

ИВАН КАЛОЈНОВ, ГОРАН МОНОВ

Централен научноизследователски ветеринарномедицински институт -  
София

Проучванията върху видовия състав на микроорганизмите от сем. *Micrococcaceae* са насочени преди всичко към доказването на коагулазоположителни стафилококи. Цеева /1983/ при проведени у нас изследвания от 1971 до 1980 г. открива в 19,8% от пробите сурово свинско месо, взети от търговската мрежа *S. aureus* в количество от 50 до 250 клетки в 1,0 g.

Според Venderzant и Nickelson /1969/ 45,9% от изолираните 111 щама стафилококи при изследване микрофлората на месо от телета са били коагулазоположителни. Аналогични резултати се съобщават и от Surkiewicz и сътр. /1975/.

Други автори /1,2/ не изолират *S. aureus* от повърхността на трупове на едри преживни животни, а намират преди всичко видовете от род *Micrococcus*. Ограничени са проучванията върху видовия състав на микроорганизмите от сем. *Micrococcaceae* изолирани от повърхността на обектите в кланичната зала.

При проведени през 1981-83 г. от нас проучвания върху хигиената на месодобива в 6 големи месокомплекта в страната се установи, че микроорганизмите от сем. *Micrococcaceae* заемат до 10-15% от повърхностната микрофлора на трупове на закланите телета и свине, както и на обектите от кланичните зали /1983/.

Поради ограничените изследвания на видовия състав на микрококите и стафилококите и във връзка с усъвършенстване през последните години на технологиите за клане и обработка на едри преживни животни и свине си поставихме за задача да проучим видовият им състав при условията на промишлен месодобив.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучванията са проведени в 6 големи съвременно оборудвани месокомбинати. По метода на Дряблева са вземани смивки от външната част на ребрената област (8-10 ребро) на 179 заклани свине и 48 телета, след приключване на тоалета. Смивки от инвентара, съсъженията и външната среда на кланичните зали (по 48 от всеки обект) са вземани преди започване на работата и на 3-5-ия час от началото на работния ден.

Смивките са вземани с помощта на памучен тампон със стерилен физиологичен разтвор с 0,1% пептон с шаблон от 50 см<sup>2</sup> повърхност. След приготвяне на степенни разреждания количеството на стафилококите и микрококите определяхме по метода на Косъл чрез посевка на 0,1 см<sup>3</sup> върху твърда среда на Chapman /1945/ и кръвен агар с 10% NaCl и термостатиране при 37°C за 48 h.

За определяне броя и вида на микроорганизмите от сем. Micrococaceae в трупна, лимфните възли и паренхимни органи на 10 телета и 48 свине е спазена същата методична последователност, като се изхожда от изходно разреждане на хомогенизирана тъкан 1:10.

От поникналите колонии върху използваните твърди хранителни среди се почиства по няколко колонии, в зависимост от броят и морфологията им. Изолираните щамове диференцираме съгласно изискванията на Bergey's Manual of Determinative Bacteriology /1974/.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Получените резултати за видовия състав на микроорганизмите от сем. Micrococaceae, изолирани при добива на телешко месо (табл.1) показват, че най-често от повърхността на трупове след тоалета се установява *M.luteus* (42,67%) и *M.varians* (30,87%) по-рядко *S.epidermidis* от 1 и 2 биотип (по 8%), *S.saprophyticus* от 1 биотип (5,33%) и 2 биотип (1,33%), *M.roseus* (4,0%) и не се доказва *S.aureus*.

Изолираните на *S.epidermidis* *S.saprophyticus* и други и същи биотипове от повърхността на телешките трупове и от изследваните обекти на кланичната зала преди работата и по време на работния ден (табл.1) дава основание да допуснем вторично контаминиране на трупове по време на тех.ологичния процес. Аналогични констатации могат да се направят и по отношение на видовия състав на микрококите (табл.1).

Най-често от повърхността на телешките трупове се изолира *M.luteus* (55,18%) и *M.varians* (39,65%) и по-рядко *M.roseus* (5,17%). Данните от изследванията показват, че в изследваните проби телешко месо и вътрешни органи са диференцирани 7 щамове от род *Staphylococcus* и 8 щамове от род *Micrococcus* и в същите не се съдържа *S.aureus* (табл.1).

