

EWA POGORZELSKA, STANISŁAW KAFEL, JAN URADZIŃSKI

WPLYW CZASU PRZEDNAMNAŻANIA ORAZ STEŻENIA POŻYWEK WYBIÓRCZO-NAMNAŻAJĄCYCH NA EFEKTYWNOŚĆ IZOLACJI PAŁECZEK *SALMONELLA* Z HOMOGENIZATÓW MIĘSA MROŻONEGO

THE EFFECT OF THE PREINCUBATION TIME AND CONCENTRATION
OF SELECTIVE MULTIPLYING MEDIA ON THE EFFECTIVENESS
OF *SALMONELLA* ORGANISMS ISOLATION FROM FROZEN MEAT
HOMOGENATES

Z Zakładu Żywnienia Klinicznego Instytutu Żywności i Żywnienia w Warszawie
Kierownik: prof. dr hab. W. B. Szostak

Porównano efektywność metod izolacji salmonelli z homogenizatów mięsa mrożonego po wprowadzeniu do pożywek wybiórczo-namnażających Rappaport-Vassiliadis oraz SC (z kwaśnym seleninem sodu i cystyną), przygotowanych wg przepisu i podwójnie stężonych różnych objętości próbek przednamnażanych przez 6 i 20 h w zbuforowanej wodzie peptonowej.

W celu skrócenia metodyki oznaczania salmonelli w żywności w ostatnich latach coraz częściej podejmuje się próby eliminacji etapu przednamnażania nieselektywnego zarówno w powszechnie dotąd stosowanych metodach hodowlanych, jak i w opracowywanych metodach szybkich tzw. skryningowych. W związku z tym próbki żywności bez przednamnażania wprowadza się bezpośrednio do płynnych pożywek wybiórczo-namnażających. Prowadzi to jednak do zmniejszenia wykrywalności salmonelli, zwłaszcza przy niewielkim zakażeniu początkowym lub w przypadkach osłabienia bądź uszkodzenia tych bakterii wskutek różnych zabiegów technologicznych badanej żywności [3, 4]. Podobnie skrócenie czasu przednamnażania w pożywkach nieselektywnych do 6 lub 7 godzin zmniejsza efektywność wykrywania salmonelli w porównaniu z okresem 24-godzinny [2, 3].

W niniejszej pracy podjęto próbę skrócenia czasu przednamnażania homogenizatów mięsa mrożonego w zbuforowanej wodzie peptonowej przy równoczesnym wprowadzaniu różnych objętości przednamnażonej hodowli do różnych stężeń pożywek wybiórczo-namnażających. Zamiast obowiązującej w Polskich Normach pożywki z czterotioanem sodu (*Müller-Kauffmanna*) zastosowano wprowadzaną ostatnio w wielu krajach zalecaną przez ISO (Międzynarodową Organizację Standaryzacyjną) pożywkę *Rappaport-Vassiliadis* (RV), która umożliwia uzyskanie bardziej miarodajnych wyników [1, 6, 8, 9].

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Do badań użyto szczepów *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* i *Salmonella agona*, otrzymanych z kolekcji Instytutu Weterynarii w Puławach.

Mielone mięso wołowe pochodzące z Zakładów Mięsnych w Warszawie dzielono na porcje o masie 25 g, zakażono jednodniową hodowlą bulionową badanych szczepów i przechowywano 2—3 miesiące w zamrażalniku lodówki (Donbas 9M) w temp. -12°C .

Zakażenie początkowe 25-gramowej porcji mięsa przed jego zamrożeniem wynosiło 10^3 — 10^4 komórek badanego szczepu *Salmonella*.

Z każdej porcji po rozmrożeniu przygotowywano homogenizat w 225 ml zbuforowanej wody peptonowej i przednamnażano w temp. 37°C przez 6 i 20 godzin. Po 6-godzinym przednamnożeniu przenoszono 1,2 i 5 ml hodowli do 10 ml podwójnie stężonych pożywek RV i SC po czym namnażano selektywnie przez 20 godzin w temp. 37°C . Prócz tego po 20-godzinym okresie przednamnażania przenoszono 0,1 ml hodowli do 10 ml pożywki RV [wg 7] i 1 ml hodowli do 10 ml pożywki SC [wg 5] i inkubowano przez 20 godzin w temp. 37°C . Wszystkie namnożone próbki posiewano eż na podłoża stałe BGA (agar z zielenią brylantową i czerwienią fenolową). Wzrost pałeczek *Salmonella* potwierdzano przy pomocy surowic do aglutynacji szkiełkowej.

