

13. Piątkowska H.: Badania nad występowaniem i zachowaniem się *Clostridium perfringens* w procesie produkcyjnym kiełbasy zwyczajnej. Praca doktorska. SGGW Warszawa 1971.
14. Püschner J.: Fleischwirtschaft 45, 1459, 1955.
15. Püschner J.: Fleischwirtschaft 50, 279, 1970.
16. Seligmann R.: Refuah vet. 30, 4, 1973.
17. Shinjo T., Ogata M.: Jap. J. vet. Sci. 27, 263, 1965.
18. Sidorenko G. I.: Gig. Sanit. 30, 38, 1955.
19. Skjelkvale R. L. H., Tjaberg T. B.: Nord. VetMed 26, 387, 1974.
20. Takacs J. T., Okalyi E.: Magy. Allatorv. Lap. 19, 183, 1964.
21. Wawrzkiwicz J., Cygan Z.: Medycyna Wet. 22, 157, 1966.
22. Włjewanta E. A.: Cornell Vet. 62, 26, 1972.
23. Zagajewskij I. S.: Veterinarija, Moskwa 49, 101, 1973.

Adres autora: dr Ryszard Służewski, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin.

STANISŁAW ZALESKI, ANNA FIK

Optymalizacja metod izolowania drobnoustrojów z mrożonych farszów rybnych. II. Ogólna ilość drobnoustrojów i drobnoustroje proteolityczne

Z Zakładu Mikrobiologii Żywności Instytutu Technologii Żywności Pochodzenia Morskiego AR w Szczecinie

Odzyskiwanie bakterii z materiału mrożonego wymaga innej techniki postępowania niż przy badaniu materiału świeżego. W produkcji mrożonym część populacji bakteryjnej przeżywającej proces zamrażania, składowania w stanie zamrożonym i rozmrażania jest metabolicznie uszkodzona. Komórki uszkodzone tracą zdolność do akumulowania niektórych rozpuszczonych substancji zewnątrzkomórkowych, mają zmienione wymagania odżywcze i w związku z tym mogą nie rozwijać się na niektórych podłożach bakteriologicznych. W dostępnym piśmiennictwie istnieją jednoznaczne dane stwierdzające, że w zależności od użytego podłoża odzysk ogólnej ilości bakterii może być różny (7, 10). Brak możliwości rozwoju komórek uszkodzonych nie jest równoznaczny z brakiem tej możliwości w żywności. Po rozmrożeniu, w szeregu produktach spożywczych po nieco wydłużonej fazie spoczynkowej stwarzane są warunki dla powstania populacji z komórek fizjologicznie uszkodzonych. Tym samym te ostatnie są po regeneracji równie aktywne w procesie psucia jak komórki nieuszkodzone. Stąd dobór optymalnych podłoży dla określania w mrożonych farszach rybnych ogólnej ilości drobnoustrojów, w tym też proteolitycznych, uwzględniając nie tylko komórki pełnosprawne ale i metabolicznie uszkodzone był celem przeprowadzonych doświadczeń.

Materiały i metody

Doświadczenia przeprowadzono używając farszu dwójakiego pochodzenia — dorszowego, przygotowanego w pracowni ze świeżego dorsza, zamrożonego i składowanego w temp. -10°C oraz mrożonych farszów otrzymanych z Zakładu Technologii Żywności Pochodzenia Morskiego AR w Szczecinie.

Oznaczanie ilości drobnoustrojów przeprowadzono standardową metodą rozcieńczeń i posiewów powierzchniowych na podłoża agarowe. Jako płynu rozcieńczającego używano 0,1% wody peptonowej. Pięciogramowe próby farszu homogenizowano przez 2 minuty z 45 ml wody peptonowej w jałowych workach plastikowych przy użyciu „Stomachera”. Po 0,1 ml kolejnych rozcieńczeń próby posiewano powierzchniowo

na podwójne płytki każdego z porównywanych podłoży odżywczych. Stosowano 48 godzinny czas inkubacji w temp. 24°C . Ilość otrzymanych bakterii w 1 g interpretowano posługując się wzorem Farmiloe i wsp. (3).

