

5 - 21

ЗАВИСИМОСТ МЕЖДУ ТЕМПЕРАТУРАТА И ПРОДЪЛЖИТЕЛНОСТТА НА ОБОГАТИВАНЕ
ПРИ ИЗОЛИРАНЕ НА YERSINIA ENTEROCOLITICA ОТ МЕСО

Жако Кунев - ст.н.сътрудник

Централен научноизследователски ветеринарномедицински институт-София

При изолиране на *Yersinia enterocolitica* от хранителни продукти от животински произход, съществуват етапи от важно техническо естество. Провеждани са изследвания върху състава и вида на средите за обогатяване, върху вида на твърдите селективни среди и др. Твърде противоречиви са резултатите от изследвания свързани с температурата и времето за обогатяване на материалите за изследване. Така например *Aulizio* и сътр. /8/ провеждат обогатяване при 4 или 26°C но никога две пробы поотделно на две температури. *Lee* и сътр. /7/ обогатяват при 22°C в продължение на два дни; *Weagant* и сътр. /10/, *Doyle* и *Hugdahl* /5/, използват за обогатяване температура 22°C за 2 дни, а *Schiemann* /9/ за тези цели си вършил обогатяване на пробы от млечни продукти и сточни води, използвайки едновременно култивиране при 2 и 22°C, но с различни по състав среди за обогатяване. По-голямата част от цитирните автори използват за обогатяване фосфатно-буферен разтвор с обогатяването се 4 или 22°C, без да се упоменават предпочтенията им към всяка от по-съчлените температури. *Юруков* и *Славчев* /2/, правят извод, че при обогатяване на 4°C се отварява 7,6 /1,4,5,7,8/. Най-често използваните от тях температури, при които се извършва обогатяването са 4 или 22°C, без да се упоменават предпочтенията им към всяка от по-продължението температури. *Юруков* и *Славчев* /2/, правят извод, че при обогатяване на 4°C в продължение на 21 дни, се открива по-голям процент положителни за *Йерсиния* пробы, като при 22°C за два дни. Някои от посочените по-горе автори /3,5,7/ предпочитат да използват 22°C, при работата с чисти култури и при рутинни изследвания, с оглед по-брзо получаване на резултата от анализъа. От посочените литературни източници ясно, че няма точно определено съвящане относно температурите и времето за

обогатяване при изследванията свързани с доказване наличието на *Y. enterocolitica* в хранителни продукти.

С настоящите изследвания си поставихме за цел да определим процента на изолирани на *Y. enterocolitica* от преби сухово мясо в зависимост от температурата и продължителността на обогатяване.

СОБСТВЕНИ ИЗСЛЕДВАНИЯ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Обект на изследване бяха 21 преби телешко мясо, което е изпращано от практиката за рутинни изследвания в института. 25% от всяка преба наризвахме на дребни късчета и хомогенизирахме механично за 4-5 min след което разделяхме приблизително на две равни части и поставяхме в ерленмаерови колби. Като среда за обогатяване използвахме фосфатно-буферен физиологичен разтвор с pH 7,6 (PBS). Към всяка от колбите прибавяхме по 115 PBS. Едната от тях поставяхме за обогатяване при 22°C за два дни, а другата при 4°C - в продължение на 21 дни. Алкалното третиране, преди всяко посяване върху MacConkey агър, извършвахме с 0,5% разтвор на KOH - приготвен по Aulisio и сътр. /3/ и Lee и сътр. /7/, с експозиция 3 min. От алкално третираната обогатена среда вземахме по 0,1 ml и нанасяхме върху повърхността на агара, след което разстилахме равномерно с помощта на стъклено бастунче. Последващото култивиране, провеждахме в термостат с температура 25°C за 48 h, след което отделяхме същинските за йерсинии колонии. Посявка от материала обогатяван при 22°C извършвахме еднократно, на втория ден, а от този обогатяван при 4°C - на 7, 14 и 21-ия ден. Идентифицирането на *Y. enterocolitica* от другите представители на сем. Enterobacteriaceae, извършвахме чрез биохимични тестове по схеми на Hawkins и Brenner /6/, и Darland и сътр. /4/.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Получените от изследванията резултати посочваме на таблица 1.

Табл. 1.

