

KRYSTYNA GÓRECKA, ANNA GROCHOWSKA, HALINA ŚCIEŻYŃSKA,
BOŻENA WINDYGA

WYKRYWANIE PAŁECZEK *SALMONELLA* W PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

DETECTION OF *SALMONELLA* IN FOOD PRODUCTS

Z Zakładu Badania Żywności i Przedmiotów Użytku
Państwowego Zakładu Higieny
Kierownik: doc. dr hab. K. Karłowski

Sprawdzono wykrywalność pałeczek z rodzaju Salmonella w żywności przy zastosowaniu podłoża wybiórczo-namnażającego Rappaport – Vassiliadis zamiast stosowanej dotychczas pożywki Müller – Kauffmanna.

W ostatnich latach stwierdzono wzrost występowania pałeczek *Salmonella* w żywności szczególnie pochodzenia zwierzęcego. Są one wykrywane przede wszystkim w takich surowcach jak drób, jaja, mięso [2, 8, 11, 13]. Izolowano je również z ryb i przetworów rybnych, małży i skorupiaków [9]. Żywność jest trudnym materiałem do badań mikrobiologicznych a szczególnie do wykrywania pałeczek *Salmonella*. W odróżnieniu od materiału pobranego od chorych, w którym z reguły mamy do czynienia ze zwiększoną liczbą bakterii będących przyczyną wystąpienia stanu chorobowego, w środkach spożywczych istnieje i to w znacznej liczbie, mikroflora saprofityczna, utrudniająca wykrycie obecności bakterii chorobotwórczych. Ponadto żywność zawiera różne naturalne substancje antibakteryjne, które również mogą mieć wpływ na wyniki badań. Z drugiej strony zróżnicowany skład i bogactwo substancji odżywczych tworzy środowisko, w którym w sprzyjających warunkach drobnoustroje chorobotwórcze mogą nie tylko doskonale bytować ale i namnażać się, nie powodując przy tym zmian organoleptycznych.

W takiej sytuacji kontrolowanie pałeczek *Salmonella* w żywności (które zgodnie z obowiązującymi wymaganiami nie mogą być obecne w 25 g produktu), wymaga specyficznego toku postępowania. Obecnie najczęściej stosowaną na świecie metodą wykrywania pałeczek *Salmonella* jest zamieszczona w normie ISO 6579 z 1981 r. „Microbiology – General guidance on methods for detection of *Salmonella*”.

Ostatnio ISO (International Organization for Standardization) zaproponowała wprowadzenie w miejsce podłoża Müller – Kauffmanna, pożywki Rappaport – Vassiliadis, która pozwala na zwiększenie wykrywalności pałeczek *Salmonella* [4].

MATERIAŁ I METODYKA

Materiał do badań stanowiły próbki różnych środków spożywczych pochodzących z obrotu handlowego – mięso, drób, kielbasa surowa, wyroby garmazeryjne, hamburgery mrożone. W przypadku drobiu bitego próbkę stanowiły kawałki skóry.

Zgodnie z obowiązującą w normach metodyką [1, 14] wykrywano pałeczki *Salmonella* w 25 g naważkach. Stosowano następujące etapy badań: przednamnażanie w wodzie peptonowej (WP) 16–20 h, hodowla przez 24–48 godzin na pożywkach wybiórczo-namnażających z seleninem sodowym (SF) i równolegle z czterotioanem sodu (*Müller – Kauffmanna – MK*). Dokonywano selekcji podejrzanych kolonii ze stałych podłoży różnicujących, którymi były – podłoże agarowe z zielenią brylantową i czerwienią fenolową (*Edel i Kampelmacher – BGA*), podłoże SS, *Wilson – Blaira (WB)* oraz podłoże *Hektoen*.

Ponadto stosowano po przednamnażaniu pożywką *Rappaport – Vassiliadis* (w ilości 10 ml), do której przesiewano 0,1 ml lub 1 ml materiału z wody peptonowej [4, 19].

