

6. ДСТУ ISO 22000:2007 «Системи управління безпечністю харчових продуктів. Вимоги до будь-яких організацій харчового ланцюга». К., Держспоживстандарт України, 2007, – 30 с.
7. Кодекс Алиментариус. Маркировка пищевых продуктов / Пер. с англ. – М.: Издательство «Весь мир», 2006.
8. ДСТУ 4518-2008 «Продукты харчові. Маркування для споживачів. Загальні правила»
9. ДСТУ –Н ISO/TS 22004:2009 «Системи управління безпечністю харчових продуктів. Настанови щодо застосування ISO 22000:2005». К.: Держспоживстандарт України, 2010, – 13 с.
10. Бочарова, О.В. Влияние консервантов на формирование качества соков и напитков / О.В. Бочарова, С.П. Решта., Е.М. Гергега, О.М. Калаянова / Харчова наука і технологія. – 2012. – № 4. – С. 82-85.

УДК 664.8/9 : 621.796 : 005.336.3 : 579.61

ОСТАТОЧНАЯ МИКРОБИОТА ПРОДУКТОВ ДЛИТЕЛЬНОГО ХРАНЕНИЯ КАК ФАКТОР ИХ ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ

Пилипенко Л.Н., д-р техн. наук, профессор, Пилипенко И.В., канд. техн. наук, доцент,

¹Панченко Н.Н., канд. биол. наук, доцент

Одесская национальная академия пищевых технологий, г. Одесса

¹Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, г. Одесса

Изучен состав потенциально опасной остаточной микробиоты наиболее популярных видов консервированной продукции, выделены представители микроорганизмов группы subtilis–licheniformis, установлено токсическое и ДНК-повреждающее их действие на тест-системы.

Composition of potentially dangerous remaining microbiota of the most popular types of the canned products is studied, the representatives of group microorganisms of subtilis–licheniformis are selected, the toxic and DNK-damaging of microorganisms operating on test-systems are set.

Ключевые слова: остаточная микробиота, консервы, группа subtilis–licheniformis, токсичность, ДНК-повреждения.

Продукты длительного хранения – консервированные, сушеные, замороженные занимают особое место в экономике многих стран мира и дают возможность создавать запасы продуктов для потребления в регионах с различными климатическими условиями в течение всего года.

В практике консервного производства режимы стерилизации или пастеризации разрабатывают с учетом получения промышленно стерильной продукции, которая является биологически стабильной, не содержит микроорганизмов, способных развиваться при температурах хранения продукции, а также микроорганизмов и микробных токсинов, опасных для здоровья потребителя [1]. Многолетняя практика промышленного консервирования показала, что консервы после термической обработки стерилизацией или пастеризацией могут содержать незначительное количество жизнеспособных микроорганизмов. Это остаточная микробиота, которая теоретически может быть представлена восьмью группами микроорганизмов, среди которых могут быть специфические возбудители порчи консервов, возбудители пищевых бактериальных отравлений, а также бактерии, не влияющие на показатели качества и разрешенные нормативными документами в промышленно стерильных консервах [2]. К последним относятся представители группы *subtilis–licheniformis* – аэробные споровые микроорганизмы, часто обнаруживаемые в составе остаточной микробиоты. Микроорганизмы – возбудители порчи консервов, а также патогенные и условно-патогенные не допускаются в соответствующих консервах, поскольку вызывают критический дефект консервированного продукта.

Еще в середине прошлого столетия было отмечено [3], что пищевые продукты, содержащие *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* и *Bacillus cereus* могут вызывать пищевые отравления, сопровождающиеся тошнотой, рвотой, болями в животе и другими симптомами. Авторы отмечали также случаи острых заболеваний после употребления мяса, значительно контаминированного картофельной палочкой.