На таблицата се вижда зависимостта между температурата, при която се извършва обогатяване на материала в PBS и времето за култивиране. При обогатяване на 22°C и продължение на 2 дни, се установяват положителни за йерсинии 8 броя от изследванията 21 преби телешко мясо (преби №№ 1, 2, 3, 4, 7, 13, 14, 15), което представлява 36% от тях. Когато обогатяването е извършвано при 4°C, в продължение на 21 дни, на 7-ия ден са установяват положителни за йерсинии 3 броя преби; на 14-ия ден - 5 броя и на 21-ия - 8 преби, което представлява съответно процент положителни 14, 23 и 36% спрямо общия брой изследвани преби. Вижда се, че с удължаване времето на култивиране при 4°C, нараства броя и процента на положителните за йерсинии преби телешко мясо. В действи-

телност след обогатяване при 4°C, са доказани 11 положителни за йерсинии преби (№№ 4, 9, 10, 13, 14, 15, 17, 18, 20 и 21), което е 52% от тях. Вижда се, че по този начин на обогатяване се откриват с 16% повече положителни за йерсинии преби от телешко мясо, отколкото при обогатяване на 22°C за два дни. Тези наши резултати са в потвърждение на данните съобщавани от други изследователи /2, 9/.

При по- внимателен анализ на посочените на таблицата резултати и тяхното интерпретиране, би могло да се направят допълнително и други изводи. Така например, наричайт пребите №№ 1, 2, 7) материалът от които е обогатяван при 22°C, е установено наличието на йерсинии, докато същите обогатявани при 4°C в продължение на 21 дни, са се оказали отрицателни за този вид бактерии. Обратно, пребите №№ 9, 10, 17, 18, 20 и 21, са установени положителни за йерсинии след обогатяване при 4°C, и отрицателни - след обогатяване на 22°C. Освен това при преби №№ 3, 4, 13, 14 и 15, има съвпадение на полученните положителни резултати, след обогатяване при двете температури. Като изхождаме от факта, че на анализ се подлага един и същ материал (добре хомогенизиран), като е поставен само при различни условия на обогатяване, считаме че за посочените различия влияят други фактори. Възможно е наличната съществуваща микрофлора да получава в различна степен развитие под влияние на използваните температури на обогатяване. При тези условия, под въздействие на отделените вещества от обмяната на веществата на тази микрофлора, от биохимичните процеси в изследвания материал, съществените вещества се образуват вещества от биологично, биохимично и физикохимично естество, които да подтикнат развитието на йерсинии или да намалят тяхната чувствителност към алкалното третиране.

В действителност при нашите изследвания, чрез използване на две температури на обогатяване са открити 14 положителни за йерсинии преби телешко мясо, което представлява повече от 66% от всичко изследваните 21 преби. Този процент положителни преби на йерсинии материали, е значително по-висок от процента положителни преби взети поотделно за двете температури на обогатяване. Приемайки, че чрез използване обогатяване при две температури поотделно, сме установили 100% (14 броя) от положителните за йерсинии преби, то посредством обогатяване при 22°C, се откриват 57% (8 броя), а при 4°C - в 78% (11 броя) от тях. Видно е, че и при двете начини на обогатяване не е възможно да се докажат 100% от положителните за йерсинии преби. Ето защо, като имаме предвид, че за получаване на окончателен реален резултат, върху хода на анализа при обогатяване на двете температури, могат да влияят много други фактори, никакъв от които посочихме по-горе, считаме че за рутинните лабораторни изследвания на мясо е необходимо едновременно обогатяване при 22 и 4°C, в продължение съответно 2 и 21 дни.

ИЗВОДИ

Чрез обогатяване при 22°C , в продължение на 2 дни, и при 4°C - за 21 дни, се доказват съответно в 57 и 78% положителни, спрямо общия брой положителни за йерсинии проби от телешко месо.

За рутинни лабораторни изследвания на телешко месо е необходимо едновременно обогатяване при 22 и 4°C , в продължение съответно 2 и 21 дни.

