

М.Ж. Каирова

Казахский агротехнический университет им. С. Сейфуллина, Астана, Казахстан
(E-mail: markagai@mail.ru)

Изучение микрофлоры мяса конины

Проведено изучение микрофлоры конского мяса, собранного в Северо-Казахстанской и Акмолинской областях. Установлено, что на 1 грамм казы из Акмолинской области приходится в среднем $7,8 \cdot 10^5$ КОЕ, а в казы из СКО содержится $1,1 \cdot 10^5$ КОЕ. Уровень контаминированности мяса конины из Акмолинской области был в 7 раз выше, чем образца мяса из СКО. С помощью микробиологических методов выделены и получены чистые культуры девяти бактериальных изолятов. Среди выделенных изолятов отсутствуют бактерии группы кишечных палочек (колиформы), что позволяет говорить о соответствии данных мясных продуктов санитарно-гигиеническим нормам. Однако микроскопический анализ позволил 8 выделенных культур отнести к коккообразным бактериям. Культуральные, морфологические и биохимические тесты позволили 6 кокковых культур отнести к группе условно-патогенных и коагулазо-негативных стафилококков.

Ключевые слова: микрофлора, изоляты, пигментированные бактерии, конское мясо, казы, контаминация, серийное разведение, колониеобразующие единицы, стафилококки, коагулазо-негативные, условно-патогенные микроорганизмы.

Кокки представляют собой широко распространенную в природе группу микроорганизмов, объединяющую в себе наряду с сапрофитными и болезнетворными формами. В последние десятилетия в развитых странах из всех бактериальных инфекций, чаще всего приводящих к смерти, наибольшую опасность представляет золотистый стафилококк *Staphylococcus aureus*. Известно, что многие штаммы золотистого стафилококка продуцируют энтеротоксин. Поэтому наличие в продуктах питания энтеротоксигенных и антибиотико-устойчивых штаммов вида *S. aureus*, а также нарушение производственно-санитарных условий создают угрозу для здоровья потребителей [1].

Естественные популяции стафилококков в основном заселяют кожные и слизистые покровы теплокровных животных и человека, являясь резервуаром инфекции. Некоторые виды стафилококков могут присутствовать в окружающей среде — в воздухе, пыли, сточных водах, воде, почве, в продуктах животного происхождения — в молоке, сыре, мясе, а также на оборудовании пищевых производств. В роду стафилококков, относящихся к семейству *Staphylococcaceae*, выделяют около 37 видов и несколько подвидов [2], среди которых патогенными для человека могут быть не только коагулазо-позитивные стафилококки. Недавние исследования показали, что некоторые коагулазо-негативные стафилококки (КоНС) являются основными возбудителями бактериемии, а также способны продуцировать энтеротоксин [3]. Известны штаммы группы КоНС, имеющие технологическое значение в процессах ферментирования и созревания копченых колбас [4].

Установлено, что преобладание тех или иных видов микрофлоры кишечника связано с их географической привязанностью, т.е. в различных странах доминируют различные виды и штаммы микроорганизмов, поэтому употребление импортных пищевых продуктов может привести к коренному изменению естественной микрофлоры человека [5]. В целом при проведении мониторинга здоровья населения обязательными являются оценка микробно-санитарного качества продуктов питания, а также идентификация микроорганизмов.

Целью данных исследований было изучение микроорганизмов, распространенных в конском мясе, на основе которого изготавливается такой традиционный казахский продукт, как казы.

Результаты исследования

Для определения количества микроорганизмов в конском мясном продукте использован метод серийного разведения образца и высева на плотные среды [6]. Посев полученных суспензий проводили на чашках с питательным агаром СПА (Himedia, India) по 2–3 повторности.

На рисунке 1 представлены результаты подсчета количества выросших колоний на чашках при различном разведении мясного продукта, полученного из образцов казы 1 и 2, собранных в Северо-Казахстанской (СКО) и Акмолинской областях соответственно.