Несмотря на обилие данных об опасности порчи консервированных продуктов, вызванной микроскопическими грибами – микромицетами, до настоящего времени к консервам с малозначительным дефектом относят полученные из несортного сырья или сырья с повышенным содержанием плесеней по Говарду, но удовлетворяющим требованиям микробиологической стабильности.

Многие исследователи отмечают, что микроорганизмы группы *subtilis-licheniformis*, как правило, являются доминирующими контаминантами сырья и обнаруживаются в продукте перед стерилизацией. Они также могут сохраняться после термической обработки из-за высокой термоустойчивости спор и выявляются в готовых консервах среди остаточной микробиоты. Как отмечает Мазохина-Поршнякова Н.Н. [4], присутствие аэробных бацилл не всегда вызывает существенные изменения органолептических свойств консервированных продуктов. *Bacillus subtilis* – микроорганизмы, получившие статус безопасности GRAS и используемые в ряде стран в качестве пробиотиков, бациллоцинов, биопрерверентов [5]. Вместе с тем имеющиеся литературные данные свидетельствуют о наличии даже среди допустимых в составе остаточной микробиоты консервов микроорганизмов *Bacillus subtilis* штаммов с токсигенными свойствами, вызывающими наряду со снижением иммунитета различные патологии в организме человека [6, 7].

В связи с изложенным, актуальным является изучение состава остаточной микробиоты в наиболее популярных видах консервированной продукции, выделение представителей микроорганизмов группы *subtilis-licheniformis*, выявление их потенциальной токсичности и ДНК-повреждающего действия на тест-системы, что послужило целью данной работы.

Отбор образцов и подготовку консервов к анализу проводили в соответствии с нормативными документами [1,2]. С целью установления промышленной стерильности консервов выявляли присутствие мезофильных аэробных и факультативно-анаэробных микроорганизмов по ГОСТ 10444.15-94, ГОСТ 30425-97. В случае затруднения выявления признаков роста микроорганизмов из-за присутствия продукта через пять суток из пробирок с первичным посевом 1 см³ пересевали в пробирки с аналогичной питательной средой и о присутствии в консервах жизнеспособных микроорганизмов судили по результатам посева. Посевы ежедневно просматривали и после появления признаков роста готовили мазки, окрашивали их по Граму и микроскопировали. Если в мазках не обнаруживали спорообразующие клетки на пятые сутки, готовили мазки из посевов повторно. По признакам роста на питательной среде, морфологии клеток, спорообразованию, окрашиваемости по Граму устанавливали присутствие в посевах лишь мезофильных спорообразующих бацилл группы *subtilis-licheniformis* или развитие и других микроорганизмов – кокков различных форм, грамотрицательных палочек, грамположительных неспороносных палочек.

Выделение чистых культур проводили путем посева на твердые питательные среды с целью получения изолированных колоний, из которых делали посев чистых культур в пробирки с жидкой питательной средой.

Результаты исследований остаточной микробиоты консервов заводского изготовления приведены в табл.1.

Как следует из таблицы 1, аэробные споровые микроорганизмы выделены из семи наименований консервов, а наиболее обсемененными оказались: соус «Аджика» пастеризованный – 66,7 %, «Баклажаны, обжаренные в аджике стерилизованные» – 50 %, «Горошек зеленый консервированный» – 33,3 %.

Следующим этапом работы было исследование токсигенных свойств выделенных штаммов микроорганизмов. С этой целью получали убитые микробные клетки путем прогрева их кипячением в среде культивирования в течение 20 мин с повторным прогреванием через сутки. При этом погибали единичные микробные клетки, выжившие после первого кипячения. Для получения культур с минимальным количеством спор провели дополнительную серию экспериментов с испытанием влияния времени инкубирования выделенных образцов микроорганизмов на численность образовавшихся спор. Как свидетельствуют результаты этой серии экспериментов, меньшее количество спор образовывалось в течение 11–14 часов инкубирования, в связи с чем приняли длительность инкубации – 12 часов. В результате 12-часового инкубирования титр микроорганизмов достигал 10⁹ – 10¹¹ КОЕ/1см³.

