

EWA OSUCHOWSKA*), HARRY BECKERS, POP SOENTORO

Adaptacja metody ADA do oznaczania drobnoustrojów *Aeromonas* w mięsie

Sekcja Higieny Żywności Instytutu Zdrowia Publicznego i Ochrony Środowiska, 3720 BA Bilthoven, Holandia

Wobec wzrostu zainteresowania drobnoustrojami z rodzaju *Aeromonas* jako czynnikiem wywołującym zatrucia pokarmowe u ludzi, prowadzone są liczne badania nad metodami wykrywania tych bakterii (6). W zależności od rodzaju materiału, w którym oznacza się obecność lub liczbę omawianych drobnoustrojów proponowane są różne warianty podłoża (2, 10, 12, 13). Wymienione prace dotyczą oznaczania bakterii *Aeromonas* w kale w środowisku ich naturalnego bytowania, czyli w wodzie. Nie wiele jak dotychczas istnieje sposobów oznaczania tych bakterii w żywności (4, 8).

Podłoże Ampicylin Dextrine Agar (ADA) wraz z zestawem kilku testów biochemicznych (wytwarzanie oksydazy, typ rozkładu węglowodanów w podłożu półpłynnym, ruch, rozkład glukozy z wytworzeniem gazu lub bez, rozkład eskuliny) stanowi metodę opracowaną dla oznaczania drobnoustrojów *Aeromonas* w wodzie (3). Układem różnicującym tego podłoża jest dekstran wraz z błękitem bromotymolowym oraz — jako dodatek substancji hamujących namnażanie się mikroflory towarzyszącej — zastosowano dezoksyholan sodu (100 mg/l l) oraz ampicylinę (10 mg/l l). Wymienione wyżej testy biochemiczne umożliwiają potwierdzenie i różnicowanie na poszczególne gatunki (*A. hydrophila*, *A. sobria*, *A. caviae*) wyizolowanych szczepów *Aeromonas*. Ponieważ podłoże ADA wraz z zestawem testów biochemicznych okazało się zadowalające w badaniach silnie zakażonych wód powierzchniowych, podjęto pracę, której celem było sprawdzenie przydatności tej metodyki w przypadku ilościowego oznaczania bakterii *Aeromonas* w mięsie.

Podjęto równocześnie próby modyfikacji warunków inkubacji oraz składu podłoża w celu optymalnego dostosowania go do badania mięsa.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 14 próbkach mięsa wołowego, 17 mięsa wieprzowego i 19 mięsa ryb. Po zmieleniu próbek sporządzono homogenizat (10 g próbki na 100 ml płynu do rozcieńczeń), który następnie zakażano znanymi szczepami *Aeromonas*. W tym celu namnażano wybrany szczep *Aeromonas* w 9 ml bulionu zwykłego przez 24 godz. (zakładając, że po tym czasie liczba komórek bakteryjnych w 1 ml podłoża wynosi około 10^8) i wykonywano kolejne (10^6 — 10^1) rozcieńczenia według ogólnie przyjętych zasad. Z trzech ostatnich rozcieńczeń wysiewano po 0,5 ml na 2 płytki podłoża ADA i po inkubacji w temp. 30°C przez 24 godz. otrzymywano 10^2 — 10^3 kolonii z rozcieńczenia o czystej hodowli, 10^1 — 10^2 kolonii z rozcieńczenia 7

oraz 10 kolonii z rozcieńczenia 8. Następnie z rozcieńczeń 6 i 7 wprowadzano po 1 ml do 2 probówek z 9 ml homogenizatu danej próbki. Po dokładnym wymieszaniu, wysiewano po 1 ml z każdej z 2 probówek zakażonego homogenizatu na 2 płytki podłoża ADA. Równolegle wykonywano badania ilościowe tych samych próbek mięsa naturalnie zakażonych. Po inkubacji, przeprowadzonej jak podano wyżej, liczono charakterystyczne dla drobnoustrojów *Aeromonas* żółte kolonie.

