

HIGIENA I TECHNOLOGIA ŚRODKÓW SPOŻYWCZYCH

ZDZISŁAW ZAWADZKI

Badania nad mikroflorą powierzchniową mięsa mrożonego

Katedra Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Weterynarii WSR w Olsztynie
Kierownik: doc. dr Z. ZAWADZKI

W miarę upływu czasu przechowywania w komorach chłodni składowych dochodzi do stopniowego zmniejszania się liczby drobnoustrojów zarówno na powierzchni (1, 14, 39) jak i w warstwach wewnętrznych (14) mięsa mrożonego. W wyniku bowiem różnej oporności na działanie niskich temperatur dochodzi do selektywnego obumierania części populacji, a stąd do swoistej zmiany składu taksonomicznego mikroflory i co raz wyraźniejszej jej jednorodności. Część drobnoustrojów ginie (1, 3, 4, 5, 7, 14, 39), część ulega mutacjom cech morfologicznych, biochemicznych i fizjologicznych (2, 4, 5, 6, 7, 8) lecz są również i takie, które wykazują oporność na temperatury zbliżone do absolutnego zera. Główną przyczyną śmierci drobnoustrojów jest zamrożenie w podłożu wody, niezbędnej dla ich aktywności fizjologicznej. Większą oporność na brak wody w żywności wysuszonej w wyniku zamrożenia wykazują drożdże i grzyby, a bardziej wrażliwe są bakterie (36, 37). Śmierć drobnoustroju następuje jednak dopiero na skutek koagulacji białka komórki (Reay — cyt. za 36) po zamrożeniu w niej wody. Stwierdzono również, że bakterie są tym oporniejsze na działanie ujemnych temperatur im ich kształt jest bardziej zbliżony do kulistego (3). Stąd też najbardziej odporne są ziarniaki (3, 14, 37), a szczególnie enterokoki (36). Dużą oporność w tym względzie wykazują również przetrwalniki bakteryjne (36). Uważa się także, że bakterie Gram-dodatnie lepiej znoszą zamrażanie od Gram-ujemnych. Jako minimalną temperaturę wzrostu bakterii psychrofilnych przyjmuje się -10°C (21, Davis — cyt. za 16), chociaż zanotowano przypadki bardzo powolnego rozwoju także poniżej tej granicy.

Kontynuując poprzednio wykonane badania (39) oznaczono szczegółową przynależność taksonomiczną szczepów bakterii wyizolowanych z powierzchni mrożonego mięsa przechowywanego przez 6 miesięcy. Uznano bowiem duże znaczenie składu mikroflory dla trwałości mięsa po jego rozmrożeniu (15, 28). Równocześnie, na podstawie efektywności różnicowania, dokonano oceny wpływu niskich ujemnych temperatur przechowywania na zachowanie gatunkowych właściwości przez badane szczepy.

Material i metody

Badaniom poddano 500 szczepów bakterii wyizolowanych metodą wysiewów odciskowych (39) z powierzchni ćwierćtuszy wołowego mięsa mrożonego po jego 6 miesięcznym przechowywaniu w komorze chłodni składowej o temperaturze powietrza wynoszącej -21 do -18°C .

Bakterie Gram-dodatnie różnicowano do rodzajów wg schematu Schmidt-Lorenza (30), natomiast Gram-ujemne wg schematu Shawana, Hobbs i Hodgkissa (31, 32) z uwzględnieniem modyfikacji Schmidt-Lorenza (30) oraz własnych uprzednio dokonanych spostrzeżeń (38). Test Hughha i Leifsona z glukozą (18) wykonywano, a następnie interpretowano uzyskane wyniki w sposób podany w jednej z poprzednich prac (40). Oksydazę cytochromową oznaczano metodą Kovacs (23) w modyfikacji Eddy'ego (cyt. za 30), a w przypadkach wątpliwych potwierdzano metodą Gaby'ego i Hadleya (12). Rozkład argininy oznaczano wg Thornley (34), a zdolność do wytwarzania fluoresceiny wg Georgia i Poe (13) oraz Kinga, Warda i Raneya (cyt. za 11, 30). Pozostałe testy wykonywano metodami stosowanymi w pracach poprzednich (38, 39).

