

ANDRZEJ SKOCZEK

Charakterystyka szczepów beztlenowców przetrwalnikujących wyizolowanych ze zbombażowanych konserw mięsnych

Z Ośrodka Naukowo-Badawczego Służby Weterynaryjnej

Bakteryjny bombaż konserw żywnościowych jest wynikiem rozwoju mezofilnych laseczek beztlenowych przetrwalnikujących i w określonych warunkach laseczek tlenowych (4, 5, 10, 12—16, 20, 22—24, 29, 33, 34, 36, 37). Dane piśmiennictwa wskazują, że laseczki tlenowe są odpowiedzialne za bombaż 37% konserw, a beztlenowe 33% i 60% konserw (13, cyt. 24). Niektóre prace sugerują, że w 75%—80% konserw głównymi, jeśli nie jedynymi, przedstawicielami mikroflory resztkowej są przetrwalnikujące drobnoustroje tlenowe. Wielu autorów uważa, że przyczyną bombaży jest rozwój *C. perfringens* i *C. sporogenes* (12, 13, 24). Stwierdzono, że w surowcu użytym do produkcji konserw największy odsetek stanowią szczepy beztlenowe *C. sporogenes* i *bifermentans* (22). Cytowane dane pochodzą z prac opartych głównie na badaniu bakteriologicznym konserw organoleptycznie prawidłowych lub niewielkiej liczby konserw zepsutych (5, 12, 16, 34, 36, 37) i z tego względu są mało reprezentatywne dla badań będących przedmiotem niniejszej pracy.

W pracy postanowiono przeprowadzić analizę jakościową szczepów beztlenowców przetrwalnikujących wyizolowanych z zepsutych konserw mięsnych zbombażowanych, odebranych z dużych partii magazynowanych w warunkach termolabilnych oraz wyjaśnić wpływ czasu magazynowania na skład jakościowy tej mikroflory.

Materiał i metody

Do badań użyto:

1. konserw mięsnych w liczbie 1023 puszek różnych gatunków uznanych za zepsute na skutek zbombażowania w okresie magazynowania od kilku miesięcy do 6 lat,
2. podłoża bakteriologiczne stosowanych według metody podanej przez innych autorów (7, 8, 25, 27), przy zachowaniu ogólnie przyjętych zasad izolacji beztlenowców,
3. myszek białych o nie ustalonej linii genetycznej,
4. surowie przeciwbotulinowych diagnostycznych typu A — 300 j.a (seria nr 10173), typu B i E po 300 j.a (seria nr 21075).

Zgodnie z sugestiami firmy BBL (3) hodowle pasteryzowano w końcowej fazie namnażania, ze względu na możliwość zniszczenia termicznego szczepów beztlenowych opornie przetrwalnikujących.

Różnicowanie gatunkowe szczepów oparto o cechy morfologiczne, biochemiczne i zdolność produkowania toksyn letalnych, określane w jednorodnej hodowli beztlenowców.

Wyniki i omówienie

Poddano badaniu 1023 puszek konserw mięsnych uznane za niezdatne do spożycia na skutek bombaży i wycofane z magazynów żywnościowych

i obrotu handlowego, w tej liczbie 463 puszki, które uległy zepsuciu podczas magazynowania do roku czasu od chwili wyprodukowania i 560 puszek magazynowanych od 1 do 6 lat.

Liczbę szczepów beztlenowych przetrwalnikujących wyizolowanych z konserw w zależności od czasu pojawiania się bombaży przedstawiono w tab. 1.

Tab. 1. Mikroflora beztlenowa rodzaju *Clostridium* wyizolowana z treści konserw w zależności od czasu zepsucia

	okres magazynowania w latach						ogółem	
	0,5	1	2	3	4	5		6
Liczba badanych konserw	146	317	292	105	15	59	89	1023
Liczba wyizolowanych szczepów	57	250	82	26	1	8	6	430
Odsetek konserw z których wyizolowano beztlenowce	34,93	61,21	27,40	21,90	6,66	13,56	6,74	34,40

Jak wynika z danych tab. 1, z 1023 konserw zepsutych w różnym czasie wyizolowano 430 szczepów laseczek beztlenowych. Odsetek konserw, w których stwierdzono beztlenowce był najwyższy w pierwszym roku magazynowania i obniżał się do 13,56% i 6,74% po 5 i 6 latach.