Podłoża. Przy określaniu ogólnej ilości drobnoustrojów w mrożonych farszach rybnych porównywano wydajność 6 podłoży odżywczych, przy czym 5 z nich było sporządzonych w dwóch wariantach — na wodzie destylowanej i syntetycznej wodzie morskiej. Ostatnie z wymienionych podłoży przygotowano tylko na wodzie morskiej. Były to podłoża następujące:

1. Suche podłoże agarowe zwykłe (Wytw. Surowic i Szczep. W-wa)

2. Podłoże oparte na suchym bulionie mięsny (3% suchy bulion mięsny, 1% casamino acids, 2,5% agar)

3. Podłoże TPN (0,5% bacto tryptone, 0,5% bacto peptone, 0,25% ekstrakt drożdżowy, 0,1% glukoza, 0,5% NaCl, 1,5% agar)

4. Podłoże TGEA (beef ekstrakt 0,3%, bacto tryptone 0,5%, glukoza 0,1%, agar 1,5%)

5. Agar żelatynowy (0,3% ekstrakt drożdżowy, 0,5% bacto tryptone, 0,4% żelatyna, 1,5% agar)

6. Agar mleczny sporządzony jako podłoże dwuwarstwowe, w którym dolna warstwa zawierała 2% odtłuszczonego mleka sproszkowanego i 1,5% agaru, drugą warstwę natomiast stanowiło podłoże TGEA na wodzie morskiej.

Syntetyczna woda morska zawierała w 1 litrze następujące składniki: NaCl 23,4 g, KCl 0,66 g, Na_2SO_4 3,91 g, NaHCO_3 0,19 g, MgCl_2 4,96 g. Do podłoży dodawano 3 części wody morskiej i 1 część wody destylowanej. W porównywanych podłożach pH ustalano na 7,2. Agar żelatynowy i mleczny służyły równocześnie do oznaczania drobnoustrojów proteolitycznych.

Wyniki

Ogólna ilość drobnoustrojów.

Odzyskiwanie ogólnej ilości drobnoustrojów w tym też proteolitycznych przy stosowaniu różnych podłoży odżywczych zestawiono w tab. 1. Wyniki przedstawiono jako średni % otrzymanych komórek, przy czym za 100% przyjęto ilości dla posiewów na suche podłoże agarowe zwykłe, sporządzone na wodzie destylowanej. W początkowym okresie doświadczeń przeprowadzono próby w różnych układach porównując poszczególne podłoża ze sobą, niektóre podłoża wyeliminowano a następnie w 13

Tab. 1. Odzyskiwanie drobnoustrojów z mrożonych farszów rybnych na różnych podłożach odżywczych wyrażone w procentach

I Suche podłoże agarowe		II Podłoże bulionowe		III Podłoże TPN		IV Podłoże TPGE		V Agar żelatynowy		VI Agar mleczny na TPGE	
w.d.	w.m.	w.d.	w.m.	w.d.	w.m.	w.d.	w.m.	w.d. prot.	w.m. prot.	w.m. prot.	
100	99,7	89,6	90,1	107,4	94,5	117,3	117,2	107,7	116,9	120,7	109,6
								100	89,2		

próbach wykonano badania równoległe na wybranych podłożach. W tabeli przedstawiono wyniki ostatnich 13 prób, chociaż we wcześniejszych badaniach kształtowały się podobnie.