Badanie każdej porcji mięsa wykonywano w 10 powtórzeniach.

WYNIKI BADAŃ I ICH OMÓWIENIE

Tabela I. Wpływ czasu przednamnażania, wielkości inoculum oraz stężenia pożywek wybiórczo-namnażających na wykrywalność salmonelli w mięsie mrożonym
The effect of preincubation time, inoculum size and concentration selective-multiplying media on the detection rate of *Salmonella* organisms in frozen meat

Objętość przednamnażanego homogenizatu (ml)	Czas przednamnażania (h)	Pożywka wybiórczo-namnażająca	Badane szczepy <i>Salmonella</i> (liczba badanych próbek)			Razem	Procent wyników dodatnich
			<i>S. typhi-murium</i> (105)	<i>S. enteri-tidis</i> (120)	<i>S. agona</i> (140)		
			liczba wyników dodatnich				
0,1	20	RV	69	98	100	267	73,15
1	6	RV p.	79	100	96	275	75,34
2	6	RV p.	91	104	120	315	86,30
5	6	RV p.	46	38	58	142	38,90
1	20	SC	83	90	94	267	73,15
1	6	SC p.	80	94	94	268	73,42
2	6	SC p.	72	94	84	250	68,49
5	6	SC p.	49	28	44	121	33,15

RV — pożywka *Rappaport-Vassiliadis*

SC — bulion seleninowo-cystynowy

p. — pożywka podwójnie stężona

Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli I. Największą efektywność wszystkich badanych szczepów *Salmonella* uzyskano wprowadzając 2 ml przednamnożonej w ciągu 6 godzin hodowli bakteryjnej do 10 ml podwójnie stężonej pożywki RV. Również po przeniesieniu 1 ml 6-godzinnej hodowli do 10 ml podwójnie stężonej pożywki RV liczba izolacji *S. typhimurium* i *S. enteritidis* w badanych próbkach była wyższa niż po wprowadzeniu 0,1 ml przednamnażanej przez 20 godzin zawiesiny bakteryjnej do 10 ml pożywki RV o normalnym stężeniu [wg 7].

Przy zastosowaniu podwójnie stężonej pożywki SC najlepszą efektywność wykrywania pałeczek *Salmonella* w badanych homogenizatach mięsnych uzyskano przenosząc 1 ml przednamnażanej w ciągu 6 godzin hodowli bakteryjnej do 10 ml pożywki. Wyniki te były zbliżone do tych, które uzyskano po 20-godzinym okresie przednamnażania próbek i prze-

noszeniu 1 ml tej hodowli do 10 ml pożywki SC bez zmiany stężenia [wg 5].

Zaobserwowano również, że po przesianiu na podłoże stałe BGA namnożonego selektywnie w pożywkach RV i SC materiału, który był przednamnażany w ciągu 6 godzin, wyraźnie mniejszą była liczba kolonii bakterii towarzyszących i często uzyskiwano na płytkach czyste hodowle salmonelli.

W dostępnym piśmiennictwie nie spotkano prac dotyczących wpływu skróconego czasu przednamnażania przy jednocześnie zwiększonym stężeniu pożywek wybiórczo-namnażających na wykrywalność salmonelli w żywności. D'Aoust i wsp. [2, 3] po 6-godzinnej inkubacji próbek żywności zakażonej pałeczkami *Salmonella* w 7 różnych pożywkach nieselektywnych (zbuforowanej wody peptonowej nie badano) uzyskali mniejszą liczbę wyników dodatnich w porównaniu z okresem 24-godzinnym, niezależnie od objętości przednamnażonej hodowli wprowadzonej do wybiórczych podłoży namnażających (10 ml, 1 ml i 0,1 ml). Po 6 godzinach inkubacji w bulionie z laktozą uzyskano 65%, a w bulionie odżywcym 60% wyników dodatnich w porównaniu z okresem 24-godzinnym.

WNIOSKI

1. Zastosowanie podwójnie stężonych pożywek wybiórczo-namnażających RV i SC umożliwia skrócenie czasu przednamnażania próbek mięsa w zbuforowanej wodzie peptonowej.