Na podstawie właściwości morfologicznych, biochemicznych i toksynogennych 430 szczepów laseczek beztlenowych wyizolowanych z zepsutych konserw podzielono na cztery grupy przedstawione w tab. 2.

Jak wynika z danych tab. 2, do pierwszej grupy zaliczono 9 szczepów toksynogennych o właściwościach wskazujących na przynależność do gatunku *C. botulinum*. W próbie seroneutralizacji z surowicami przeciwbotulinowymi diagnostycznymi typu A, B i E wykazano identyczność ich toksyn z toksyną serotypu *C. botulinum* B. Do drugiej grupy zaliczono 9 szczepów o cechach wskazujących na przynależność do gatunku *C. perfringens*. Do trzeciej najmniejszej grupy zaliczono 357 szczepów o cechach wskazujących na przynależność do gatunku *C. sporogenes*. W czwartej grupie umieszczono pozostałych 55 szczepów, których nie zdołano zidentyfikować za pomocą stosowanych testów.

Wyizolowane szczepy w większości wykazywały silnie zaznaczone właściwości proteolityczne na podłożach z mlekiem i żelatyną oraz mierne właściwości sacharolityczne (fermentacja glukozy i maltozy). W obrazie mikroskopowym, z wyjątkiem jednego szczepu, w grupie czwartej, stwierdzono subterminalne położenie przetrwalników w laseczkach.

Badania nad ograniczeniem psucia bakteryjnego konserw żywnościowych wymagają przede

Tab. 2. Charakterystyka biochemiczna i toksyczność szczepów *Clostridium* wyizolowanych z treści konserw zepsutych

Grupa	Liczba szczepów w grupie	Zelatylna	Tryptofan	Mleko	Azotany	Lecytyna ²⁰	Lipaza	Proteoliza	Glukoza	Laktoza	Maltaza	Sacharaza	Galaktoza	Salicyna	Glicerol	Preparat mikroskop.	Toksyczność	Sero-morfologicz.	Klasyfikacja gatunkowa
I	9	+	-	PK	-	-	V	+	+	-	+	-	V	-	-	OS	+	C. bot. B	<i>C. botulinum</i>
II	9	+	-	PKg	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	OS	-		<i>C. perfringens</i>
III	357	+	-	FK	-	-	V	+	+	+	+	-	-	-	-	OS	-		<i>C. sporogenes</i>
IV	55	+	-	PKz	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	OS ¹	-		nie zidentyfikowano

Objaśnienia: +¹ — miano toksyny od 100 DLM do 1000 DLM, OS — owalne, subterminalne ułożenie endospor, OS¹ — jeden szczep w tej grupie posiadał ułożenie przetrwalników OT, V — fermentacja zmienna, PKg — proteoliza, zakwaszenie, gaz.

wszystkim dokładnego poznania składu jakościowego mikroflory odpowiedzialnej za ten proces.

W obecnej pracy określono na podstawie właściwości morfologicznych, biochemicznych i próby biologicznej przynależność gatunkową szczepów wyizolowanych z bombaży.

Dotychczasowe dane źródłowe dotyczące składu jakościowego mikroflory odpowiedzialnej za psucie konserw żywnościowych nie pozwalają na jednoczesne ustalenie gatunków bakterii (4, 13—16, 24).

Izolowanie w badaniach własnych 9 szczepów *C. botulinum* B potwierdza ciągle niebezpieczeństwo przeżywania przez nie procesu przemysłowej sterylizacji, pomimo dużego marginesu bezpieczeństwa stosowanego w tym procesie.

Tego typu przypadki przeżywania w konserwach sterylizowanych przetrwalników botulinowych są opisane w piśmiennictwie (2, 11, 15). W USA w latach 1973—74 wykazano w 30 puszkach konserwowanych grzybów obecność toksyny botulinowej, a w 11 innych puszkach obecność przetrwalników *C. botulinum* B (15). W Polsce w 1977 r. przyczyną 40 przypadków zatruc botulinowych były konserwy produkcji przemysłowej (2).

