

# CL. BOTULINUM - РАЗВИТИЕ И ТОКСИНООБРАЗОВАНИЕ В МЯСНЫХ КОНСЕРВАХ В 6

Д. Байльзов

Изучение изменений, происходящих в консервах после их экспериментального заражения *Cl. Botulinum*, показали, что развитие и токсинообразование клостридий зависит от вида и свойств содержимого и условий культивирования /3,4,6,7,10,11,12/. В связи с этим мы имели основание провести исследование свойств в консервах, которые по своему составу и способу изготовления характерны для нашей страны. Кроме того, мы поставили цель выяснить на основании экспериментальных данных целесообразность некоторых существующих нормативов исследования и оценки консервов, обсемененных клостридиями.

## Материалы и методы

Тест-штаммы: *Cl. botulinum* типа А №98, типа В 1504 и типа Е, полученные из коллекции культур НИЭМ в Софии. Два штамма *Cl. sporogenes*, взятые для сравнения: штамм В 1, выделенный нами как остаточная микрофлора в мясных консервах с бомбачем банок, и штамм А 24 полученный из *Veterinäruntersuchungsamt* в Берлине.

Все штаммы были идентифицированы нами дополнительно с помощью биохимических реакций, биологических проб на минах и нейтрализации токсина *Cl. botulin.* антитоксином. Оказалось, что *Cl. sporogen.* А 24 по своим свойствам близок *Cl. botulinum* типа Е, но не образовывал токсин.

Детоксицированные споры: центрофугированная десятидневная культура на печеночном бульоне, промытая несколько раз физиологическим раствором и хранившаяся в холодильнике. Перед использованием суспензия прогревалась в кипящей водяной бане в течение 30 мин./ *Cl. botulin.* типа Е не подвергалась прогреванию ввиду слабой термоустойчивости их спор/ и определялось количество спор в 1 мл.

### Исследуемые консервы:

А. Мясные консервы: а/ желированное мясо, б/ желированная тушина,, в/ мясной пахтет, весом по 220 гр и при рН содержимого от 6 до 6,4.

Б. Мясо-растительные консервы /"Голубцы с мясом"/, весом по 400 г. при рН содержимого чаще всего от 4,7 до 5,5.

Консервы были взяты из определенных партий, прошедших термостатическое и бактериологическое испытание на отсутствие бомбача и на стерильность.

Способ инфицирования консервов спорами. Через отверстие диаметром около 1 см в различные места содержимого вносится по 50-1500 спор на 1 г. продукта с помощью спринцовки или закапыванием пипеткой / в желированные консервы/. Отверстие герметически закрывается стерильной резиновой пробкой.

Одна половина зараженных данным штаммом консервов выдерживалась в термостате при 15-18°C, а другая - при 37°C, т.е. при температурах, соответствующих хранению /до 15°C/ и лабораторному исследованию /37°C/.

Исследование консервов после инкубации проводилось на 1, 5, 10, 30, 60 и 90 день, а при появлении бомбача - сразу же, исследовался продукт после его гомогенизации;

а/ общее число анаэробных микроорганизмов в 1 гр продукта после его гомогенизации;

б/ наличие токсина в содержимом - параллельное подкожное и внутривенное введение мышам, весом по 16-20г, некипяченной, кипяченой и нейтрализованной антитоксином вытяжки и гидкой фазы /бульона содержимого при соотношении 1:1, наблюдение над мышами проводилось до 10 дня;

а/ наличие токсина в культурах, выделенных из содержимого;

б/ органолептические изменения и рН содержимого.

Изучалось также время проявления бомбача в консервах, зараженных спорами и стерилизованных при 110°, 115°, 120° и 125°C.

## Результаты

Во время проведения исследований появление бомбача наблюдалась не у всех консервов, поэтому полученные данные рассматриваются в отдельности для консервов с бомбачем и без такового.

А. Изменения в мясных консервах с бомбачем. Присутствие *Cl. botulin*-типа А и В в консервах вызывает их разложение, желе становится более жидким, появляется неприятный запах гнили, часто сопровождающийся запахом прогорклого жира. Мясо приобретает несвойственный розовато-красный цвет, но сохраняет целостность, патетная масса и желе с признаками брожения. Биологическая проба на наличие токсина с содержанием положительна. При инфицировании *Cl. botulin*. типа В наличие токсина в некоторых случаях может быть установлено лишь при внутривенном введении, но не и при подкожном.

Присутствие *Cl. botulin*. типа Е способствует газообразованию, но в содержимом не наблюдались признаки разложения. Консистенция и цвет остаются нормальными. Желе твердое, но иногда в нем могут быть обнаружены едва заметные пузырьки. Запах или без особенностей или, чаще всего, сладковатый, напоминающий запах фруктов, но не неприятный. Биологические пробы на наличие токсина до 10 дня после появления бомбача, чаще всего, отрицательны, в то время как выделенные из этих же консервов культуры явно токсигенны. Подобные свойства наблюдались и у штамма *Cl. sporogen*. № А 24, но в консервах, инфицированных им, и в культурах, выделенных из этих консервов, не был установлен токсин.