Получените от нас резултати потвърждават становището на Гогов и Алинасая-

ная /1981/ за широкото разпространение на микроорганизмите от сем. Micrococaceae по повърхността на трупове от заклани телета и говеда. Същите автори изолират най-често *M.varians* (73,23%) и *S.saprophyticus* (19,68%) и по-рядко *Micrococcus* spp (7,09%) и не установяват *S.aureus* по повърхността на заклани говеда и телета.

При проведените изследвания върху разасовано и опаковано под и без вакуум телешко месо, Донзо и Гогов /1985/ определят *M.luteus* в 56,7% от изолираните щамове, *M.varians* в 41,8% и *S.saprophyticus* в 1,5% и не установяват *S.aureus*.

При изследване на изолирани от повърхността на трупове на заклани свине 138 щамове грам положителни коки се установи, че болшинството от тях - 114 (83,71%) се отнасят към род *Micrococcus*. Най-често се изолира *M.varians* (56,14%) и *M.luteus* (37,72%) и по-рядко - *M.roseus* (6,14%).

От повърхността на изследваните 179 свине са доказани 3 (1,68%) щамове *S.aureus*. *S.aureus* се установява и в 2,08% от изследваните по 48 проби чужд проби и групни лимфни възли и в 6,25% от далака и мезентериални лимфни възли. В мускулатурата и вътрешните органи на изследваните свине се установяват 138 щамове *S.epidermidis* от 1, 2 и 4 биотип и 230 щамове *S.saprophyticus* от 1, 2, 3 и 4 биотип. При отсъствието на тези видове стафилококи по повърхността на изследваните обекти в кланичната зала може да се допусне ендогенно инфектиране на месото и вътрешните органи на закланите свине (табл.2).

При проучване на 209 щамове от род *Micrococcus*, изолирани от 6 обекта на кланичната зала преди започване на работа и на 3-5-ия час от началото на работния ден се установи, че 117 (55,98%) са определени като *M.varians*, 66 (31,58%) като *M.luteus* и 26 (12,44%) като *M.roseus*. Този резултат корелира с данните за видовия състав на тези микроорганизми по повърхността на закланите свине и доказва възможността за вторичното контаминиране на трупове по време на технологичната обработка.

## ИЗВОДИ

От изолираните 239 щамове от сем. Micrococaceae при добив на телешко месо *S.epidermidis* са диференцирани като *M.varians*; 90 (37,66%) - *M.luteus*; 24 (10,04%) - *S.epidermidis* от 1 и 2 биотип; 21 (8,78%) - *S.saprophyticus* от 1 и 2 биотип и 9 (3,77%) - *M.roseus*.

Коагулазоположителни стафилококи не са установени.

При добив на свинско месо от изолираните 802 щамове микрококи и стафилококи *S.saprophyticus* са определени като *S.saprophyticus* от 1, 2, 3 и 4 биотип; 226 (28,18%) като *M.luteus*; 158 (19,70%) *S.epidermidis* от 1, 2, 3 и 4 биотип; 117 (14,59%) *M.luteus*; 41 (5,11%) *M.roseus* и 13 (1,62%) *S.aureus*.

близка в остро противоречие със срока на тяхното съхранение (до 48 h).  
 С цел синхронизиране на бактериологичното изследване с процеса на производство и реализация на мляното месо и месните полуфабрикати си поставихме за задача да потърсим възможности за ускоряване (в рамките на 24 h) изследването за наличие на салмонелни бактерии в тези продукти.

#### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

В опитите са използвани следните еталонни щамове: *S. typhimurium* 209, *S. heidelberg* 5210, *S. dublin* 5128, *S. muenster* 106, *S. muenchen* 3840, *E. coli* B 53, *E. coli* B 40, *Citrobacter freundii* O 36 Be 114/66 получени от Държавната микробна колекция при ДИКЛС, София; като течни обогатителни среди - сух селенитов бульон, производство на НИЗПБ, София, тетратионатов бульон по Muller-Kauffmann (Oxoid) и като твърди диференциращи среди - сух брилянтгрюн-фенол-рот агар и Гаснер-агар, производство на НИЗПБ, София.

Бактериалните суспензии за контаминиране на течните среди и производствените партиди мляно месо са приготвяни от 24-часови агарове култури на съответния щам в физиологичен разтвор с 1% пептон с рН 7,2. След престояване в хладилник при 4-6°C за 4 часа броят на жизнеспособните бактериални клетки е определен по метода на Кох. Всеки опит е повтарян 5-8-кратно, като резултатите представляват средно аритметични стойности.