Uzyskiwane ilości drobnoustrojów *Aeromonas* w próbkach sztucznie zakażonych porównywano z liczbą tych bakterii otrzymaną z odpowiednich rozcieńczeń czystej hodowli. Ponadto otrzymywane ilości bakterii *Aeromonas* w próbkach sztucznie zakażonych zmniejszono o liczbę tych bakterii stanowiącą naturalne zakażenie badanych próbek. Procent odzyskiwanych bakterii w tych samych próbkach równolegle zakażonych z rozcieńczeń 6 i 7 czystej hodowli wyliczano osobno dla każdego z tych rozcieńczeń.

Oprócz tego wykonano krótkie serie doświadczeń, porównując zalewową i powierzchniową metodę wykonywania posiewów ilościowych, beztlenowe i tlenowe warunki hodowli oraz temperatury inkubacji 20°C i 30°C. Zbadano także wpływ różnej zawartości ampicyliny w podłożu (10, 15, 20, 25 mg/l l.) oraz dodatku 10 mg/l l polimiksyny zamiast ampicyliny.

33 wybrane szczepy drobnoustrojów rodzaju *Aeromonas* wyizolowane z próbek naturalnie zakażonych z potwierdzeniem ich przynależności do tego rodzaju i różnicowaniem na poszczególne gatunki przy pomocy krótkiego zestawu testów, poddano szczegółowym badaniom biochemicznym. Oznaczono ich zdolność do rozkładu argininy, lizyny, ornityny, arabinozy, arbutyny, wytwarzania indolu, siarkowodoru, lecytynazy oraz reakcję Voges-Proskauera.

Wyniki i omówienie

W tab. 1 wyrażone są w procentach ilości *Aeromonas* uzyskane w próbkach sztucznie zakażonych w porównaniu do ilości tych bakterii w czystej hodowli. W większości przypadków ilości te nieznacznie przekraczają 100%, ponieważ wiele próbek oprócz bakterii wysiewanych zawierało również bakterie pochodzenia naturalnego. Nieco niższy procent odzyskiwanych drobnoustrojów w próbkach wieprzowiny spowodowany jest silniejszym ich zakażeniem mikroflorą towarzyszącą. W mięsie ryb drobnoustroje *Aeromonas* zdobywały łatwiej przewagę nad mikroflorą towarzyszącą, co stało się prawdopodobnie przyczyną wyższej liczby odzyskiwanych bakterii.

Porównując zalewową i powierzchniową metodę posiewów ilościowych stwierdzono większą liczbę kolonii dekstrozo-dodatnich w metodzie zalewowej. W badaniach biochemicznych wyizolowanych szczepów wykazano jednak, że metoda ta dawała duże ilości fałszywie dodatnich reakcji wywołanych przez *Enterobacteriaceae* i *Pseudomonaceae*.

*) Praca wykonana w czasie stażu naukowego

Tab. 1. Ilość odzyskiwanych drobnoustrojów *Aeromonas* na podłożu ADA, w próbkach sztucznie zakażonych

| Rodzaj próbek | Procent bakterii w próbkach w stosunku do ilości bakterii w rozcieńczeniu 6 i 7 czystej hodowli | |
|-----------------|---|---------|
| | rozc. 6 | rozc. 7 |
| Mięso wołowe | 101 | 102,6 |
| Mięso wieprzowe | 99,5 | 100,2 |
| Mięso ryb | 122,5 | 100,7 |

Nie stwierdzono istotnych różnic w ilościach drobnoustrojów *Aeromonas* w próbkach sztucznie i naturalnie zakażonych, przy porównaniu beztlenowych i tlenowych warunków inkubacji. Tak więc warunki tlenowe, jako prostsze technicznie, uznano za właściwe. Natomiast wyższe ilości tych drobnoustrojów uzyskano w temperaturze inkubacji 30°C w porównaniu z temp. 20°C. Obniżenie temp. inkubacji do 20°C nie wpłynęło na spodziewane zmniejszenie wzrostu mikroflory towarzyszącej.