Для изучения токсического действия убитых микробных клеток аэробных споровых бактерий, выделенных из растительных консервов, в качестве тест-культур использовали инфузорию *Stylonichia mytilus* и рачки *Daphnia magna* S. Результаты проведенных исследований приведены в табл. 2, в которой, чтобы не перегружать табличными данными для всех выделенных штаммов микроорганизмов, приведены полученные для двух штаммов микроорганизмов показатели выживаемости тест-культур в зависимости от концентрации убитых клеток микроорганизмы группы *subtilis-licheniformis*.

Из полученных результатов следует, что из 12 выделенных убитых культур аэробных споровых бактерий 4 оказывали слабое токсическое действие в сравнительно невысоких концентрациях и более выраженную токсигенность при концентрациях 10⁹ – 10¹⁰ клеток микроорганизмов в 1 см³ (эти сведения для двух выделенных штаммов микроорганизмов с различными концентрациями убитых микробных клеток спорообразующих аэробов приведены в табл.2).

Таблица 1 – Микробиологический анализ овощных и мясорастительных консервов

Наименование образцов	Изготовитель консервов	Число исследованных образцов	Количество выявленных штаммов	Примечание
Фасоль с овощами в домашнем соусе	«Господарочка»	8	1	Консервы без видимых признаков органолептических изменений
Горошек зеленый консервированный	«Господарочка»	6	2	Консервы с различной степенью мутности заливки
Икра из кабачков	«Господарочка»	11	3	Консервы без видимых признаков органолептических изменений
Икра из баклажанов	«Господарочка»	8	1	Консервы без видимых признаков органолептических изменений
Баклажаны, обжаренные в аджике стерилизованные	КП «Продтовары» Бессарабка	4	2	Консервы без видимых признаков органолептических изменений
Баклажаны в аджике	«Верес»	5	1	Консервы без видимых признаков органолептических изменений
Соус «Аджика» пастеризованный	«Чумак»	3	2	Консервы без видимых признаков органолептических изменений
Каша гречневая с говядиной	«Господарочка»	4	–	–

Таблица 2 – Влияние препаратов убитых клеток микроорганизмы группы *subtilis* – *licheniformis* на тест-культуры

№ образца	Концентрация микробных клеток, ед. оптической плотности, D	Тест - культуры			
		<i>Stylonichia mytilus</i>		<i>Daphnia magna S.</i>	
		Количество просмотренных особей, шт.	Выживаемость, %	Количество просмотренных особей, шт.	Выживаемость, %
Контроль (среда Лозина-Лозинского)	0	59	100,0	47	100,0
1	0,04	99	79,2*	69	81,2*
1-А	0,11	76	53,2**	81	59,3**
2	0,03	118	78,0*	65	83,1*
2-А	0,10	104	61,2*	50	68,0*

Примечание. 1. Достоверность опыта: * – достоверность различия между опытом и контролем > 95 % (P < 0,05);

** – достоверность различия между опытом и контролем > 98 % (P < 0,02);

2. Наиболее чувствительны к действию токсиканта инфузории *Stylonichia mytilus*.

Следует также отметить, что наблюдались некоторые различия в чувствительности тест-культур, избранных для выявления токсичности исследуемых штаммов микроорганизмов. Как и в проведенных нами опытах по идентификации в субстратах тяжелых металлов, ряда пестицидов различной химической

природы, в опытах с убитыми микробными клетками *Bacillus subtilis* более чувствительными оказались инфузории *Stylonichia mytilus*. При этом интересно отметить тот факт, что одним из видов пищевых субстратов для *Stylonichia mytilus* являются именно микроорганизмы этой группы.

Полученные нами результаты соответствуют литературным данным о возможности использования *Daphnia magna* Straus в качестве тест-объекта при исследовании механизмов токсического действия пестицидов биогенного происхождения [8].