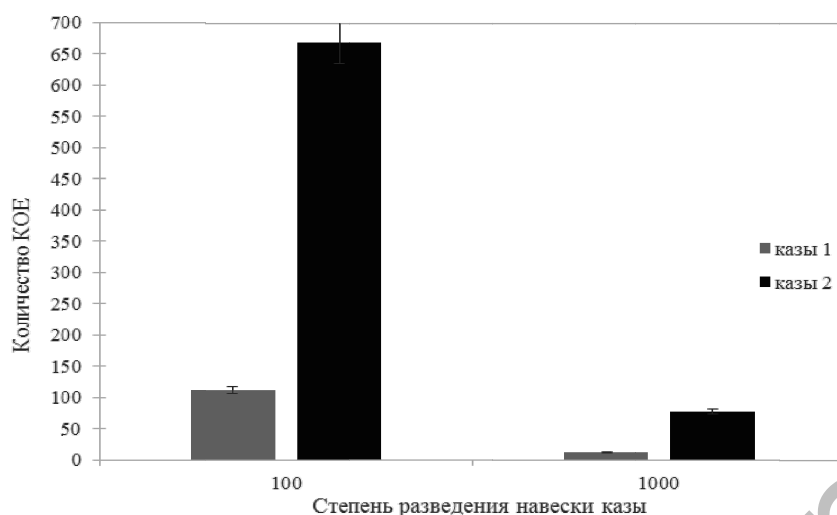


Рисунок 1. Количество бактериальных колоний, полученных из образцов казы

В микробиологической практике лучшим разведением считается то, из которого на чашках со средой вырастает от 50 до 300 колоний бактерий. Поэтому для подсчёта количества микроорганизмов в образце казы 1 взяты данные, полученные при посеве 100-кратно разведенного продукта, что в среднем, исходя из 3-кратной повторности, составило $112 \pm 23,8$ колониеобразующих единиц (КОЕ). Тогда как для определения количества микроорганизмов в образце казы 2 взяты данные, полученные с использованием 1000-кратно разведенной суспензии, что соответствует в среднем $78 \pm 5,6$ КОЕ на одну агаровую чашку.

При перерасчете количества микроорганизмов, находящихся в навеске, установлено, что на 1 грамм пробы казы из Акмолинской области приходится в среднем $7,8 \cdot 10^5$ КОЕ, а в пробе казы из СКО содержится $1,1 \cdot 10^5$ КОЕ. Эти данные указывают, что обсемененность конского мяса из Акмолинской области приблизительно в 7 раз выше, чем в мясе из Северо-Казахстанской области.

Как известно, физиологические и биохимические свойства микроорганизмов исследуют при работе с чистой культурой. Поэтому для получения чистой культуры по методу Р. Коха из агаровых чашек, полученных методом серийного разведения, проведен отбор отдельных колоний с последующим посевом на свежую питательную среду [6].

Культуры микроорганизмов, представленные на рисунке 2, получены из отдельных колоний, полученных из образца казы 1. Исходя из однородности роста колоний по штриху и культурально-морфологических особенностей данные бактериальные изоляты отнесены к чистым культурам, которые обладают различной окраской. Известно, что коккообразные бактерии на питательной среде формируют гладкие, круглые и ровные колонии кремового цвета, а также бывают окрашены каротиноидами в желтый или оранжевый цвета. Однако пигментирование бактерий не является видовым признаком.