Namnażanie mikroflory resztkowej w konserwach mięsnych zależy jest od wielu czynników wpływających na zmianę obrazu jakościowego tej mikroflory w miarę upływu czasu magazynowania (1, 17—19, 21, 26, 28, 30—32, 38). W badaniach własnych, w konserwach zepsutych po upływie dłuższego czasu obserwowano spadek odsetka konserw zawierających mikroflorę beztlenową, szczególnie wyraźnie zaznaczony po 4, 5 i 6 latach magazynowania. Wyniki te wskazują na stopniowe obumieranie mikroflory spowodowane, bądź jak to sugeruje Leistner (14) dłuższym okresem magazynowania w niesprzyjających warunkach, bądź wyczerpaniem się substratów odżywczych, bądź wytworzeniem produktów metabolizmu działających letalnie na mikroflorę, w środowisku hermetycznie odizolowanym puszką blaszaną. W tym przypadku, nie bez znaczenia pozostaje również zjawisko konkurencyjności między mikroflorą beztlenową i tlenową (6, 14).

W obecnej pracy dokonano charakterystyki jakościowej mikroflory odpowiedzialnej za

bombaży powstały w wyniku długotrwałego magazynowania konserw. Uzyskane wyniki należy uzupełnić badaniem porównawczym konserw uległych zepsuciu bakteryjnemu bezpośrednio po produkcji. Badania takie pozwolą na ustalenie zmian jakościowych mikroflory beztlenowej, od momentu wyprodukowania konserw mięsnych, po wieloletnie magazynowanie.

Wnioski

1. Laseczki beztlenowe rodzaju *Clostridium* są w znacznym odsetku przypadków (ponad 34%) odpowiedzialne za bombażowanie konserw mięsnych.

2. W zepsutych konserwach stwierdza się najwięcej szczepów *C. sporogenes*, znacznie mniej *C. perfringens* i *C. botulinum*. Pewna liczba szczepów beztlenowych jest trudna do identyfikacji gatunkowej ze względu na nietypowy obraz właściwości biochemicznych.

3. W miarę wydłużania czasu przechowywania konserw obserwuje się zmniejszanie liczby szczepów beztlenowych. Najwyższy odsetek beztlenowców w konserwach stwierdza się do roku przechowywania.

4. Izolowanie toksynogennych szczepów *C. botulinum* B z konserw produkcji przemysłowej potwierdza możliwość przeżywania przez te laseczki procesu sterylizacji.

Piśmiennictwo

1. Anema P. I., Geers I. M.: J. appl. Bact. 36, 553, 1973.
2. Anusz Z.: Prz. epid. 33, 129, 1979.
3. BBL Manual of Products and Laboratory Procedures, Div. of Becton, Dickinson and Comp. 1968.
4. Beganović H., Matić S.: Über die Haltbarkeit der Halbkonserven unter verschiedenen Aufbewahrungstemperaturen: 11 Meet. Europ. Meat Res. Workers, Belgrad 1965.
5. Czaplinski F.: Przetwalnikujace drobnoustroje tlenowe w konserwach mięsnych. Praca dokt. SGGW, 1964.
6. Crysley F. D., Helz G. E.: Can. J. Microbiol. 7, 633, 1961.
7. Cygan Z.: Drobnoustroje beztlenowe rodzaju *Clostridium*. Mat. sesji spec., Lublin 1968.
8. Gibbs B. M., Freame B.: J. appl. Bact. 28, 95, 1965.
9. Hamman R., Ottow I. C. G.: Soil Biol. Biochem. 3, 357, 1976.
10. Hoff I., van Dedecken L., Fieres L.: Vlaams diergeneesk. Tijdschr. 11, 441, 1968.
11. Herwitz M. A., Hughes I. M.: J. infect. Dis. 134, 306, 1976.
12. Kenderski S.: Schlacht-u. Viehof-Zeitung 71, 133, 1971.
13. Leistner L.: Fleischwirtschaft. 5, 253, 1956.
14. Leistner L.: Arch. Lebensmittelhyg. 21, 145, 1970.
15. Lynt R. K., Kautter R. B., Read: J. Milk Fd Technol. 33, 546, 1975.
16. Maleszewski J.: Roczniki PZH 15, 33, 1969.
17. Mierzejewski J.: Dynamics of spore germination and the development of *Clostridium botulinum* type B in canned meat. 21 Europ. Meet. Meat Res. Workers, Berno 1975.
18. Mierzejewski J.: Przem. spoż. 6, 206, 1976.
19. Mierzejewski J.: Przem. spoż. 8/9, 303, 1976.
20. Milew M., Kowaczow A.: Med. Wet. Nauki 7, 61, 1970.
21. Murrel W. C., Scott W. I.: J. gen. Microbiol. 43, 411, 1966.
22. Matsuda N., Matsumoto N., Ushizawa S., Kakegawa Y., Kato H., Nishida S.: J. Fd Hyg. Soc. Jap. 16, 253, 1975.
23. Matsuda N., Matsumoto N., Ushizawa S., Kakegawa Y.: J. Fd Hyg. Soc. Jap. 16, 99, 1975.