Stosowane było również, zalecane przez ISO [4], podłoże z kwaśnym seleninem sodu i cystyną [SC]. Do 10 ml tego podłoża przesiewano 0,1 ml i 1 ml materiału z wody peptonowej a do 100 ml – 10 ml.

Przynależność podejrzanych kolonii do rodzaju *Salmonella* potwierdzano za pomocą testów biochemicznych oraz serologicznie przy użyciu surowic do aglutynacji szkiełkowej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Metodom wykrywania pałeczek *Salmonella* w żywności poświęca się od lat wiele uwagi [12]. Powszechnie akceptowane w badaniu żywności są kolejne etapy wykonywanych badań (przednamnażanie, namnażanie, izolacja, identyfikacja). Posługiwanie się tymi metodami jest szczególnie istotne w przypadkach występowania w środkach spożywczych bakterii o subletalnie uszkodzonych komórkach [3]. Bakterie w takim stanie fizjologicznym spotyka się zwłaszcza w żywności poddawanej różnym zabiegom technologicznym jak ogrzewanie, mrożenie czy suszenie. Wszelkie proponowane w metodyce mikrobiologicznych badań żywności zmiany są uważnie śledzone i sprawdzane w licznych laboratoriach na świecie.

Opracowane przez *Rappaporta*, a następnie zmodyfikowane w 1976 r. przez *Vassiliadis* podłoże dosyć skutecznie hamuje wzrost konkurencyjnych bakterii, zwłaszcza z rodzaju *Proteus* [10, 15, 17, 19].

W związku z raportem ISO z posiedzenia grupy roboczej d/s mikrobiologii żywności w 1988 r., w którym zwrócono uwagę na zmienną toksyczność zieleni malachitowej dla bakterii, porównano firmowe suche podłoże RV firmy *Oxoid* z podłożami przygotowanymi w pracowni, do których używano zieleni malachitowej firmy *Merck* oraz firmy *Reachim*.

Barwniki były przygotowane wcześniej i przechowywane przez tydzień przed użyciem.

Wzrost wzorcowych szczepów pałeczek *Salmonella*, wprowadzonych w różnej liczbie do podłoży RV przedstawia tabela I.

Uzyskane wyniki potwierdzają obserwacje innych autorów dotyczące podłoża RV. *Quail* i wsp. uważają, że podłoże przygotowane z poszczególnych składników daje lepsze wyniki niż podłoże firmowe.

Z uwagi na toksyczne działanie zieleni malachitowej i możliwość hamowania wzrostu również pałeczek *Salmonella*, należy wstępnie sprawdzić działanie barwnika na wzorcowe szczepy *Salmonella*.

Z obserwacji wynika (tabela I), że zieleń malachitowa firmy *Merck* może być stosowana jako składnik podłoża RV, a zieleń firmy *Reachim* nie powinna być używana, ponieważ wzrost *Salmonella* był w jej obecności ograniczony.

Tabela I. Wzrost pałeczek *Salmonella* na podłożach *Rappaport - Vassiliadis*
Salmonella growth on *Rappaport - Vassiliadis* media

Szczep	Rodzaj podłoża								
	firmy Oxoid			z zielenią malachitową szczawianową firmy Merck			z zielenią malachitową firmy Reachim		
	Ilość wprowadzonego materiału								
	1 ml	0.1 ml	oczko ezy	1 ml	0.1 ml	oczko ezy	1 ml	0.1 ml	oczko ezy
<i>Salmonella agona</i>	+	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>Salmonella enteritidis 101</i>	+	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>Salmonella infantis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-

„+” - wzrost

„-” - brak wzrostu

Obecność pałeczek *Salmonella* badano w 113 próbkach żywności takiej jak drób, mięso, kielbasa surowa, hamburgery mięsne, wyroby garmazeryjne. Wyniki badań przedstawiono w tabeli II.