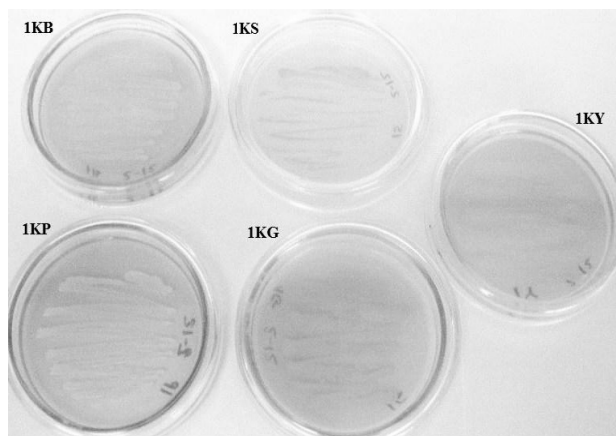


Рисунок 2. Рост изолятов, выделенных из казы 1 на среде СПА

Чистота выделенных культур контролировалась с помощью микроскопии. На рисунке 3 представлен микроскопический анализ кокковых культур, окрашенных по методу Грамма.

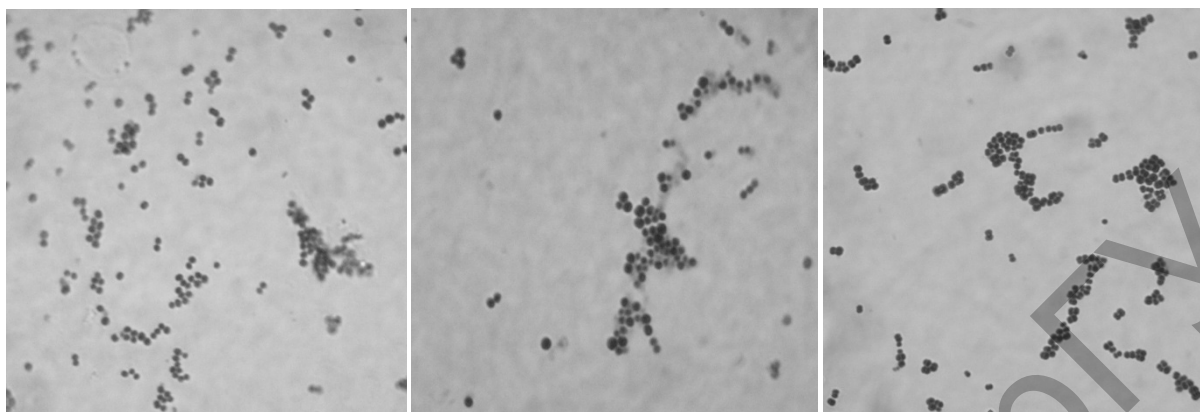


Рисунок 3. Микроскопия изолятов 1КВ, 1КР и 1КУ, выделенных из казы 1

Микроскопия выделенных из образца казы 1 изолятов 1КВ и 1КР подтверждает, что они относятся к грамположительным коккам, клетки которых располагаются одиночно, попарно или в виде тетрад, а также образуют скопления, напоминающие «гроздья» винограда. Клетки изолятов 2КВ1 и 2КВ2, выделенных из казы 2, также образуют «виноградные гроздья», что является одним из признаков, указывающих на их принадлежность к стафилококкам. Культуры 1КУ и 2КР1 имеют клетки идеальной шаровидной формы, которые в большинстве случаев расположены тетрадами. Клетки коккоподобных культур 1КС и 2КУ1 также не образуют четких плотных скоплений в виде «сот». Изолят 1КГ имеет клетки округло-овальной, немного вытянутой формы и отнесены к грамм-положительным палочкам.

Присутствие каталазы является основной отличительной особенностью стафилококков от стрептококков. Поэтому для дифференциации всех 9 исследуемых изолятов проведена постановка теста на каталазу. Результаты определения каталазной активности двух культур 1КВ и 1КР показаны на рисунке 4. Установлено, что все выделенные изоляты относятся к каталазоположительным микроорганизмам.