Wymienione schematy diagnostyczne pozwalają na uproszczone różnicowanie do najczęściej występujących w żywności rodzajów drobnoustrojów (30, 38, 39). Podobnie jak w pracy poprzedniej (38), ziarniaki z rodzajów: *Micrococcus*, *Staphylococcus* i *Sarcina* różnicowano do gatunków w oparciu o systematykę Bergeya (9) na podstawie wybranych testów (38). W odniesieniu do laseczek rodzaju *Bacillus*, zastosowano naprzód ich podział na grupy i podgrupy morfologiczne (9), a następnie przeprowadzono dalsze różnicowanie do gatunków w oparciu o wybrane z systematyki Bergeya (9) diagnostycznie ważne testy (38). Wyboru dokonano wg Cowan i wsp. (11).

Różnicowanie pałeczek rodzaju *Pseudomonas* do gatunków jest praktycznie prawie niewykonalne z uwagi na to, że istniejące systemy klasyfikacyjne (9, 24) w znacznym stopniu opierają się na zmiennych i niedostatecznie rozgraniczonych właściwościach bardzo licznych gatunków. Również i nowsze badania (17, 19, 20, 22, 29) nie rozwiązały w pełni tego trudnego problemu. Jednoznaczne różnicowanie jest pewne dla gatunku *Pseudomonas aeruginosa* (10, 17, 30, 38) i niektórych innych gatunków chorobotwórczych (26), a w znacznym stopniu jest to możliwe również odnośnie *Pseudomonas putida* (30) oraz *Pseudomonas fluorescens* (11, 29). Z tych względów pałeczki *Pseudomonas* różnicowano na cztery grupy (31), a w obrębie grupy pierwszej przeprowadzono dalsze różnicowanie celem ewentualnego wykrycia jednego z trzech podanych powyżej gatunków. Szczepy z rodzaju *Chromobacterium* różnicowano wg Sneatha (33). Z uwagi na wytwarzanie wiołaceiny, nie może być przy ich badaniu stosowany test na oksydazę (11).

Używane w pracy schematy diagnostyczne pozwalają na różnicowanie pałeczek rodziny *Achromobacteriaceae* na trzy rodzaje, a mianowicie: *Alcaligenes*,

Achromobacter i *Flavobacterium*. Jakkolwiek wg systematyki Bergeya (9) mogą one być zarówno urzężone jak i nieurzężone, Shewan i wsp. (31) na podstawie wyników badań własnych oraz innych autorów zaliczyli do wymienionych rodzajów jedynie szczepy nieurzężone. Z uwagi na małą aktywność biochemiczną, pewne trudności może sprawiać jednoznaczne różnicowanie pałeczek należących do rodzajów *Achromobacter* i *Alcaligenes*. Wyizolowane z żywności, oznacza się je jako należące do jednego z wymienionych rodzajów względnie do grupy *Achromobacter-Alcaligenes* (35). Leifson (25), Buttiaux i Gagnon oraz Moore i Pikett (cyt. za 30) uważają za słuszne połączenie obu rodzajów w jeden rodzaj *Achromobacter*. Natomiast Steel (cyt. za 30) proponuje odróżnianie obu rodzajów na podstawie wyniku testu na oksydazę i zaliczanie szczepów oksydazo-dodatnich do rodzaju *Alcaligenes*, a oksydazo-ujemnych do *Achromobacter*. Odnosnie szczepów z rodzaju *Flavobacterium*, autorzy schematu diagnostycznego (31) stwierdzają, że jakkolwiek pałeczki te zaliczyli do nieurzężonych, to jednak wyizolowali kilka szczepów urzężonych peritrichalnie. Szczepy takie spotykane są jednak bardzo rzadko (31). Występują np. w środowiskach zasolonych. Dla lepszego uwidocznienia wytwarzanego przez *Flavobacterium* barwnika, zaleca się przesiew szczepu na agar odżywczy z dodatkiem 30% mleka odtłuszczonego (31, 38).

Pałeczki rodziny *Enterobacteriaceae* różnicowano wg Macierewicz (27).