Като контролен е използван арбитражният метод по БДС 6835-74 /1/ с 30g проба, предобогатяване във буферизирана пептонова вода, обогатяване в F-селенитов бульон по Leifson и трикратно преносяване до 72-ия час върху брилянтгрюн-фенол-рот агар по Kauffmann и агар на Гаснер.

#### РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

При предварително извършени опити с чисти култури се установи /5/, че салмонелите се размножават около 3 пъти по-бурно в месопептонен бульон в сравнение с буферизираната пептонова вода и около 46,4 пъти по-слабо в селенитови среди в сравнение с месопептонен бульон. Поради разнообразния характер на съпътстващата микрофлора при посяване на мляно месо изолването и доказването на салмонели чрез набогатяване в обикновен месопептонен бульон или буферизирана пептонова вода е практически невъзможно. Поради това се проследи размножителният потенциал на салмонелите в селективни обогатителни среди, прилагани в ежедневната лабораторна практика у нас.

Таблица 1

Съотношение между броя на салмонелите на 6-ия час от култивирането им на 37 и 43°C в тетратионатов бульон и F-селенитов бульон по Leifson

Салмонелни видове		Температура	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. heidelberg</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. muenster</i>
Условия на култивиране						
Опити с чисти култури салмонели	тетратионатов бульон	37°	3,30	1,88	32,10	7,10
		43°	3,70	1,04	11,60	12,20
	съотношение 43/37°		1,19	0,55	0,36	1,72
	селенитов бульон	37°	12,10	6,60	12,50	1,84
	43°	22,00	14,30	53,84	9,70	
	съотношение 43/37°		1,82	2,17	4,31	5,27
Опити с контаминирано със салмонели мляно месо	тетратионатов бульон	37°	37,20	21,90	23,30	18,40
		43°	46,30	23,40	29,10	25,10
	съотношение 43/37°		1,24	1,07	1,25	1,36
	селенитов бульон	37°	45,30	16,80	17,10	7,40
	43°	545,40	43,00	33,40	24,40	
	съотношение 43/37°		12,04	2,56	1,96	3,30

Легенда: цифрите в текста означават lg 10 от средните стойности на броя на салмонелите на 6-ия час от култивирането по отношение броят им в момента на посяването, приет условно за единица

От приведените в таблица 1 данни за размножаване на салмонелни бактерии от 4 вида се вижда, че *S. dublin* и *S. heidelberg* се размножават по-интензивно при 37°C в тетратионовия бульон в сравнение с 43°C, докато в селенитов бульон динамиката на размножаване на всички изпитвани шамове при 43°C е по-интензивна сравнена със 37°C.

Тази тенденция е по-подчертана при проведените опити за сравняване размножителния потенциал на 4-те салмонелни вида при изкуствено контаминирано мляно месо (табл. 1). От получените данни се вижда, че при изследване на мляно месо за салмонели по-подходяща среда е F - селенитовият бульон по Leifson при култивиране на 43°C.

Подобно на установените при нашите проучвания индивидуални различия в размножителната способност на салмонелите от отделни серотипове са наблюдавани и от други автори / 9,11,12,23/. За тетратионовия бульон има проучвания, според които броят на салмонелите към 6-ия час е по-висок при 37°C в сравнение с 43°C /14, 16, 22/, докато всички автори са единодушни, че в селенитови среди всички салмонелни видове се размножават по-интензивно на 43°C в сравнение с 37°C. Така например при нашите изследвания (табл.1) *S. heidelberg* достига на 6-ия час 15,79 пъти по-голям брой жизнеспособни клетки в селенитов бульон в сравнение с тетратионовата среда.

С оглед изпитване растежните възможности на салмонелите в селенитов бульон при 43°C бяха поставени и опити с други ентеробактерии, най-често изолирани от мляното месо и то в съотношение 1:10 и 1:100 в тяхна полза по отношение броят на салмонелите (табл.2). И при двете групи опити се доказва, че на 6-ия и 24-ия час салмонелите вземат превес над *E. coli* и *Citrobacter*, поради което изолирането им върху твърди диференциращи хранителни среди може да стане успешно след 6-ия час от началото на обогатяването на пробите. До подобни изводи са достигнали и други автори при изолиране на салмонели от закрани по необходимост животни, месокожно брашно, хранителни продукти и други / 9,10,15,21/.