Ampicylina jest antybiotykiem, na działanie którego bakterie *Aeromonas* są w zasadzie odporne. Wskazano (9) jednak, że dodatek 30 mg/1 l tego antybiotyku do podłoża może hamować wzrost niektórych szczepów *Aeromonas*. Próbowano więc dostosować poziom ampicyliny tak, aby uzyskać efekt zahamowania wzrostu mikroflory towarzyszącej, bez szkody dla wzrostu bakterii *Aeromonas*. Stwierdzono, że dodatek 15, 20, 25 mg ampicyliny do 1 l podłoża zamiast dotychczasowej dawki 10 mg, nie wpływał istotnie ani na ilość odzyskiwanych bakterii *Aeromonas*, ani nie hamował wzrostu mikroflory towarzyszącej. Próbowano również zastąpić ampicylinę polimiksyną, która nie jest wymieniona w piśmiennictwie (1, 5, 7, 9, 11), że hamuje wzrost drobnoustrojów *Aeromonas*. Stwierdzono, że dodatek 10 mg/1 l tego antybiotyku hamował wzrost badanego szczepu *A. hydrophila* i *A. caviae*.

Z powyższych wyników można wyprowadzić wnioski, że podłoża i warunki hodowli stosowane w badaniu wody są również przydatne do badania mięsa. Mimo, że nie udało się zmniejszyć namnażania mikroflory towarzyszącej, to jednak stwierdzono, że na badanym podłożu ADA łatwo jest odróżnić kolonie *Aeromonas* od kolonii innych bakterii ze względu na ich wielkość i barwę.

Szczegółowymi badaniami biochemicznymi 33 losowo wybranych szczepów *Aeromonas* potwierdzono ich przynależność do poszczególnych gatunków, określoną przy pomocy krót-

kiego zestawu testów. Uzyskano więc obiema metodami wyniki zgodne. Zatem podłożo ADA wraz z krótkim zestawem testów biochemicznych stanowią prosty i właściwy schemat oznaczenia drobnoustrojów *Aeromonas* w mięsie.

Piśmiennictwo

1. Fass R.J., Barnishan J.: Antimicrob. Agents Chemother. 19, 357, 1981.
2. Graevenitz A., Bucher C.: J. clin. Microbiol. 17, 16, 1983.
3. Havelaar A. H., During M.: An Ampicillin Dextrin Agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration. Mat. Inst. Zdrowia Publ. Hig. Srodowiska, Bilthoven 1985.
4. Kielwein G.: Arch. Lebensmittelhyg. 20, 131, 1969.
5. Motyl M.R., Mc Kinley S., Janda J.M.: Antimicrob. Agents Chemother. 23, 151, 1985.
6. Osuchowska E.: Medycyna Wet. 43, 535, 1987.
7. Overman T.L.: Antimicrob. Agents Chemother. 17, 612, 1989.
8. Palumbo S.A., Marimo F., Williams A.C.: Appl. Environ. Microbiol. 50, 1027, 1985.
9. Richardson C.J.C.: J. Antimicrob. Chemother. 9, 267, 1982.
10. Robinson J., Beamon J., Wagener L.: J. med. Microbiol. 22, 315, 1986.
11. San Joaquin V., Scribner R.K., Pickett D.A.: Antimicrob. Agents Chemother. 30, 794, 1988.
12. Skotts E.B., Rimier R.: Appl. Microbiol. 26, 550, 1973.
13. Stern W.J., Drazek E.S., Joseph S.W.: J. Fd Prot 50, 66, 1987.