Maksymalne ilości bakterii z badanych mrożonych farszów rybnych otrzymano przy posiewach na podłoże TGEA bez względu na to, czy było sporządzone na wodzie destylowanej, czy też na syntetycznej wodzie morskiej. Wydajność tego podłoża była o około 17% wyższa w porównaniu do suchego podłoża agarowego zwykłego. To samo podłoże w połączeniu z agar-em mlecznym było o 20% wydajniejsze od przyjętego za standardowe. Najmniej wydajne natomiast było podłoże na suchym bulionie mięsny, jego wydajność była o około 10% mniejsza od standardowego. Agar żelatynowy i podłoże TPN na wodzie destylowanej dostarczały większych ilości bakterii niż zwykłe podłoże agarowe, jednak były mniej wydajne od TGEA.

Drobnoustroje proteolityczne.

Przy odzyskiwaniu drobnoustrojów proteolitycznych ogólnie najlepszą wydajność wykazano na agarze mlecznym. Należy jednak zaznaczyć, że wydajność tych podłoży była zależna od posiewanego materiału. Przy posiewach farszu dorszowego, sporządzonego w pracowni większe ilości drobnoustrojów proteolitycznych otrzymywano na agarze żelatynowym natomiast dla większości innych prób bardziej wydajny był agar mleczny.

Dyskusja

Różne czynniki mające wpływ na odzyskiwanie bakterii zarówno z ryb świeżych jak i mrożonych rozpatrywane były przez wielu autorów. Doświadczenia porównawcze związane z wydajnością różnych metod homogenizacji prowadzone przez Barranda i Kitchella (1) wypadły jednoznacznie na korzyść rozdrabniania mechanicznego. Autorzy ci wykazali, że najgorsze wyniki otrzymuje się przy homogenizacji w moździerzu porcelanowym, najlepsze natomiast stosując homogenizację mechaniczną przy 6 tys. obrotów w czasie nie przekraczającym 2,5 minuty. Inne badania (9), w których porównywano wydajność homogenizatorów typu „Blender” i „Stomacher” wykazały jednakową wydajność tych homogenizatorów przy określaniu beztlenowców i względnych beztle-

nowców oraz pleśni w takich produktach jak mięso, sery, ryby i inne.

Jeśli chodzi o technikę posiewania opinie badaczy są na ogół zgodne, że dla odzyskiwania ogólnej ilości drobnoustrojów zarówno z ryb świeżych jak i mrożonych najkorzystniejsze są posiewy powierzchniowe. Clark (2) otrzymał przy posiewach materiału pochodzenia morskiego metodą powierzchniową wyniki o 70—80% wyższe w porównaniu do posiewów zalewanych. Lee i Harward (7) maksymalne ilości bakterii z różnych produktów mrożonych otrzymali stosując posiewy powierzchniowe i temp. inkubacji 27°C.

Przedmiotem rozważań był też dodatek wody morskiej do podłoża dla izolowania bakterii z ryb. Wood (12) nie wykazał różnic we wzroście mikroflory ryb na agarze z wodą destylowaną i morską. Z drugiej strony Simidu (10) zaleca dla izolowania bakterii z ryb morskich podłoże, w którym dodatek nieorganicznych składników wody morskiej w ogólnej ilości równy jest około połowie tych w naturalnej wodzie morskiej. Wyniki badań własnych pozwalają przypuszczać, że przy posiewach mrożonych farszów rybnych wydajność podłoża jest bardziej zależna od organicznych składników odżywczych niż od tego, czy są sporządzone na wodzie destylowanej czy też na syntetycznej wodzie morskiej. Wyjątek stanowiło podłoże TPN, które sporządzone na wodzie destylowanej było bardziej wydajne. Podłoże to jest modyfikacją standardowego podłoża PCA (Plate Count Agar) dla określenia ogólnej ilości drobnoustrojów przystosowaną do posiewu prób mrożonych. Autorzy modyfikacji Lee i Harward (7) porównywali wydajność tych obydwu podłoży przy posiewach różnych prób mrożonych i wykazali zależność wydajności podłoża od posiewanego materiału. Podłoża PCA i TPN były jednakowo wydajne dla mrożonych owoców i produktów morskich przetworzonych, natomiast dla mrożonych surowych krewetek wydajniejsze było podłoże TPN. Do badań prób mrożonych bywają stosowane podłoże TSA (Trypticase Soy Agar) i podłoże dla psychrofilii — TGA. Fanelli i Ayres (4) porównywali te podłoża przy izolowaniu bakterii z mrożonego kurczaka i wykazali ich równorzędną wydajność. Również Hartman (5) donosi o analogicznej wydajności tych podłoży przy posiewach produktów mrożonych. Wybra-