24. Pezacki W.: Technologiczne odchylenia jakości wyrobów mięsnych. PWRiL, 1968.
25. Roberts T. A.: J. appl. Bact. 31, 133, 1968.
26. Roberts T. A., Ingram M., Skulberg A.: J. appl. Bact. 28, 125, 1969.
27. Rymkiewicz D., Switalska A., Trembowlar P.: Wyd. Metod. PZH 1, 1972.
28. Rymkiewicz D.: Endospory patogennych przedstawicieli rodzaju Clostridium. Praca hab. PZH, 1973.
29. Sawow D.: Vet. Med. Nauki, Sof. 7, 39, 1970.
30. Sikorski Z. E.: Technologia żywności pochodzenia morską, WNT 1971.
31. Skoczek A.: Pol. Arch. wet. 19, 345, 1976.
32. Skoczek A.: Pol. Arch. wet. 19, 357, 1976.
33. Smith L. D. S.: The pathogenic anaerobic bacteria, Albert Balowa-Ch. C. Thomas, Springfield, 1976, s. 314.
34. Staskiewicz G.: Medycyna Wet. 10, 666, 1947.
35. Sugiyama H.: J. Bact. 62, 81, 1951.
36. Watukiewicz-Wasilewska J., Szyszko K.: Roczniki PZH 18, 493, 1967.
37. Zaleski S.: Mikrobiologia konserw rybnych w zalewie olejowej i w sosie własnym. Referat wygłoszony w dn. 6.06.1963 r. w Swinoujściu.
38. Zaleski S.: Sterylizacja i inaktywowanie bakterii i ich metabolitów w środowisku konserwy rybnej. Referat wygłoszony na konferencji szkoleniowej SITPS, Szczecin 1972.

Adres autora: dr wet. Andrzej Skoczek, ul. Wolska 46/48 m. 57, 01-187 Warszawa.

JAN URADZIŃSKI

Wpływ ogrzewania subletalnego na wytwarzanie lipazy przez *Staphylococcus aureus*

Z Katedry Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Weterynaryjnego ART w Olsztynie

Materiał i metody

Tłuszcze roślinne i zwierzęce w czasie przechowywania podlegają procesom rozkładu, określanym jako jęlczenie. Zjełczałe tłuszcze mają zmniejszoną wartość odżywczą, a w przypadku daleko posuniętego rozkładu mogą być toksyczne dla ludzi i zwierząt (4, 6, 7, 11, 14).

Surowce tłuszczowe, oprócz jęlczenia chemicznego, w dużym stopniu ulegają procesom rozkładu biologicznego. W niekorzystnych przemianach biologicznych istotną rolę odgrywają enzymy wytwarzane przez drobnoustroje. Podstawowym enzymem inicjującym proces jęlczenia tłuszczu jest lipaza (14). Źródłem tego enzymu są tkanki zwierzęce, bakterie i grzyby. Z bardziej znanych drobnoustrojów produkujących lipazę należy wymienić: pałeczki *Pseudomonas*, gronkowce, laseczki tlenowe i beztlenowe, pleśnie z rodzaju *Oidium*, *Penicilinum* i *Cladosporium*.