2. Większą liczbę izolacji salmonelli uzyskano stosując skrócony czas przednamnażania nieselektywnego przy zastosowaniu do namnażania selektywnego podwójnie stężonej pożywki RV niż podwójnie stężonej pożywki SC.

3. Posiew 2 ml przednamnażanych w ciągu 6 godzin w zbuforowanej wodzie peptonowej próbek mięsa mrożonego do 10 ml podwójnie stężonej pożywki RV oraz namnażanie selektywne w tej pożywce w ciągu 20 godzin spowodowało znaczne zwiększenie liczby wyników dodatnich w porównaniu z próbkami przednamnażanymi w ciągu 20 godzin i przenoszonymi w ilości 0,1 ml do 10 ml pożywki RV o normalnym stężeniu (według metody ISO).

4. Posiew 1 ml przednamnażanej w ciągu 6 godzin hodowli do 10 ml podwójnie stężonej pożywki SC umożliwił uzyskanie zbliżonej liczby izolacji pałeczek *Salmonella* w porównaniu z próbkami przednamnażanymi w ciągu 20 godzin i przenoszonymi w ilości 1 ml do 10 ml pożywki SC o normalnym stężeniu.

E. Pogorzelska, S. Kafel, J. Uradziński

THE EFFECT OF THE PREINCUBATION TIME AND CONCENTRATION OF SELECTIVE MULTIPLYING MEDIA ON THE EFFECTIVENESS OF SALMONELLA ORGANISMS ISOLATION FROM FROZEN MEAT HOMOGENATES

Summary

Double concentrated RV and SC media were used for selective multiplication of frozen meat homogenates preincubated in buffered peptone water during 6 and 20 hours. It was found that cultures of 2 ml of homogenate preincubated during 6 hours in 10 ml of twofold concentrated RV medium, and selective multiplication during 20 hours made possible obtaining of a greater number of *Salmonella* iso-

lates as compared to samples preincubated during 20 hours and transferred in volumes of 0.1 ml into 10 ml of normal concentration medium. On the other hand, the growth of 1 ml of a culture preincubated during 6 hours transferred into 10 ml of twofold concentrated SC medium yielded a similar number of salmonella isolates as in the case of samples preincubated during 24 h and transferred in 1 ml volumes into 10 ml of the SC medium without concentration change.

PISMIENNICTWO

1. Beckers H. J., Roberts D., Pietzch O., van Schothorst M., Vassiliadis P., Kampelmacher E. M.: Replacement of Muller-Kauffmann's tetrathionate brilliant green broth by Rappaport-Vassiliadis' magnesium chloride malachite green broth in the standard method for the detection of *Salmonellae*, Internatl. J. Food Microbiol., 1987, 4, 59. — 2. D'Aoust J. Y., Maishment C.: Preenrichment conditions for effective recovery of *Salmonella* in foods and feed ingredients, J. Food Prot., 1979, 42, 153. — 3. D'Aoust J. Y.: Update on preenrichment and selective enrichment conditions for detection of *Salmonella* in foods, J. Food Prot., 1980, 44, 369. — 4. D'Aoust J. Y.: Effective enrichment — plating conditions for detection of *Salmonella* in foods, J. Food Prot., 1984, 47, 588. — 5. International Organization for Standardization. Microbiology — General guidance on methods for detection of *Salmonella*. ISO 6579, 1981. — 6. Kalapothaki V., Vassiliadis P., Mavrommati Ch., Trichopoulos D.: Comparison on Rappaport-Vassiliadis enrichment medium and tetrathionate brilliant green broth for isolation of *Salmonellae* from meat products, J. Food Prot., 1983, 46, 618. — 7. Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment broth, Code CM 669, Oxoid Limited, Basingstoke, Hampshire, England, 253 A 1857. — 8. Vassiliadis P., Kalapothaki V., Trichopoulos D., Mavrommatti Ch., Seric Ch.: Improved isolation of *Salmonellae* from naturally contaminated meat products by using Rappaport-Vassiliadis enrichment broth, Appl. Environ. Microbiol., 1981, 42, 615. — 9. Vassiliadis P.: The Rappaport-Vassiliadis (RV) enrichment medium for the isolation of *Salmonellas*; An overview, J. Appl. Bacteriol., 1983, 54, 69.

Dn. 1989.10.04.

02-903 Warszawa, ul. Powsińska 61/63