Tabela II. Występowanie pałeczek *Salmonella* w produktach z rynku warszawskiego
 Occurence of *Salmonella* in food products from market - place in Warsaw

Rodzaj produktu	Liczba próbek	
	zbadanych	dotatnich
Drób bity	57	33
Mięso mielone	21	4
Mięso wołowe (kawałki)	6	0
Mięso wieprzowe (kawałki)	6	3
Kielbasa surowa	3	1
Hamburgery mrożone	4	0
Wyroby garmazeryjne	16	1
Razem	113	42

Występowanie pałeczek *Salmonella* stwierdzono w 33 na 57 zbadanych tuszek drobiowych, w 3 na 6 zbadanych próbkach mięsa wieprzowego, w 4 na 21 – mięsa mielonego. W wyrobach garmazeryjnych tylko z jednej próbki kaszanki wyizolowano *Salmonella enteritidis*. Nie wykryto ich w mięsie wołowym ani w hamburgerach mrożonych. Wyniki wskazujące w wysokim odsetku próbek drobiu obecność *Salmonella* są zgodne z doniesieniami autorów z innych krajów [17]. Częstotliwość izolowania *Salmonella* z tuszek drobiowych jest wyższa niż wskazują na to wyniki uzyskane przez Kałużewskiego i wsp., którzy badali w 1986 r wyciek z pojemników do transportu drobiu i w 25% stwierdzili obecność *Salmonella* [5, 6, 7, 9]. Jest wysoce prawdopodobne, że wpływ na uzyskanie wysokiej wykrywalności miała zastosowana metoda oraz wprowadzenie dodatkowego podłoża RV.

Porównanie wykrywalności pałeczek *Salmonella* przy zastosowaniu różnych po-
dłów wybiórczo-namnażających przedstawiono w tabeli III.

Tabela III. Izolacja pałeczek *Salmonella* z różnych pożywek płynnych
Isolation of *Salmonella* from different liquid media

Rodzaj produktu	n	Liczba próbek dodatnich						
		RV* 1:10	RV 0.1:10	MK 10:100	SC 10:100	SC 1:10	SC 0.1:10	SF 10:100
Drób	57	3 (7)**	22 (50)	7 (13)	2 (4)	4 (11)	5 (14)	4 (6)
Mięso mielone	21	–	3 (5)	–	–	1 (4)	1 (2)	1 (5)
Mięso wieprzowe	6	–	3 (4)	–	–	–	1 (1)	–
Kiełbasa surowa	3	–	1 (2)	–	–	–	1 (1)	–
Wyroby garmazeryjne	16	–	1 (1)	–	–	1 (1)	–	–
Ogółem	103	3 (7)	30 (62)	7 (13)	2 (4)	6 (16)	8 (18)	5 (11)

n liczba próbek zbadanych

* RV – pożywka *Rappaport - Vassiliadis*

MK – pożywka *Müller - Kauffmann*

SC – pożywka z kwaśnym seleninem sodu i cystyną

SF – pożywka z seleninem sodu

** – w nawiasach zawarte są liczby potwierdzonych szczepów *Salmoella*

– 1:10, 0.1:10, 10:100 ilość *inoculum* i pożywki namnażającej

Tabela IV. Częstotliwość występowania serotypów pałeczek *Salmonella* w badanych produktach
Frequency of occurrence of *Salmonella* serotypes in the investigated products

Serotyp	Liczba próbek dodatnich					
	drób	mięso mielone	mięso wieprzowe	kiełbasa surowa	wyroby garmazeryjne	ogółem
<i>Salmonella</i> gr B						
<i>S. typhimurium</i>	7 (30)*	1 (2)	1 (1)	–	–	9 (33)
<i>S. saint - paul</i>	2 (2)	1 (1)	–	1 (2)	–	4 (5)
<i>S. heidelberg</i>	2 (5)	–	–	–	–	2 (5)
<i>S. agona</i>	1 (1)	–	–	–	–	1 (1)
<i>Salmonella</i> gr C						
<i>S. oranienburg</i>	–	1 (7)	–	–	–	1 (7)
<i>S. infantis</i>	2 (8)	–	–	–	–	2 (8)
<i>Salmonella</i> gr D						
<i>S. enteritidis</i>	9 (40)	2 (11)	2 (2)	–	1 (1)	14 (54)
<i>S. blegdam</i>	3 (15)	–	–	–	–	3 (15)
<i>Salmonella</i> gr E						
<i>S. anatum</i>	2 (2)	1 (1)	–	–	–	3 (3)