Wyniki i dyskusja

Wyizolowane szczepy bakterii należały do 8 rodzin (14 rodzajów), a mianowicie: *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas* — 82 szczepy, *Aeromonas* — 11), *Spirillaceae* (*Vibrio* — 5), *Rhizobiaceae* (*Chromobacterium* — 6), *Achromobacteriaceae* (*Achromobacter* — 59, *Flavobacterium* — 14), *Enterobacteriaceae* (*Escherichia* — 2, *Enterobacter* — 5, *Serratia* — 3), *Micrococccaceae* (*Micrococcus* — 112, *Staphylococcus* — 11, *Sarcina* — 78), *Lactobacillaceae* (*Streptococcus* — 5) oraz *Bacillaceae* (*Bacillus* — 107). Ilościowo dominowały więc ziarniaki rodziny *Micrococccaceae* (40,2%). Licznie reprezentowane były również *Pseudomonadaceae* (18,6%) i *Achromobacteriaceae* (14,6%) oraz rodzaj *Bacillus* (21,4%). Pozostałe 5,2% to występujące pojedynczo szczepy *Vibrio*, *Chromobacterium*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Serratia* i *Streptococcus*.

Wśród rodzaju *Pseudomonas* wydzielono szczepy wszystkich czterech grup, a w obrębie grupy pierwszej wyodrębniono gatunki: *Ps. fluorescens* i *Ps. putida*. Cztery szczepy rodzaju *Chromobacterium* posiadały właściwości zgodne dla gatunku *Chr. lividum*.

Przeprowadzając identyfikację rodzaju *Micrococcus* stwierdzono, że około 60% szczepów posiadało właściwości zgodne z opisanymi w systematyce Bergeya (9) na podstawie której zaliczono je do 7 gatunków: *M. luteus*, *M. roseus*, *M. flavus*, *M. conglomeratus*, *M. varians*, *M. candidus* i *M. cryophilus*. Podobnie efektywne było różnicowanie rodzaju *Sarcina* w obrębie którego wyizolowano gatunki *S. lutea*, *S. aurantiaca* i *S. flava*. Spośród 11 szczepów *Staphylococcus*, 7 zaliczono do *St. epidermidis*. Różnicowanie rodzaju *Bacillus* pozwoliło na oznaczenie przynależności około 50% szczepów

do 9 gatunków: *B. cereus*, *B. pumilus*, *B. megaterium*, *B. sphaericus*, *B. polymyxa*, *B. firmus*, *B. subtilis*, *B. circulans* i *B. brevis*. Badanie pozostałych 40 do 50% szczepów rodzajów: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Sarcina* i *Bacillus* wykazało rozbieżności pomiędzy wynikami testów a kryteriami diagnostycznymi co uniemożliwiło oznaczenie ich przynależności gatunkowej. Z uwagi na to, że systematyka (9) wymienionych jednostek taksonomicznych umożliwia jednoznaczne różnicowanie do gatunków, można wnioskować, że szczepy te utraciły swoje charakterystyczne właściwości w wyniku działania temperatur zamrażalniczych na mikroflorę mięsa mrożonego.

Oznaczony skład mikroflory powierzchniowej mięsa mrożonego jest oczywiście niepełny, gdyż nie można wykluczyć obecności również i innych rodzajów bakterii, które są trudniejsze do wyizolowania ponieważ wymagają zastosowania specjalnych metod hodowli i różnicowania. Jednakże w pracy dokonano identyfikacji takich rodzajów bakterii, które swoją aktywność enzymatyczną (proteolityczną, lipolityczną) mogą wywoływać psucie się mięsa po jego rozmrożeniu. Szczególne znaczenia posiadają pałeczki rodzajów *Pseudomonas*, *Aeromonas* i *Achromobacter* oraz laseczki rodzaju *Bacillus*, ale nie można nie doceniać obecności ziarniaków rodziny *Micrococccaceae* (39). Wszystkie wymienione stanowią ponad 90% składu badanej mikroflory, stąd też można ją uznać za czynnik destruktywny w stosunku do mięsa mrożonego, utajony w niskich temperaturach przechowywania. Należy również dodać, że w niniejszych badaniach pominięto grzyby i drożdże, których udział w tworzeniu mikroflory powierzchniowej mięsa mrożonego oznaczono w pracy poprzedniej (39).