ne do naszych doświadczeń podłoże TGEA okazało się najbardziej wydajne spośród porównywanych podłoży. Lepsza wydajność tego podłoża jest prawdopodobnie wynikiem tego, że jego środowisko sprzyja rozwojowi komórek metabolicznie uszkodzonych albo też pozwala na wzrost większej ilości gatunków drobnoustrojów.

Przy izolowaniu morskich bakterii proteolitycznych powszechnie stosowane są podłoża, w których źródłem białka jest żelatyna albo kazeina. Niektórzy badacze (8, 11) są zdania, że żelatyna jest dość trudno rozkładanym białkiem i w związku z tym nie zawsze jest dobrym substratem dla wykrywania proteolitycznej aktywności. Proponują oni podłoże z kazeiną jako z łatwiej przyswajalnym białkiem. Chociaż kazeina nie jest białkiem pochodzenia morskiego Kazanas (6) wykazał, że ogromna większość bakterii morskich ma zdolność jej wykorzystywania. W naszych doświadczeniach na mrożonych farszach rybnych wykazano nieco większą ogólną wydajność agaru mlecznego w porównaniu do żelatynowego. Nie dotyczyło to jednak wszystkich prób, co wskazywałoby na zależność wydajności tych podłoży od posiewanego materiału.

Wnioski

1. Przy określaniu ogólnej ilości drobnoustrojów w mrożonych produktach rybnych dla otrzymania wyników bardziej zbliżonych do stanu faktycznego powinno się stosować w miejsce standardowego suchego podłoża agarowego — podłoże TGEA.

2. Dla określania ilości drobnoustrojów proteolitycznych wskazane jest stosowanie posiewów równoległych na agar żelatynowy i agar mleczny a następnie uwzględnianie wyników z tego podłoża, które w danym przypadku było wydajniejsze.

3. Dodatek do badanych podłoży odżywczych syntetycznej wody morskiej nie wpływał na zwiększenie odzyskiwania bakterii z mrożonych farszów rybnych.

Piśmiennictwo

1. Barrand C., Kitchell A. G.: Fleischwirtschaft 47, 1313, 1967.
2. Clark D. S.: Can. J. Microbiol. 11, 1409, 1967.
3. Cowell N. D., Morissett M. D.: J. Sci. Fd Agric. 20, 573, 1969.
4. Fanelli M. J., Ayres J. C.: Food Technol. 13, 294, 1959.
5. Hartman P. A.: Appl. Microbiol. 8, 382, 1961.
6. Kazanas N.: Appl. Microbiol. 16, 128, 1968.
7. Lee J. S., Harward L.: J. Milk Food Technol. 33, 237, 1970.
8. Martley F. G., Jayashenkerr S. H.: J. appl. Bact. 33, 363, 1970.
9. Sharpe A. N.: Sonderdruck Zbl. Bact. I Ref. 242, 103, 1975.
10. Simidu U., Hasno K.: J. gen. Microbiol. 52, 355, 1968.
11. Sizemore R. K., Stevenson L. H.: Appl. Microbiol. 20, 991, 1970.
12. Wood E. J. F.: J. Mar. Freshw. Res. 4, 160, 1953.

Adres autora: prof. dr Stanisław Zaleski, ul. Kazimierza Królewicza 65/7, 71-551 Szczecin.