В резултат на тези и други проучвания бе уточнен ускорен културелен метод за изолиране на салмонели от мляно месо и сурови месни полуфабрикати, който се състои в следното: 30 g от пробата се размесват добре в 270 cm<sup>3</sup> предварително temperиран F - селенитов бульон по Leifson на 43-45°C, който се култивира на 43°C. Препосвяната от него се извършва на 6-8-ия час върху фенолрот-агар по Kauffmann и агар на Гаснер. Петите се термостатират до другата сутрин и се отчитат за съответните салмонела колонии по общприетите методи. Термостатирането и препосевките от

Таблица 2  
Динамика на размножаване на смесени култури от ентеробактерии в F - селенитов бульон по Leifson при 43°C

Време на култивиране		6-ти час	24-и час
Изпитвани култури	<i>S. typhimurium</i>		
	<i>E. coli</i>	4,76 / 3,17	8,37 / 3,49
	<i>S. dublin</i>		
	<i>E. coli</i>	4,27 / 3,74	7,03 / 3,90
Съотношение на салмонели към други ентеробактерии 1:10 в момента на посяването при брой на салмонелите 150 - 180 /cm <sup>3</sup> селенитов бульон	<i>S. typhimurium</i>		
	<i>Citrobacter</i>	4,37 / 2,87	7,72 / 3,19
	<i>S. dublin</i>		
	<i>Citrobacter</i>	4,73 / 2,05	7,52 / 3,29
Съотношение на салмонели към други ентеробактерии 1:100 в момента на посяването при брой на салмонелите 170 - 250 /cm <sup>3</sup> селенитов бульон	<i>S. typhimurium</i>		
	<i>E. coli</i>	5,66 / 3,70	8,09 / 4,65
	<i>S. dublin</i>		
	<i>E. coli</i>	4,21 / 3,07	9,18 / 4,72
	<i>S. typhimurium</i>		
	<i>Citrobacter</i>	4,91 / 3,05	8,85 / 3,27
	<i>S. dublin</i>		
	<i>Citrobacter</i>	4,80 / 3,44	8,06 / 3,12

Легенда : цифрите в текста представляват средни стойности от lg 10 на броя на съответните видове бактерии в cm<sup>3</sup> селенитов бульон

Таблица 3

Възможности за изолиране на салмонели от изкуствено контаминирани производствени партии мляно месо по ускорен културелен метод и метод по БДС 6835 - 74

Проби и метод на изследване Салмонелен вид	Брой на изследвани проби	Брой на салмонели в 1 g проба	Положителни за салмонели проби ( процент )		Положителни за <i>V. proteus</i> проби ( процент )
			Ускорен културелен метод	Метод по Б Д С	
<i>S. typhimurium</i>	14	60 - 130	11(78,57%)	13(92,86%)	4 (28,57%)
<i>S. heidelberg</i>	10	0,45	0	0	0
	10	3,10	0	3 (10%)	0
<i>S. muenchen</i>	10	78 - 110	9 (90%)	10 (100%)	1 (10%)
	5	2,20	0	1 (10%)	1 (10%)
<i>S. muenster</i>	5	7	0	5 (100%)	0
	10	17	10 (100%)	10 (100%)	0
<i>S. dublin</i>	5	65 - 190	5 (100%)	5 (100%)	1 (20%)
	5	7	0	2 (40%)	0
<i>S. dublin</i>	5	7,3	1 (20%)	2 (40%)	0
	25	12	3 (12%)	8 (32%)	7 (28%)
	5	70 ± 170	5 (100%)	5 (100%)	0
Всичко	114		34(29,82%)	43(37,72%)	13(11,40%)

обогатителната среда могат да продължат по стандартния метод.

От данните приведени в таблица 3 се вижда, че при изследване на изкуствено контаминирано с 5 салмонелни вида проби от мляно месо, взето от производството възможностите на стандартния арбитражен метод и на предлаганият от нас ускорен ( 24 часов ) метод за доказване на салмонели са приблизително еднакви и се покриват напълно при съдържание над 100 салмонелни клетки в грам проба. Наличието на пълзящи форми на *V. proteus* пречат на отчитането на резултатите, но при ускорения метод поради краткия срок изенето не е обхванало големи площи от агаровата среда и се подтиска в петрата с агар на Гаснер.