Piśmiennictwo

1. Arpai J., Banhegyi M.: Prum. Potr. 10, 493, 1959.
2. Arpai J., Banhegyi M.: Prum. Potr. 11, 212, 1960.
3. Arpai J.: Biologia 16, 31, 1961.
4. Arpai J.: Naturwissenschaften 48, 438, 1961.
5. Arpai J.: Experimentia 17, 179, 1961.
6. Arpai J., Lifkova Z.: Chem. Zvesti 15, 218, 1961.
7. Arpai J.: Bull. UVUPP, Bratislava IV/2, 34, 1965.
8. Arpai J., Banhegyiova M., Grofova M., Tomisova I.: Bull. UVUPP, Bratislava V 3, 7, 1966.
9. Breed R. S., Murray E. G., Smith N. R.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7 th ed., Bailliere, Tindall, Cox, London 1957.
10. Bühlmann X., Vischer W. A., Bruhin H.: Zentbl. Bakt. ParasitKde I Orig. 183, 168, 1961.
11. Cowan S. T., Steel K. J.: Manual for the identification of medical bacteria, Cambridge University Press 1966.
12. Gaby W. L., Hadley C.: J. Bact. 74, 356, 1957.
13. Georgia F. R., Poe Ch. F.: J. Bact. 22, 349, 1931.
14. Halič J., Toufar J.: Vet. Cas. 6, 621, 1957.
15. Hejlasz Z., Hendrich Z., Nikonorow M., Wnuk J., Zawadzki Z.: Lek. Wojsk. 31, 1179, 1955.
16. Hempler P.: Nord. Vet. Med. 15, 573, 1963.
17. Hendrie M. S., Shewan J. M.: Identification Methods for Microbiologists, Part A, Academic Press, London, New York 1966 s. 1.
18. Hugh R., Leifson E.: J. Bact. 66, 24, 1953.
19. Lizuka H., Komagata K.: J. gen. appl. Microbiol. 9, 73, 1963.
20. Lizuka H., Komagata K.: J. gen. appl. Microbiol. 9, 83, 1963.
21. Ingraham J. L., Stokes J. L.: Bact. Rev. 3, 97, 1959.
22. Komagata K.: J. gen. appl. Microbiol. 7, 282, 1961.
23. Kovacs N.: Nature Lond. 178, 703, 1956.
24. Krasilnikow N. A.: Opredielitel bakterii i aktinemycetow, Izd. AN, SSR, Moskwa 1949.
25. Leifson E.: Atlas of Bacterial Flagellation, Academic Press, New York, London 1960.
26. Liu P. V.: J. Bact. 81, 28, 1961.

27. Macierewicz M.: Wyd. Metod. PZH, 1964, Nr 3 (11), z. 4, s. 51.
28. Nikonow M., Hejlasz Z., Hendrich Z., Wnuk J., Zawadzki Z.: Wojsk. Przegl. Wet. 2, 13, 1955.
29. Rhodes M. E.: J. gen. Microbiol. 21, 221, 1959.
30. Schmidt-Lorenz W.: Zentbl. Bakt. ParasitKde I Orig. Supplementheft 1, 270, 1965.
31. Shewan J. M., Hobbs G., Hodgkiss W.: J. appl. Bact. 23, 379, 1960.
32. Shewan J. M., Hobbs G., Hodgkiss W.: J. appl. Bact. 23, 463, 1960.
33. Sneath P. H. A.: Identification Methods for Microbiologists, Part A, Acad. Press, London, New York 1966, s. 15.
34. Thornley M. J.: J. appl. Bact. 23, 37, 1960.
35. Thornley M. J.: Identification Methods for Microbiologists, Part B, Acad. Press, London, New York 1966, s. 29.
36. Zachorowski T.: Zesz. Centr. Lab. Przem. Ryb. 6, 36, 1967.
37. Zawadzki Z.: Weterynaria, Wrocław 17, 57, 1964.
38. Zawadzki Z.: Weterynaria, Wrocław 20, 145, 1967.
39. Zawadzki Z.: Weterynaria, Wrocław 22, 117, 1967.
40. Zawadzki Z.: Medycyna Wet. 25, 432, 1969.

Adres autora: doc. dr Zdzisław Zawadzki, Olsztyn, ul. Zamienhofska 6 m. 6.

Zawadzki Z. — Исследования микрофлоры поверхности мороженого мяса.

Из поверхности мороженой говядины (после 6 месяцев хранения в температуре -21 до -18°) вы-

делили 500 штаммов бактерий принадлежащих к 14 родам. Чаще всего устанавливали бактерии фамилии Micrococcaceae — 40,2%, потом Pseudomonadaceae — 18,6%, Achromobacteriaceae — 14,6%, а также рода Bacillus (21,4%). Принимая во внимание значительную энзиматическую активность (протеолитическую и липолитическую) ок. 90% изолированных штаммов, надо считать что поверхностная микрофлора мороженого мяса является скрытым в низких темпера-

Zawadzki Z. — Examination on the surface microflora of chilled meat.