Adres autora: dr Ewa Osuchowska, ul. Warszawska 68 m 10, 10-034 Olsztyn

Осуховская Э., Бекерс Г., Сенторо П. — Исследования метода определения микроорганизмов из рода *Aeromonas* в мясе

Цель исследований состояла в приспособлении питательной среды ADA (Ampicillin Dextrine Agar), используемой для количественного определения микроорганизмов *Aeromonas* в воде, к исследованиям содержания этих бактерий в мясе. Исследования заключались в сравнении рекуперированных количеств микроорганизмов *Aeromonas* из проб, искусственно инфицируемых, с числом этих бактерий в чистой культуре штамма, который инфицировали пробы. Кроме того, сравнивали анаэробные и аэробные условия культуры, температуры инкубации 20°C и 30°C, разное содержание ампициллина, а также добавку полимиксина в среде. Количества рекуперированных бактерий *Aeromonas* при применяемых в исследовании воды в условиях культуры (инкубация в аэробных условиях в темп. 30°C, среда с добавкой 10 мг/л ампициллина) — в случае говядины составляли 101,8%, свинины — 99,8% и рыбы — 111,6%. Полученные результаты указывают, что среда ADA с набором нескольких биохимических тестов (образование оксидазы, тип разложения углеводов, разложение глюкозы с образованием газа, разложение эскулина), позволяющих дифференцировать микроорганизмы *Aeromonas* на отдельные виды, пригодна к количественному определению рассматриваемых бактерий в мясе.

Osuchowska E., Beckers H., Scentoro P. — Adaptation of the ADA method to determine *Aeromonas* in meat

The objective of the studies was to adopt the ADA agar (Ampicillin Dextrine Agar) used to a quantitative determinations of *Aeromonas* sp. in water to determination of the content of these bacteria in meat. The examination were based on comparisons of the number of recovered *Aeromonas* bacteria from samples artificially polluted with the number of this bacterium in a pure culture used to pollute an examined sample. Moreover, anaerobic and aerobic conditions of bacterial growth, temperatures of incubation 20°C and 30°C, various concentrations of ampicillin and an addition of polymyxine to a growth medium were compared. The number of recovered *Aeromonas* using the conditions of growth applied in water examina-

tions (aerobic incubation at 30°C, growth medium containing 10 mg of ampicillin/l) in a case of a beef meat was 101.8%, pork meat 99.8%, and fish meat 111.6%. The obtained results point that the ADA medium combined with a kit of certain biochemical

tests (oxidase production, type of polysaccharide degradation, fermentation of glucose with or without gas production, splitting of aesculine) which enable to differentiate the *Aeromonas* bacteria may be used to quantitative determination of *Aeromonas* in meat.

KRZYSZTOF KWIATEK

Ocena stanu bakteriologicznego glukozy używanej do peklowania mięsa

Zakład Higieny Produktów Zwierzęcych Instytutu Weterynarii,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Surowce pomocnicze używane w przetwórstwie mięsa tj. przyprawy, woda, substytuty białkowe, sacharoza, glukoza wywierają wyraźny wpływ na zanieczyszczenia bakteriologiczne produktów mięsnych (2, 7). Z ostatnio opublikowanych danych (4) wynika, że glukoza krystaliczna stosowana do sporządzania solanek peklowanych może stanowić poważne źródło zanieczyszczenia szynek pasteryzowanych przetrwalnikującymi laseczkami beztlenowymi. Warto odnotować jest fakt, że obowiązująca obecnie norma jakościowa (5) nie określa wymagań bakteriologicznych dla glukozy krystalicznej używanej w przemyśle mięsnym do sporządzania solanek peklowanych. Z dostępnego piśmiennictwa krajowego wynika również, że stan mikrobiologicznego zanieczyszczenia tego węglowodanu nie był przedmiotem zainteresowania badaczy.

W związku z powyższym podjęto badania, których celem było określenie stanu bakteriologicznego zanieczyszczenia glukozy używanej do peklowania mięsa. Ponadto postanowiono określić wpływ różnych poziomów glukozy w pożywce Wrzoska na zdolność wzrostu bakterii rodzaju *Clostridium*. Badania te pozwolą odpowiedzieć na pytanie, czy dodatek 1 g glukozy do podłoża Wrzoska nie stwarza w tej pożywce środowiska hamującego rozwój beztlenowych laseczek przetrwalnikujących.