Штамм *Cl. sporogen*. № 1 вызывает глубокие изменения в содержимом, соответствующие гниению, в некоторых случаях сопровождающиеся запахом прогорклого жира.

Б. Изменения в мясо-растительных консервах "Голубцы с мясом"  
с образованием бомбача

В этих консервах наблюдались довольно особенные свойства  
клубридий /табл.1/.

Штаммы *Cl.botulin.* типов А и В и *Cl.sporogen.* №24 не развивались при температуре 15-18°C /бомбах наблюдался лишь у одной банки на 75 день после инфицирования *Cl.botulin.* типа В/. При 37°C бомбах появлялся у трех банок консервов, инфицированных *Cl.botulinum* типа В и у 3 - *Cl.sporogenes* №24, а также у 4 банок, инфицированных *Cl.botulin.* типа А, выдерживаемых при 15-18°C до 60 дня и перемещенных на 37°C /бомбах наступил до 6 дня после перемещения/.

Консервы, инфицированные *Cl.botulin.* типа Е, дали бомбах при обеих температурах выдержки за исключением одной банки, выдерживаемой при 37°C.

Штамм *Cl.botulin.* №1 не вызвал бомбажа ни в одной из исследуемых банок консервов "Голубцы с мясом" в течение 180 дней.

Во всех консервах "Голубцы с мясом" с образованием бомбажа, инфицированных *Cl.botulin.* типов А, В и Е и *Cl.sporogen.* №24, не было установлено заметных органолептических изменений за исключением газообразования без запаха, ввиду чего характерный запах содержимого не изменился.

Биологическая проба на наличие токсина, проведенная с выдержкой и жидкостью содержимого, инфицированного *Cl.botulin.* типа Е, была отрицательна во всех случаях, культуры же, выделенные из этих консервов, были токсигенными. При инфицировании *Cl.botulin.* типа Е, как и в мясных консервах, в одном случае наличие токсина в содержимом было установлено лишь при внутривенном введении, но не при подкожном.

В. Исследование консервов без появления бомбажа. Из 148 банок консервов, инфицированных спорами, исследованы 34 банки без появления бомбажа. В их число входило 5 банок желированного мяса, инфици-

рованных *Cl. botulin.* типа А /3 банки/, *Cl. botulin.* типа В и *Cl. sporogenes* и выдерживаемых при 15-18°C /рН содержимого 6,0-6,2/, и 29 банок консервов "Голубцы с мясом" при рН содержимого 4,7-5,5/23 банки/ и 5,7-6,0/банок/, выдерживаемых при 15-18°C /136/ и при 37°C/166/ и инфицированных *Cl. botulin* типов А и В / 116./, *Cl. sporogenes*. №1 и А24 /176/ и *Cl. botulin.* типа Е / 1 банка при рН 5,2/. Последняя не дала бомбача до 75 дня, когда была исследована. Ее обсемененность спорами осталась неизменной.

Ни в одной банке консервов без бомбача не было установлено органолептических изменения и токсина. Выделенные из них культуры *Cl. botulin.* были токсигенными и соответствовали инфицированному типу. Количество инфицированных спор обыкновенно не изменялось до 75 дня при температуре 15-18°C, а при 37°C - до 45 дня, после чего наблюдалась тенденция к уменьшению.

#### Г . О времени появления бомбача

Опыты показали, что несмотря на отсутствие теплового или какого либо другого воздействия на споры после инфицирования, бомбачи не всегда появляются быстро. Это зависит от вида консервов и инфицированного штамма. В мясных консервах при температуре выдержки 37°C бомбачи появлялись от 1 до 5 дня, а при 15-18°C - от 5 до 10 дня, появились и более поздние бомбачи - на 30 и 75 день. В консервах "Голубцы с мясом", инфицированных *Cl. botulin.* типа Е бомбачи наблюдались между 10 и 90 днем при температуре выдержки 15-18°C и 30 днем при 37°C. Остальные тест-микробы вызвали бомбачи этих консервов лишь при 37° между 1 и 30 днем.

Так как вопрос о времени появления бомбача тесно связан с микробиологическим методом исследования консервов, а указанные выше данные свидетельствуют о свойствах клостридий при повторном загрязнении консервного содержимого, мы исследовали и консервы, инфициро-

ванние и после чего подвергнутые термической обработке для отожде-  
ствления условий при наличии остаточной микрофлоры. Результаты ука-  
заны в табл.2.