Залески С., Фик А. — Оптимализация методов изолирования микробов из рыбных фаршей. II. Общее число микробов и протеолитические микробы.

Определили эффективность выделения общего числа микробов из мороженных рыбных фаршей на 5 разных питательных средах приготовленных

в 2 вариантах: на дистиллированной воде и на синтетической морской воде — в сравнении с обыкновенной стандартной сухой средой. Оптимальные результаты получили при посевах на среду TGEA. Они были на 17% лучше чем результаты посевов на обыкновенную сухую стандартную среду. При исследовании мороженных рыбных фаршей на присутствие протеолитических микробов применяли молочный и желатиновый агар. Установили что эффективность этих сред зависела от рода посевного материала. Положительного влияния морской воды в среде не установили.

Zaleski S., Fik A. — **Optimization of isolation methods of microorganisms from frozen fish stuffings. II. Total number of microorganisms and proteolytic organisms.**

There have been evaluated and compared the productivity of 5 different growing media prepared in two variants: with distilled water and synthetic sea water, with a standard growing medium prepared from dry agar in the determination of total number of microorganisms in frozen fish stuffings. Optimal conditions were obtained on TGEA medium. Its productivity was about 17.0% higher than that of dry agar medium. There was also compared the productivity of milk agar and gelatin agar applied in the determination of proteolytic microorganisms. It was found that the productivity of these media depended on the inoculated material. There were not found any influence of the addition of synthetic sea water on the increase of bacteria recovery from the products under study.

HYDE J. L., BLACKWELL J. H., CALLIS J. J.: **Wpływ pasteryzacji i odparowania na wirusa przyszczycy w pełnym mleku od zakażonych krów. (Effect of pasteurization and evaporation on Foot-and-Mouth disease virus in whole milk from infected cows).** Can. J. com. Med., 39, 305—309, 1975 (3).

Przebadano wpływ pasteryzacji w temp. 72 i 80°C i odparowania do 50% objętości w temp. 65°C przy ciśnieniu 60 cm słupa Hg w czasie 64,5 min. na przeżywalność wirusa przyszczycy w mleku pełnym pobranym po 24 godzinach od chwili zakażenia wymienia szczepem Meklemburg (A3) wirusa przyszczycy. Wirus podawano do zatok mlecznych. Wirus przeżywał pasteryzację w obydwu badanych temperaturach oraz odparowanie. Gruczoł mlekowy krów okazał się bardzo dobrym miejscem do replikacji wirusa przyszczycy. 7 log cfu/ml występowało w mleku pobranym po 24 godzinach od chwili zakażenia. Wirus w spadających mianach izolowano z mleka przez okres 7 dni po zakażeniu.

G.

MC CRAW B. M.: **Rozwój Ascaris suum u cieląt. (The development of Ascaris suum in calves).** Can. J. comp. Med., 39, 354—357, 1975 (3).

W celu określenia rozwoju zarażenia pierwotnego i wtórnego Ascaris suum 9 cieląt w wieku 4 tygodni zarażono jednorazowo i 9 cieląt dwukrotnie w odstępie 7 tygodni 2 mln jaj posożyta za pomocą sondy żołądkowej. Po 18 godzinach larwy glist izolowano ze ściany trawieńca, dwunastnicy i jelita czczego. Trzeciego dnia po zarażeniu pojawiały one w krezkowych węzłach chłonnych a po 5 dniach w wątrobie. Między 7—8 dniem duże ilości larw występowały w płucach. Zarówno w przypadku zarażenia jednorazowego jak i zarażenia powtórnego średnia ilość larw w gramie tkanki płucnej była identyczna i wynosiła 2,72. Jednakże u cieląt zarażonych powtórnie obserwowano przyhamowanie rozwoju larw. Szybki spadek ilości larw A. suum w płucach między 7—9 dniem po zarażeniu mógł się wiązać z ich immobilizacją lub śmiercią na skutek uaktywnienia procesów obronnych organizmu.

G.