Възможностите на предлагания ускорен метод ( над 100 клетки /g продукт ) удовлетворяват практическите изисквания, като се имат предвид установените от McCullough и Bissel /17/ минимални инфектиращи дози на жизнеспособни салмонели, необходими за заразяване на хора, както и съдържанието им във взети от практиката месни фаршове /8/ и това, че резултатът се отчита преди продукцията от мляно месо или сушени месни полуфабрикати да бъде допусната за реализация.

#### ИЗВОДИ

Най-подходяща обогатителна среда за доказване на салмонелни бактерии в мляно месо и месни полуфабрикати е селенитовият F - бульон по Leifson , култивиран на 43°C.

Броят на размножилите се салмонелни клетки в селенитов бульон при 43°C към 6 - 8-ия час значително надвишава този на *E. coli* и *Citrobacter* и позволява успешна изолация чрез препосиване върху брилянтгрюн-фенолът агар по Kauffmann и агар на Гаснер.

При сравняване възможностите на предлаганият от нас ускорен културелен метод и на арбитражния по БДС 6835-74 се установяват еднакви резултати при изолиране на салмонели от мляно месо при съдържание над 100 клетки /g продукт.

Доказват се видови различия във размножителните възможности на отделните салмонелни видове в селенитови и тетратионатови обогатителни среди.

#### ЛИТЕРАТУРА

- БДС 6835-74. Месни продукти. Методи за бактериологично изследване
- Иванов Л., Ив. Калоянов, М. Гадева. Месопрмишленост, 16, 1983, № 4, 75-77
- Монова Ив., Г. Монов, М. Кунев. Вет. мед. науки, 18, 1981, № 7, 98-103

4. Монова Ив., Г. Монов, В. Долоденко. Вет. мед. науки, 18, 1981, № 6, 69-75
5. Калоянов Ив., Ф. Филев, Цв. Доков. Отчет по тема 30.2.1 "Експресни методи за определяне на микроорганизми от семейство Enterobacteriaceae в хранителни продукти от животински произход", ЦИИВМИ, София, 1982, ЦИИВМИ
6. Калоянов Ив., Г. Монов, Ив. Монова и др. Вет. мед. науки, 22, 1985, № 6 (под печат)
7. Калоянов Ив., Б. Ликов. Регионална научно-производствена конференция по салмонелите и салмонелозите, 13.V.1985 г., Разград
8. Куликовский А.В. Вопр. питания, 1983, № 5, 72-77
9. Славков Ил. Вет. мед. науки, 9, 1972, № 6, 27-31
10. Славкова Л. Кандидатска дисертация, 1981, М. А., София
11. Carlson V.L., G.H. Snoeyjensbos. Amer. J. Vet. Res., 33, 1972, 177-192
12. Chau P.Y., Y.R. Leung. J. Appl. Bacteriol., 45, 1978, № 3, 341-345
13. Edel W. Comparative Studies on Salmonella Isolation. Nat. Institut of Public Health, Bilthoven, Netherlands, Diss., 1974
14. Edel W., E.H. Kampelmacher. Bull. World Health Org., 48, 1973, 167-179
15. Georgala D.L., M. Doothroyd. Appl. Bacteriol., 28, 1965, 206-215
16. Harvey R.W.S., T.H. Price. J. Appl. Bacteriol., 43, 1977, № 1, 145-148
17. McCullough N.B., C.W. Eissel. J. Inf. Diseases, 89, 1951, № 3, 209-215; 259-266
18. Mulindwa D.K., O. Pietzsch. Zbl. Bakt. Hyg., I Abt., Orig. A., 243, 1979, № 2, 336-348
19. Pohl P., P. Lintermans. Ann. Méd. Vét., 127, 1983, 115-121
20. Polaaek J., J. Guilka, I. Ingr. Veterin. Med., 25, 1980, № 5, 285-291
21. Read R.B., A.L. Reyes. Appl. Microbiol., 16, 1968, 746-748
22. Schothorst M. van., E.H. Kampelmacher. Microbiol. Dried Foods. 6th Intern. Symp. on Food Microbiol., Bilthoven, Nederland, 1968, 193
23. Tang C.C., H. Jackson. J. Appl. Bacteriol., 46, 1979, 143-146
24. Wit De J.C., E.H. Kampelmacher. Zbt. Bakteriologie, Mikrobiologie, Hygiene, Abt. I, Orig. B., 172, 1981, № 4-5, 390-398