Из таблицы видно, что после прогревания консервов при 110-125°  
спори в некоторых случаях, зависимости от времени воздействия, оста-  
ются жизнеспособными. Бомбаж появлялся, чаще всего, до 5 дня. Из 93  
инфицированных консервов в 40 после термической обработки была уста-  
новлена остаточная микрофлора. Из них у 19 наблюдалось появление бом-  
бажа до 5 дня /47,5%/, еще у 6 - до 10 дня /15%/. Вообще 62,5% и  
у 5 после 10 дня /12,5%/. 10 консервов с остаточной микрофлорой /25%/  
остались без изменения до 30 дня, независимо от термостатной выдерж-  
ки при 37°С.

#### Обсуждение результатов

Полученные данные показывают, что *Cl.botulinum* типов А и В  
находят благоприятные условия для своего развития в отечественных  
мясных желированных консервах и мясных паштетах. Изменения содержи-  
мого консервов являлись специфическими для этих микроорганизмов.  
В упомянутых ранее пяти банках консервов без бомбажа, инфицирован-  
ных *Cl.botulin.* типа А и В и *Cl.sporogen.* и исследованных на 10,30 и  
75 день, развитие спор, вероятно, было подавлено низкой температурой  
среды и какими либо другими факторами, неизученными нами.

Данные о развитии *Cl.botulin.* типов А, В и Е и *Cl.sporogen.* в  
мясо-растительных консервах "Голубцы с мясом" представляют интерес  
и имеют значение в практике. Порча этих продуктов не проявляется по-  
явлением неприятного запаха и органолептических изменений. Без бакте-  
риологического исследования такой бомбаж может быть причислен к фи-  
зическому. Кроме того, во многих случаях голубцы являются неблагопри-  
ятной средой для развития клостридий. Исследуемые консервы, обсеме-  
ненные жизнеспособными спорами, оставались неизменными 3 и более

месяцев при температуре хранения 15-18°C и 37°C. Это может быть объяснено специфичностью способа приготовления продукта в нашей стране - использование капустных листьев, перетерпевших молочно-кислое брожение, и красного перца, в связи с чем понижается рН содержимого /чаще всего до 4,7-5,5/ содержимого и вносятся фунгициды. Эти данные могут служить как указание для производства ассортимента консервов с рН в упомянутых выше пределах, что создаст еще большую гарантию против порчи консервированных голубцов.

Результаты согласуются с выводами и других исследователей /6,8,9/, что нижняя граница рН среды, при которой прекращается развитие клостридий зависит от вида содержимого консервов и штамма и может быть значительно выше 4,5.

Проведенные исследования подтверждают и то, что при постановке биологической пробы на наличие ботулинического токсина в продуктах подкожное введение не является достаточно надежным /2/. Поэтому в официальных инструкциях подкожный способ инъецирования должен быть заменен другим более надежным - как, например, внутривенным, что проверено нашими опытами, или внутривибриальным, который предложен и другими авторами /2/.

Что касается того, что в случае инфицирования *Cl.botulinum* типа E получены отрицательные результаты при исследовании мясных консервов с бомбажем и всех мясо-растительных на наличие в них токсина, это можно объяснить более частым образованием протоксина вместо токсина этого микроба /3/, что в свою очередь, вероятно, зависит в значительной степени от свойств среды, в которой он развивается.

В связи с этим трипсинизация атоксигенных культур клостридий, выделенных из порченных пищевых продуктов /3/, является необходимым диагностическим приемом и должно войти в соответствующие инструкции.

Эти данные, а также и установленное сходство в свойствах *Cl. sporogenes* и *Cl. betulin.*, особенно типа E, указывает на необходимость более строгой санитарно-гигиенической оценки стерилизованных консервов при наличии в них апатогенных клостридий даже и в том случае, когда наличие живые споры не в состоянии развиваться в данном продукте /5/. Точно также можно объяснить, почему наличие упаковок кривых и физический бомбах кроет в себе большую опасность для потребителя и такие консервы не должны допускаться к свободной продаже.

Полученные данные выявляют и некоторые слабые стороны термостатного испытания. Вопрос, однако, сводится к тому, каким должен быть наиболее приемлемый срок этого испытания, удовлетворяющий в одинаковой степени и лабораторных работников и производство, и вообще следует ли его проводить. У нас принятый срок термостатирования при 38°C 10 дней, в других странах для упаковок весом до 500г. - 5-7 дней. Результаты проведенных опытов показывают, что удовлетворительная гарантия надежности испытания может быть получена при времени термостатирования 10 дней. Было бы удобно, если бы лабораторные исследования сочетались с термостатным испытанием определенного процента продукции, например 0,5-1%, причем это количество продукции исследовалось бы в термостате в течение 10 дней, а лабораторные образцы - 5 дней. Это ускорит процесс микробиологического контроля и даст большую гарантию в оценке продукции. Рассчитывать лишь на результаты исследований лабораторных проб ненадежно в связи с незначительным количеством обследуемых образцов - часто менее 1%. Отказ термостатного испытания определенной части продукции, независимо от лабораторного микробиологического обследования, неоснователен и оно должно быть признано необходимым методом контроля. Мнение, что в условиях хранения продукции на складе проявятся дефекты микробиологического характера,