* w nawiasach podano liczbę wyizolowanych szczepów

Najlepsze wyniki, najwyższą wykrywalność, uzyskano przy zastosowaniu podłoża RV. W niektórych próbkach, np. drobiowych różnice wykrywalności były szczególnie widoczne. Zachowanie proporcji *inoculum* do podłoża 1:100 przy przesiewie z wody peptonowej do podłoża RV było korzystne dla wykrywania pałeczek *Salmonella*.

Uzyskane wyniki są w pełni zgodne z sugestiami autorów podłoża *Rappaport – Vassiliadis* [18]. Upoważniają one do akceptacji propozycji Podkomitetu ISO „Mikrobiologia” dotyczącej nowelizacji metody wykrywania pałeczek *Salmonella* w żywności i wprowadzenia podłoża *Rappaport – Vassiliadis*, zamiast dotychczas stosowanego podłoża *Müller – Kauffmanna*.

Podobnie, lepszą wykrywalność uzyskiwano przesiewając 0,1 ml z wody peptonowej do 10 ml pożywki seleninowej z cystyną (SC). Częstotliwość występowania serotypów w różnych produktach podaje tabela IV.

Ze wszystkich próbek wyizolowano 131 szczepów *Salmonella*. Najczęściej występowała *S. enteritidis* – w 33% próbek oraz *S. typhimurium* – 21% próbek. Największą liczbę serotypów izolowano z próbek drobiu.

W trakcie badań stwierdzono występowanie szczepów laktozo-dodatnich *S. enteritidis*, *S. saint-paul*, *S. typhimurium*, *S. heidelberg*, *S. oranienburg* i *S. anatum*.

WNIOSKI

1. Podłoże *Rappaport – Vassiliadis* zwiększa wykrywalność pałeczek *Salmonella* w żywności, Rozważenia wymaga zmiana metody wykrywania i zastąpienie podłoża Müller-Kauffmanna podłożem *Rappaport – Vassiliadis*.

2. Możliwe jest używanie podłoża RV przygotowywanego w warunkach laboratoryjnych po uprzednim przetestowaniu zieleni malachitowej.

3. Zaleca się stosowanie przesiewu 0,1 ml hodowli na wodzie peptonowej do 10 ml podłoża *Rappaport – Vassiliadis*, co nie tylko zwiększa wykrywalność ale ma wpływ na zmniejszenie kosztów analizy.

K. Górecka, A. Grochowska, H. Ścieżyńska, B. Windyga

DETECTION OF *SALMONELLA* IN FOOD PRODUCTS

Summary

The Rappaport – Vassiliadis (RV) medium prepared under laboratory conditions from its different components was found to be equally suitable as the commercial RV Oxoid medium for routine detection of *Salmonella* in food products.

The best detection (30 of 113 examined samples) was obtained using 0,1 ml of culture and 10 ml of medium. In case of 1 ml of culture and 10 ml of medium *Salmonella* was isolated only from 3 samples. Only 7 positive samples were obtained using MK medium.

Necessity of preliminary toxicity verification for malachite green oxalate colour used in RV medium, to standard *Salmonella* strains, prior to routine food products tests, was found.

