и токсинообразования этого микроба играет интенсивное развитие микробов-антагонистов, главным образом молочнокислых бактерий.

Это подтверждается, с одной стороны, тем, что в стерильной среде при температуре более близкой к оптимальной *Cl. perfringens* интенсивнее размножаются даже в присутствии поваренной соли, нитритов и копильного препарата, тогда как в колбасном фарше при аналогичной температуре они отмирают быстрее, чем при менее высоких температурах хранения колбасы. С другой стороны, известно, что значительное количество молочнокислых бактерий обнаруживается в сырокопченой колбасе на всех этапах технологического процесса, начиная с осадки, и к окончанию сушки достигает максимума — более 99% к общему количеству микробов /2/. Причем более высокие из испытывавшихся в наших опытах температуры являются более благоприятными для этой группы микроорганизмов. Наряду с этим опыты *in vitro* показали, что в оптимальной для *Cl. perfringens* среде, при концентрации поваренной соли 8% и, несколько слабее, при содержании нитритов 20 мг% наблюдается некоторая задержка размножения этого микроба, особенно при температуре 18–22°. Копильный препарат ВНИИМПА в концентрации 1% не оказывает заметного влияния на размножение этих микробов, однако при сочетании максимальных концентраций поваренной соли — 8%, нитрита — 20 мг% и копильного препарата — 1%, наблюдается заметная задержка роста многих штаммов *Cl. perfringens* типа А.

Разумеется, проведенные исследования позволяют судить о закономерностях выживаемости *Cl. perfringens* типа А в сырокопченой колбасе лишь при строгом соблюдении санитарного режима в процессе ее изготовления. Однако в случае нарушений санитарного режима и наличия, вследствие этого, в фарше микробов-синергистов (например *V. proteus* /1/) возможно не только сохранение, но не исключена возможность интенсивного токсинообразования *Cl. perfringens* типа А.

ВЫВОДЫ

1. Технологический процесс изготовления сырокопченой колбасы не является благоприятным для развития и токсинообразования *Cl. perfringens* типа А.

2. Частичное отмирание *Cl. perfringens* в фарше сырокопченой колбасы обусловлено комплексом факторов, среди которых одним из наиболее существенных является, очевидно, интенсивное развитие микробов-антагонистов, в частности, молочнокислых, а не наличие поваренной соли, нитритов и копильного препарата.

3. В случае обсеменения фарша *Cl. perfringens* типа А изготовленная из этого фарша сырокопченая колбаса может содержать жизнеспособные клетки этого микроорганизма.

4. В процессе хранения сырокопченой колбасы при температурах от 4 до 30° инокулированные в нее *Cl. perfringens* типа А сохраняют жизнеспособность длительное время.

5. Присутствие *Cl. perfringens* в сырокопченой колбасе не оказывает влияния на ее органолептические показатели, что затрудняет определение зараженности колбасы этим патогенным микроорганизмом.

6. Использование среды СРН позволяет получать в производственных лабораториях быстрый ответ о содержании и массивности обсеменения продуктов *Cl. perfringens* при условии инкубирования посевов при температуре 46° в течение 4-6 час., а при интенсивном обсеменении продукта - в более короткие сроки.

ЛИТЕРАТУРА

1. Винокурова М.К., Попова А.И. Палочка *Cl. perfringens* как возбудитель пищевых отравлений, Тр. Саратовского института гигиены и профпатологии, Саратов, 1959.
2. Лаврова Л.П., Кухаркова Л.Л., Соловьев В.И. и др. Интенсификация технологии производства сырокопченых колбас, Тр. ВНИИМПа, вып. XI и XII, 1962.
3. Пивоваров Ю.П. Опыт изучения обсемененности *Cl. perfringens* продуктов питания, "Гигиена и санитария", 12, 1964, 91-94
4. Цыс Е.Ф., Перова П.В., Пивоваров Ю.П., Логинова М.М. К вопросу о развитии и токсинообразовании *Cl. perfringens* в вареной колбасе в процессе ее производства и хранения, XII Европейский конгресс работников НИИ мясн. пром., М., 1966.

LIST OF FIGURES

- Fig. 1. The effect of NaCl on the growth of *Cl.perfringens*.
Fig. 2. The effect of nitrite on the growth of *Cl.perfringens*.
Fig. 3. The effect of the smoke solution on the growth of *Cl.perfringens*.
Fig. 4. The effect of various combinations of the smoke solution, NaCl and nitrite on the growth of *Cl.perfringens*.

Note to Figs. 1 - 4

Designations:

- 1 - at 18-22°C;
2 - at 30-35°C;
■ - an intensive reaction on the CHH-medium;
▨ - an insignificant " " " " " " " "

- Fig. 5. A change in the titre of *Cl.perfringens* in dry sausage during its manufacture (average data for three strains).
- Fig. 6. A change in the titre of *Cl.perfringens* in dry sausage during its storage:

- I - at 4-6°C;
II - at 18-22°C;
III - at 28-30°C.
(average data).