Таким образом, выявлено негативное влияние спорообразующей остаточной микробиоты консервов на рост и функционирование тест-культур, что свидетельствует об их токсическом действии. Установлено также, что степень токсичности зависит от концентрации микробных клеток в суспензии.

Для оценки ДНК-повреждающего действия клетками убитых аэробных спорообразующих микроорганизмов использовали тест Эймса, позволяющий регистрировать мутации, происходящие по принципиально различным механизмам – путем сдвига рамки считывания, связанные с выпадением участка генома, а также точечные мутации, происходящие путем замены пар оснований. В качестве тест-культуры в тесте Эймса использовали ауксотрофные по гистидину штаммы *Salmonella typhimureum* TA – 98 и TA 100 [9].

Результаты, полученные с использованием spot-теста, продемонстрировали выраженную генотоксическую и мутагенную активность метаболитов бактериальной группы *subtilis-licheniformis*, выраженную в индукции мутаций типа замены рамки считывания. В дальнейших исследованиях планируется количественная оценка мутагенной активности метаболитов бактерий, выделенных из исследуемых видов консервированной продукции.

Таким образом, предоставляя мало информации о природе поллютанта или контаминанта, биотестирование дает возможность с большой степенью достоверности определить степень общей токсичности объекта исследования. Изучение состава остаточной микробиоты наиболее популярных видов консервированной продукции выявило ее потенциальную опасность, выделены представители микроорганизмов группы *subtilis-licheniformis*, установлено токсическое и ДНК-повреждающее их действие на тест-системы, что требует пересмотра нормативных требований к этой группе микроорганизмов в составе остаточной микробиоты, а также более совершенного ее нормирования.

Литература

1. Інструкція про порядок санітарно-технічного контролю консервів на виробничих підприємствах, оптових базах, в роздрібній торгівлі та на підприємствах громадського харчування. І 4.4.4.077 – 2001. – МОЗ України. – Київ, 2001. – 99 с.
2. Державні нормативні документи на сировину, напівфабрикати, матеріали та консервовану продукцію. Показники безпечності та якості. Методичні вказівки / Ю. Пилипенко та ін. – Київ: Мінагрополітики, 2009. – 114 с.
3. Аскалонов С. П., Ильченко А.И. Пищевые заболевания, вызываемые спорообразующими аэробными бактериями *Vacillus mesentericus* и *Vacillus cereus* // В кн.: Вопросы питания. Сб.ст. Киев, 1962. – С. 226-229.
4. Анализ и оценка качества консервов по микробиологическим показателям / Под ред. Н.Н. Мазохин-Поршняковой. – М.: Пищ. пром-сть, 1977. – 471 с.
5. Электронный научный журнал «Исследовано в России» С. 164-187
<http://zhurnal.ape.relarn.ru/articles/2011/016.pdf>
6. Блекберн К. де В. Микробиологическая порча пищевых продуктов / К.де В. Блекберн. – Пер. с англ. – СПб, 2008. – 784 с.
7. Le H., Anagnostopoulos C. Detection and characterization of naturally occurring plasmids // Mol. Gen. Genet. 1977. – V.157. – P. 167-174.
8. Кулагина К.В., Коровина Е.В., Шроль О.Ю., Пантелеев С.В. Чувствительность *Daphnia magna* к действию пестицидов биогенного происхождения *in vivo* // Фундаментальные исследования. Медицинские науки. 2011. – № 10. – С. 99–102.
9. Оценка токсичности и мутагенности некоторых приоритетных видов загрязнения в бактериальной тест-системе *Salmonella typhimureum* TA 100 / Т.В. Васильева, В.А. Иваница, Н.Н. Панченко и др. // Технические и системные методы экологического мониторинга. Тр. Ин-та кибернетики НАН Украины. 1998. – С. 64–68.