There were isolated 500 bacterial strains from the surface of chilled beef meat, stored for six months at -21 to -18°C . The germs were included into 14 genera; as far as possible individual species were also determined. There were found out mainly the strains belonging to Micrococcaceae family (40,2%), Pseudomonadaceae (18,6%), Achromobacteriaceae (14,6%), and Bacillus (21,4%). Since about 90% of the strains was proteolytic and lipolytic, they could be acknowledged as destructive factors of the stored meat present in the refrigerator.

KRZYSZTOF KOSMALA

Pozostałości pestycydów polichlorowych w tkance tłuszczowej koni

Zakład Farmakologii i Toksykologii Instytutu Weterynarii w Puławach
Kierownik: prof. dr T. JUSZKIEWICZ

W badaniach przeprowadzonych w wielu krajach w ciągu ostatniego dziesięciolecia wykazano, że praktycznie wszystkie zwierzęta mają zgromadzone w swoich tkankach pozostałości węglowodorów chlorowanych. Związki tego typu dostają się do ich organizmów przede wszystkim jako zanieczyszczenia pokarmowe i dlatego też wysokość zgromadzonych pozostałości zależy od sposobu odżywiania się zwierząt. Śledząc ogniwa łańcucha pokarmowego możemy obserwować kumulację pozostałości węglowodorów polichlorowych. W tkankach zwierząt odżywiających się roślinami stwierdza się zwykle znacznie mniejsze stężenia pozostałości insektycydów polichlorowych aniżeli u zwierząt mięsożernych, które wraz z pożywieniem zjadają insektycydy już poprzednio co najmniej raz zagęszczone w tkankach innych zwierząt. Dalszą konsekwencją tego procesu bywa występowanie zwiększonej zawartości metabolitów związków czynnych w tkankach zwierząt, należących do gatunków stojących w dalszych ogniwach łańcucha, a większej stosunkowo zawartości form pierwotnych pestycydów w tkankach zwierząt roślinożernych. Różnice te wyraźnie obserwowano w naszym Zakładzie, w czasie badań prowadzonych w ramach programu mającego na celu określenie stężeń pestycydów polichlorowych w tkankach zwierząt pochodzących z terenu całej Polski (1, 2). Jednym z etapów tych badań była analiza tłuszczu okolonerkowego pobranego od koni. W dostępnym piś-

miennictwie nie spotkano danych na temat pozostałości insektycydów polichlorowych w tkankach koni.

Materiał i metody

Materiał do badań pochodził z rzeźni rozmieszczonych w różnych regionach Polski. Do Zakładu próbki dostarczone były w pojemnikach z suchym lodem. Z jednej rzeźni otrzymywano od 1 do 20 próbek tłuszczu okolonerkowego pobranego od koni w wieku około 10 lat. Z próbek tych przygotowywano próby średnie do oznaczania poziomu pozostałości pestycydów. Próby dostarczone do Zakładu zaopatrzone były w świadectwa pochodzenia, dzięki czemu można było zidentyfikować pochodzenie materiału badanego.

Analizę pozostałości przeprowadzono za pomocą zmodyfikowanej metody Wooda (6, 7). Ekstrakcję wykonano stosując kolumnę celitową, przemywaną DMSO, a z kolei ekstrakt oczyszczano na kolumnie florisilowej przemywanej eterem naftowym. Eluat zagęszczano w aparacie Kuderna-Danish'a (4). Oznaczenia wykonano na chromatografie firmy Varian Aerograph, stosując kolumny szklane wypełnione 5% DOW 11 na chromosorbie W i 5% chromosorbie W przy temperaturach: kolumn — 180°C , detektorów — 190°C , dozowników — 195°C . Gazem nośnym był azot przepływający z szybkością 40 ml/minutę. Do oznaczeń wykorzystano detektor EC (trytowy) o napięciu 90 V.

Wyniki i omówienie

Wyniki otrzymane w toku analizy badanych przez nas prób zostały podane w tab. 1. Średnie stężenie (\pm błąd standardowy) DDE (p,p'-dychlorodwufenyldwuchloroetylen) wynosiło 0,112 ppm (\pm 0,008), DDD (p,p'-dwuchlorodwu-