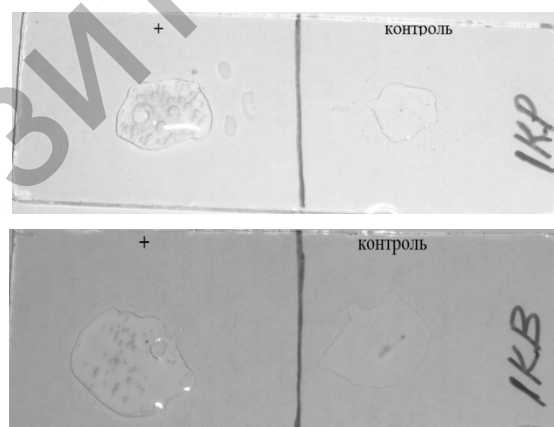
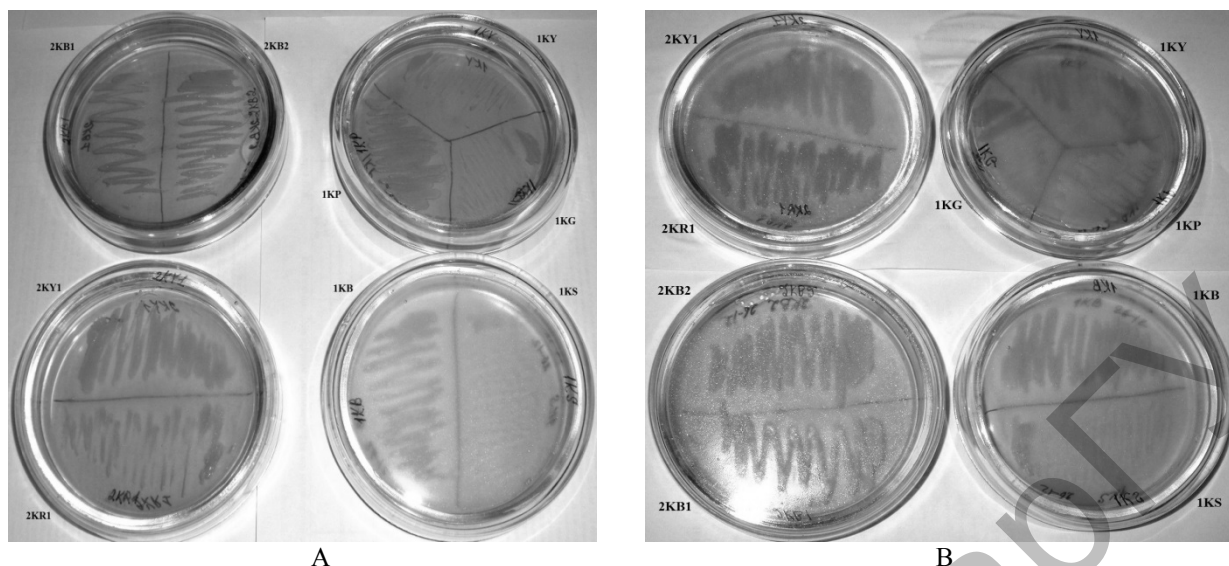


Рисунок 4. Определение каталазной реакции бактериальных изолятов 1КР и 1КВ из казы 1

Для определения характерной пигментации колоний стафилококков проведено их культивирование на селективной питательной среде *Staphylococcus agar* (Fluka, США), содержащей высокую концентрацию NaCl (7,5%), маннит в качестве источника углеводов и желатин. Патогенные стафилококки дают на этой среде колонии с желтой пигментацией. На рисунке 5 показаны чашки с 1- и 2-суточными культурами исследуемых микроорганизмов.



А — чашки с 1-суточными и В — чашки с 2-суточными культурами

Рисунок 5. Рост изолятов, выделенных из казы на среде *Staphylococcus agar*

На первые сутки на стафилококковой среде быстрый и обильный рост был характерен для культур 1KB и 1KP, а также 2KB1 и 2KB2, выделенных из образцов казы 1 и 2 соответственно (рис. 5А). Однако характерной для патогенных стафилококков желтой пигментации у данных бактерий не выявлено, их колонии были кремово-белого или бежевого цвета. На 2-е сутки культивирования изоляты 2KY1 и 2KR1 на этой среде показали средний рост, а 1KY, 1KG, 1KS на данной среде слабо росли (рис. 5В).