неправильно, как видно из полученных нами результатов, т.к. при температуре до  $15^{\circ}\text{C}$  изменения могут происходить очень медленно даже и при повторном загрязнении консервов./Вследствие негерметичности/

### Выводы

Из проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. *Cl. botulin.* типов А и В развиваются в консервах желированного мяса и мясного паштета, образуют токсин и вызывают характерные изменения, подобные гниению.

2. В консервах "Голубцы с мясом" *Cl. botulin.* типов А и В развивается не всегда, что зависит от рН среды, температуры и присутствия некоторых ингибиторов. Изменения содержимого не являются специфическими и напоминают изменения при физическом бомбаже.

3. *Cl. botulin.* типа Е хорошо развивается в исследованных мясных и мясо-растительных консервах при температуре хранения их на складе  $15-18^{\circ}\text{C}$  / и при термостатной  $37^{\circ}\text{C}$  /, не разлагает заметно содержимого, но образует газ с едва уловимым запахом фруктов или без запаха.

4. *Cl. sporogenes* в зависимости от штамма вызывает изменения содержимого мясных и мясо-растительных консервов подобно *Cl. botulin.* типов А, В и Е.

5. Полученные данные говорят о необходимости изменить существующие у нас методы взятия и микробиологического исследования проб стерилизованных консервов с точки зрения ускорения процесса и обеспечения большей гарантии в оценке продукции.

### Литература

1. Булатова Т.И., Конс. овощес. промыш., 8, 1962, 31.
2. Булатова Т.И., ЖМЭИ, 8, 1964, 97.
3. Мазохина Н.Н., Конс. овощес. промыш., 1, 1962, 31.
4. Мазохина Н.Н., Конс. овощес. промыш., 11, 1962, 36.

- 5, Матвеев К.И., Ботулизм, Москва 1959.
6. Матрозова Р.Г., Микроб ботулизма в консервной промышленности, М. 1957.
7. Ajmal, M.J., Appl. Bacteriol., 31, 1, 1968, 124-132
8. Crossley, E.L., J. Soc. Chem. Ind., 60, 1941, 191
9. Hersom, A.C., and E.D. Hulland, Canned Foods. London, 1969.
10. Schoenholz, G. et al. (a. to 6).
11. Sterin, W.A. (a. to 6).
12. Townsend, C.T., et al. (a. to 9).

Таблица 1

Изменения содержимого бомбажных консервов "Голубцы с мясом"

Идентифицированы штамом	Органолептические изменения содержи мого	Биологическая проба с вытяжк.				
		прогре тая	непрогре тая	нейтрализи рана анти оксином	A	B
<i>Cl. botulinum</i> A	Неизменен вид и запах содерж.га зообразов.не ме няет спец.запах консервов	подкож но +	-	-	+	+
<i>Cl. botulinum</i> B	"	подк - +	-	+	-	+
<i>Cl. botulinum</i> E	"	подк - +		+	+	-
<i>Cl. sporogenes</i> A 24	"	подк - -		/с культурой выдел.из соде ржимого/		
<i>Cl. sporogenes</i> No 1	Не вызывает бом бажа					

Примечание : - отрицательная реакция  
+ положительная биологическая проба на наличие  
токсина

Таблица 2

Время появления бомбажа при 37°C в экспериментально инфицированных и стерилизованных консервах

Инфицированные консервы			Исследованные консервы					Без бомбажа	
Стерилизация	Чис	Споры	С бомбажем			За 30 дней		Клост ридия ми /кол/	Стере ние /кол/
°С	мин.	ко	в 1 г.	Общее кол.	День появ ления бом бажа и кол	5	10		
а/ Мясные консервы									
110	30	8	$10^{3-10^{3.3}}$	7	5	2	0	0	1
110	60	6	"	4	3	1	0	1	1
120	5	4	"	3	2	0	1	0	1
120	10	11	"	6	4	1	1	2	3
120	30	12	"	5	3	2	0	2	5
120	60	10	"	0	0	0	0	0	10
125	5	4	"	0	0	0	0	0	4
б/ Голубцы с мясом									
110	30	6	$10^{3.3}$	3	1	0	2	1	2
110	60	2	$10^{3.2}$	0	0	0	0	2	0
120	30	8	"	2	1	0	1	2	4
120	60	12	"	0	0	0	0	0	12
Итого			88	30	19	6	5	10	43

Примечание : мин. = минуты  
 кол. = количество  
 г. = грамма  
 Консервы были инфицированы