Materiał i metody

Przedmiotem badań bakteriologicznych było 10 próbek glukozy krystalicznej pobranych z różnych partii produkcyjnych tego materiału. Węglowodan ten używany był do sporządzania solanki w zakładach mięsnych. Wszystkie partie badanego materiału pochodziły z jednego zakładu produkcyjnego, który produkuje ten cukier na bazie skrobi ziemniaczanej. Przeprowadzono następujące oznaczenia:

- ogólną liczbę bakterii tlenowych mezofilnych w 1 g,
- liczbę przetrwalnikujących bakterii tlenowych w 1 g,
- liczbę i miano przetrwalnikujących laseczek beztlenowych.

Powyższe oznaczenia wykonano zgodnie z obowiązującymi zasadami postępowania (2, 6), z wyjątkiem badania w kierunku obecności przetrwalnikujących laseczek beztlenowych w 1 g glukozy. W badaniu tym, celem wyeliminowania hamującego oddziaływania wy-

sokich stężeń glukozy na wzrost laseczek rodzaju *Clostridium*, zwiększono objętość pożywki Wrzoska do 40 ml. W ten sposób uzyskano w pożywce 2,5% koncentrację tego cukru, która nie wykazywała właściwości inhibicyjnych wzrostu. Ponadto, podobnie jak w pracy poprzedniej (4), do zestawu podłoży zalecanych normą (5) do izolowania laseczek *Clostridium* włączono agar odżywczy (Difco) z dodatkiem 10% krwi końskiej oraz podłoże agarowe Brucella (Ixoid) wzbogacone także 10% dodatkiem krwi końskiej.

Wyizolowane na podłożach agarowych szczepy beztlenowych laseczek przetrwalnikujących przesiewano kilkakrotnie aż do otrzymania czystych kultur. Wyosobnione szczepy laseczek rodzaju *Clostridium* sprawdzano na zdolność wytwarzania przetrwalników i ich umiejscowienie w komórce. Określono także ich zdolność rozkładu arabinozy, eskuliny, fruktozy, galaktozy, glukozy, glicerolu, ksylozy, laktozy, maltozy, manitolu, rafinozy, skrobi, sorbitolu, sacharozy i trehalozy. Badano także zdolność wyizolowanych szczepów do wytwarzania indolu, ureazy i siarkowodoru oraz właściwości proteolityczne w odniesieniu do żelatyny i kazeiny. Badania cech biochemicznych przeprowadzono wg metody Beerensa (2).

W trakcie badań wyłonilo się także zagadnienie wymagające sprawdzenia w jakim stopniu dodatek 1 g glukozy do próbki z podłożem Wrzoska oddziałuje hamująco na wzrost beztlenowych laseczek przetrwalnikowych (wyniki fałszywie ujemne).

W związku z powyższym postanowiono określić zdolność wzrostu wyizolowanych laseczek rodzaju *Clostridium* w podłożu Wrzoska zawierającym różne stężenia tego węglowodanu tj. 12,5%, 10,0%, 7,5%, 5,0%, 2,5% i 0%. Próbkę z pożywką Wrzoska o odpowiedniej koncentracji glukozy po dodaniu do każdej z nich co 1×10^8 komórek *Cl. pasteurianum* inkubowano w temp. 37°C w warunkach beztlenowych. Wynik odczytywano po 48 i 72 h inkubacji.

Wyniki i omówienie

Kształtowanie się poziomów ilościowego i jakościowego zanieczyszczenia glukozy mikroflorą tlenową i beztlenową oraz charakterystykę wyizolowanych szczepów beztlenowych laseczek przetrwalnikujących przedstawiono w tab. 1—3.

Jak wynika z danych tab. 1 na ogółem zbadanych 10 próbek glukozy we wszystkich przypadkach stwierdzono występowanie bakterii tlenowych i beztlenowych. Należy jednakże podkreślić, że ogólna liczba bakterii tlenowych mezofilnych oraz liczba bakterii tlenowych przetrwalnikujących była niewielka i w żadnej z badanych próbek nie przekroczyła 100 cfu/g.

Poziom zanieczyszczenia badanych próbek glukozy beztlenowymi laseczkami przetrwalni-