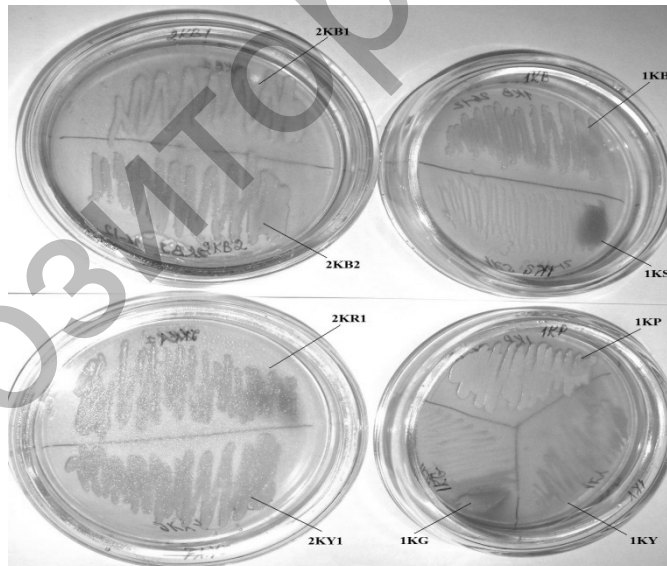


Рисунок 6. Качественная оценка усвояемости маннитола изолятами, выделенными из казы

На представленном рисунке 6 показано, что при нанесении на бактериальные колонии 1KB, 1KP, 2KB1 и 2KB2 капли 0,04 %-ного раствора бромтимолового синего цвет красителя был желтым, тогда как цвет колоний 2KY1 начинал приобретать слабо-зеленоватый оттенок. При этом цвет культур 1KY, 1KG, 1KS и 2KR1 сразу же приобретал слабо-зеленоватую или ярко-зелено-синеватую окраску. Данный показатель свидетельствует о возможной утилизации маннитола данными бактериями в анаэробных условиях.

Согласно определителю Берджи и сведениям, обобщенным в руководствах по клинической микробиологии, большинство штаммов рода *Staphylococcus spp.* на среде с глюкозой в анаэробных усло-

виях образуют ацетоин [2, 7]. На рисунке 7 представлены результаты определения способности бактериальных изолятов 1KB, 1KP, 1KY, 1KS и 1KG усваивать глюкозу в анаэробных условиях.

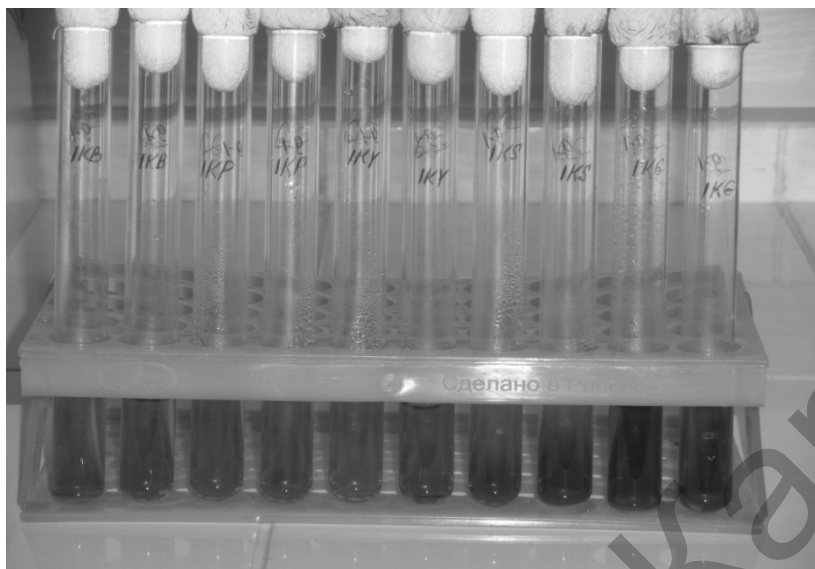


Рисунок 7. Качественная оценка усвояемости глюкозы в анаэробных условиях изолятами, выделенными из казы 1