PIŚMIENNICTWO

1. *Burzyńska H., Maciejaska-Roczan K.*: Wykrywanie *Salmonella* w makaronach Wyd. Met. PZH. Badanie zanieczyszczeń mikrobiologicznych w środkach spożywczych 1982. 1. – 2. *Fukushima H., Hoshina K., Nakamura R., Ito J.*: Raw beef, pork and chicken in Japan contaminated with *Salmonella* sp. *Campylobacter* sp, *Yersinia enterocolitica* and *Clostridium perfringens* – a comparative study. Zbl. Bacteriol. Microbiol. Hyg. B. 1987, 184, 1. – 3. *Hoszowski A.*: Wykrywanie pałeczek *Salmonella*. Med. Wet. 1989, 45, 195. – 4. ISO DIS6579 Microbiology – General guidance on methods for the detection of *Salmonella*. – 5. *Kałużewski S., Tyc Z., Szych J., Terech I., Czechowicz Ł., Ścianowska Cz., Kokocińska I.*: Charakterystyka pałeczek *Salmonella* wyosobionych z pojemników z drobiem znajdującym się w sprzedaży detalicznej. Med. Dośw. Mikrobiol. 1988, 40, 1. – 6. *Latała A.*: Straty spowodowane salmonelozą. Drobiarstwo. 1988, 37, 4, 10. – 7. *Ławik B., Zaleski S.J.*: Wykrycie pałeczek *Salmonella* w rozdrobnionym mięsie wieprzowym przeznaczonym do produkcji wędlin. Med. Wet., 1987, 58, 594. – 8. *Mackado J., Bernardo F.*: Prevalence of *Salmonella* in chicken in Portugal. J. Appl. Bacteriol. 1990, 69, 477. – 9. *Maciak T., Kubiński T.*: Pałeczki *Salmonella* w produktach spożywczych pochodzenia zwierzęcego w świetle badań ZHW w Warszawie. Med. Wet. 1990, 48, 305. – 10. *Mavrommati Ch., Kalopothaki V., Trichopoulos D., Vassiliadis P., Serie Ch.*: Recovery of *Salmonella* from refrigerated preenrichment and refrigerated enrichment media. Int. J. Food Microbiol. 1, 1984, 5.
11. *Molska I., Uusi-Rauva E.*: Wybrane zagadnienia występowania *Salmonella* w naszym otoczeniu i żywności. Przem. Spoż. 1990, 43, 179. – 12. *Pogorzelska E.*: Wpływ warunków przednamnażania oraz namnażania selektywnego na efektywność wykrywania pałeczek *Salmonella* w żywności. Roczn. PZH. 1988, 39, 489. – 13. *Pohl P., Lintermans P., Marin M., van Robaeys G., Chasseur-Libotte M., Ghysels G.*: *Salmonella* des animaux des viandes et des farines isolées en Belgique de 1986 à 1990. Ann. Med. Vet. 1991, 135, 275. – 14. PN-83/A-82054 Mięso i przetwory mięsne. Badania mikrobiologiczne. – 15. *Peterz M., Wiberg C., Norberg P.*: The effect of incubation temperature and magnesium chloride concentration on growth on *Salmonella* in home-made and in commercially available dehydrated *Rappaport-Vassiliadis* broth. J. Appl. Bacteriol. 1989, 66, 523. – 16. *Quail E., Mc Gibbon L., Fricker C.R.*: A study of the relative efficiency of three commercially available dehydrated RV media. J. Hyg. 1986, 96 (3), 425. – 17. Report of WHO consultation of epidemiological emergency in poultry and egg Salmonellosis, Geneva: 20–23 march 1989, WHO/CDS/VPH/, 89.82. – 18. *Trichor C.R., Quail E., Mc Gibbon L., Girwood R.W.A.*: An evaluation of commercially available dehydrated RV medium for the isolation of *Salmonellae* from poultry. J. Hyg. 1985, 95, 337. – 19. *Vassiliadis P.*: The *Rappaport – Vassiliadis* (RV) enrichment medium for the isolation of salmonellas. An overview. J. Appl. Bacteriol. 1983, 54, 69.

Dn. 1991.12.11.

00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24