Lipolityczne właściwości gronkowców posiadają znaczenie praktyczne. Alder i wsp. (1) sugerują, że „staphylococcus egg yolk factor”, który jest lipazą, podobnie jak koagulaza, pozostaje w związku z chorobotwórczością tego drobnoustroju. Richou i wsp. (10) przy określaniu właściwości chorobotwórczych gronkowców uważają powyższy czynnik za równorzędny z wytwarzaniem koagulazy. Dostępne piśmiennictwo (2, 8, 13) dużo miejsca poświęca zagadnieniom wpływu różnych temperatur na aktywność lipazy gronkowcowej. Brak jest natomiast informacji na temat produkowania tego enzymu przez uszkodzone termicznie komórki *Staphylococcus aureus*. W związku z tym podjęto badania własne, których celem było określenie wpływu ogrzewania, w zakresie temperatur subletalnych, na wytwarzanie lipazy przez ten drobnoustroj.

Przedmiotem badań był szczep *Staphylococcus aureus* nr 262 otrzymany z kolekcji PZH w Warszawie.

Po ożywieniu liofilizatu badany drobnoustroj przesiewano do bulionu odżywczego i po 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C uzyskiwano hodowlę wyjściową do dalszych badań.

Do oznaczania lipazy gronkowcowej stosowano metodę Cartera oraz jej modyfikację według własnej koncepcji, która polegała na tym, że przygotowane podłoże Cartera (5) wylewano do jałowych płytek Petriego w ilości 40 ml na każdą płytkę. Następnie, w zestalonym podłożu wykonywano studzienki o średnicy 8,0 mm. Do poszczególnych studzienek oznakowanych kolejnymi cyframi wprowadzano po 0,1 ml wyjściowej hodowli bulionowej, doprowadzonej przy pomocy skali Mc Farlanda do odpowiedniej gęstości bakterii, oraz jej kolejne 10-krotne rozcieńczenia w płynie Ringera. Analogicznie postępowano z hodowlą bulionową gronkowców ogrzaną przez 15 minut w następujących temperaturach: 48°C, 60°C, 80°C, 84°C i 86°C. Jednocześnie z hodowli wyjściowej gronkowców oraz jej poszczególnych rozcieńczeń wykonywano posiewy na 3 płytki z agarem zwykłym, które inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po tym czasie liczono wyrosłe na agarze kolonie, podając wyniki w odniesieniu do 0,1 ml zawiesiny bakteriologicznej nie ogrzanej oraz ogrzanej w różnych temperaturach.

Nie odwrócone płytki z podłożem Cartera inkubowano w temperaturze 44°C przez 48 godzin. Po okresie inkubacji mierzono strefy zmętnienia, podając wyniki w milimetrach.

W identyczny sposób wykonano 9 dalszych serii badań.

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki poddane analizie statystycznej zestawiono w tab. 1 i 2.

W tab. 1 przedstawiono liczby komórek *Staphylococcus aureus* przed ogrzaniem, po ogrzaniu w różnych temperaturach oraz wartości procentowe bakterii, które przeżyły ogrzewanie.

Tab. 1. Przeżywalność (p) *Staphylococcus aureus* po ogrzaniu przez 15 minut w różnych temperaturach

	Liczba bakterii			Liczba bakterii			Liczba bakterii			Liczba bakterii		
	przed ogrzaniem	po ogrzaniu w 48°C	P%	przed ogrzaniem	po ogrzaniu w 80°C	P%	przed ogrzaniem	po ogrzaniu w 80°C	P%	przed ogrzaniem	po ogrzaniu w 84°C	P%
\bar{x}	$2,10 \times 10^7$	$1,43 \times 10^7$	70,81	$4,37 \times 10^7$	$4,21 \times 10^4$	$1,05 \times 10^{-1}$	$4,27 \times 10^7$	$2,44 \times 10^6$	$5,85 \times 10^{-5}$	$4,17 \times 10^7$	$0,04 \times 10^7$	$1,22 \times 10^{-4}$
S	$6,95 \times 10^6$	$6,11 \times 10^6$	17,58	$9,30 \times 10^6$	$2,25 \times 10^4$	0,07	$8,60 \times 10^6$	$2,83 \times 10^6$	$7,33 \times 10^{-5}$	$1,06 \times 10^7$	$0,08 \times 10^7$	$2,08 \times 10^{-4}$