ТАБЛИЦА 1
ИЗЛИРАНЕ НА ЙЕРСИНИИ В ЗАВИСИМОСТ ОТ ТЕМПЕРАТУРА И ПРОДЪЛЖИТЕЛНОСТ НА ОБОГАТЯВАНЕ

Проба №	Температура и продължителност на обогатяване			
	22°C - 2 дни	4°C - 7 дни	4°C - 14 дни	4°C - 21 дни
1	+	-	-	-
2	+	-	-	-
3	+	-	+	-
4	+	-	-	+
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	+	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	+	-	-
13	-	-	-	-
14	+	-	+	+
15	+	-	-	+
16	+	+	+	+
17	-	-	-	-
18	-	-	-	+
19	-	-	+	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	+
Положителни за йерсинии	8	3	5	8
% положителни за йерсинии	36	14	23	36

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Павлов, А. Ветеринарномедицински науки, 1984 (под печат)
2. Йруков, М., Г. Славчев. Ветеринарномедицински науки, 1984 (под печат)
3. Aulizio, C., I. Mehlman, A. Senders. Appl. Environmental Microbiology, 1980, v. 39, No 1, 135-140.
4. Darrland, G., W. Ewing, B. Davis. U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1975, 1-21.
5. Doyle, M., M. Hugdahl. Appl. Environmental Microbiology, 1983, v. 45, No 1, 127-135.
6. Hawkins, T., J. Brenner. U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1978.
7. Lee, W., M. Harris, D. McClain, R. Smith, R. Johnston. Appl. Environmental Microbiology, 1980, v. 39, No 1, 205-209.
8. Norman, J.. Journal of Food Science, 1981, 46, 41-42.
9. Schiemann, D. Appl. Environmental Microbiology, 1983, v. 46, No 1, 22-27.
10. Weagant, S., Ch. Kaysner. Appl. Environmental Microbiology, 1983, v. 45, No 2, 468

Бактерии от съдържимото на кишката при свине и кози са изучавани във въздух MacConkey агар, инокулиран с 0,5% материя на МИ - пригответ по Американския стандарт /3/ и каш, в съдър. /7/, с инокулация 3 мл. От временно трестираният въздух съдържа до 0,1% в начинъчните въздухи концентрация на бактерии, дада ново място размножение с помощта на съдържанието бактерии. Присъщото култивиране е в термостат при температуре 35°C за 48 ч, след което съдържанието съдържа 10⁶ бактерии /мл. Концентрацията от материята обработвана при 55°C във времето 10-15 мин. е 10⁵ бактерии /мл. Концентрацията от материята обработвана при 25°C във времето 10-15 мин. е 10⁴ бактерии /мл. Концентрацията от материята обработвана при 15°C във времето 10-15 мин. е 10³ бактерии /мл. Концентрацията от материята обработвана при 5°C във времето 10-15 мин. е 10² бактерии /мл.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪДЛЕНИЕ

Получените от изследованието резултати са съставени по таблица 1.

Табл. 1.

На табличата са видете зависимостта между температурата, при която са обработвани и материята в МИ и времето за култивиране. При обработване на времето за култивиране не е 2 дни, се установяват различията за всички, в брой от всички 27 проби, разреди 1, 2, 3, 4, 7, 13, 14, 15. Когато обработвато съдържа 10⁶ бактерии, то времето за култивиране при 35°C е приближено до 24 ч, а при 25°C е приближено до 21 ч, при 15°C е приближено до 18 ч, при 5°C е приближено до 15 ч, при 2°C е приближено до 12 ч, при 1°C е приближено до 10 ч. Когато обработвато съдържа 10⁵ бактерии, то времето за култивиране при 35°C е приближено до 24 ч, а при 25°C е приближено до 21 ч, при 15°C е приближено до 18 ч, при 5°C е приближено до 15 ч, при 2°C е приближено до 12 ч, при 1°C е приближено до 10 ч. Когато обработвато съдържа 10⁴ бактерии, то времето за култивиране при 35°C е приближено до 24 ч, а при 25°C е приближено до 21 ч, при 15°C е приближено до 18 ч, при 5°C е приближено до 15 ч, при 2°C е приближено до 12 ч, при 1°C е приближено до 10 ч. Когато обработвато съдържа 10³ бактерии, то времето за култивиране при 35°C е приближено до 24 ч, а при 25°C е приближено до 21 ч, при 15°C е приближено до 18 ч, при 5°C е приближено до 15 ч, при 2°C е приближено до 12 ч, при 1°C е приближено до 10 ч.