Изменение окраски индикаторной среды Гисса свидетельствует, что изоляты 1KB, 1KP и 1KY (рис. 7), выделенные из образца казы 1, а также изолят 2KR1 из второго образца казы способны полностью ферментировать глюкозу в анаэробных условиях. В данных условиях из девяти изучаемых культур изоляты 2KB1, 2KB2, 2KY1, а также 1KG и 1KS обладали слабой активностью или совсем не ферментировали глюкозу.

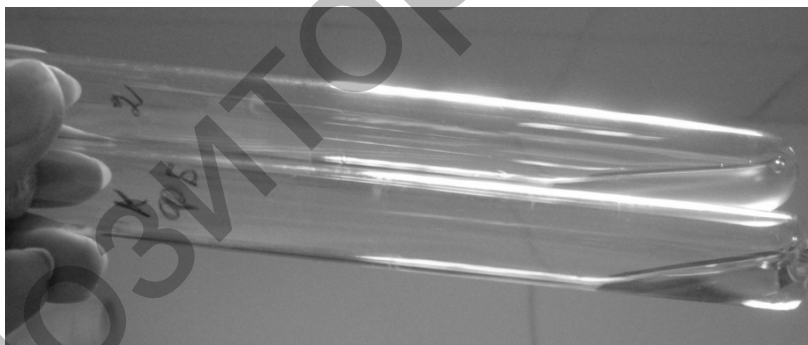


Рисунок 8. Качественная оценка коагулазной активности изолята, выделенного из казы

Для дифференциации патогенных стафилококков от непатогенных проведено определение коагулазной активности (рис. 8). Все 9 исследуемых культур отнесены к коагулазонегативным микроорганизмам, так как не обладали способностью к сворачиванию плазмы кроличьей крови.

Таким образом, на основе проведенных исследований установлено, что уровень обсемененности конского мяса, собранного на территории Северо-Казахстанской и Акмолинской областей, составляет $1,1 \cdot 10^5$ КОЕ и $7,8 \cdot 10^5$ КОЕ соответственно. Из данных мясных продуктов выделены в основном пигментированные коккоподобные бактерии, относящиеся к грамположительным микроорганизмам. Микроскопический анализ 9 выделенных микроорганизмов наряду с результатами биохимических тестов позволяет изоляты 1KB, 1KP и 1KY, а также 2KB1, 2KB2 и 2KR1 отнести к непатогенным бактериям рода *Staphylococcus spp.* Среди выделенных изолятов отсутствуют бактерии группы кишечных палочек (колиформы), что позволяет говорить о соответствии данных мясных продуктов санитарно-гигиеническим нормам. Однако в связи с тем, что некоторые виды КоНС, в частности *S. epidermidis* и *S. haemolyticus*, относятся к условно-патогенным микроорганизмам, вызывающим за-

болевания, возникает необходимость проведения видовой идентификации исследуемых изолятов, выделенных из мяса конины [8].

Список литературы

- 1 Guven K. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in Turkey / K. Guven, M.B. Mutlu, A. Gulbandilar, P. Cakir // *Journal of Food Safety*. — 2010. — Vol. 30, Iss. 1. — P. 196–212.
- 2 de Vos P. *Bergey's manual of Systematic bacteriology. The Firmicutes* / de Vos P., G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg et al. — Second edition. — New-York, 2009. — Vol. 3. — P. 392–426.
- 3 Podkowika M. Genotype and enterotoxigenicity of *Staphylococcus epidermidis* isolate from ready to eat meat products / M. Podkowika, K.S. Seob, J. Schuberta, I. Toloc, D.A. Robinsonc, J. Baniaa et al. // *International Journal of Food Microbiology*. — 2016. — Vol. 229. — P. 52–59.
- 4 Aymerich T. Microbial quality and direct PCR identification of Lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages / T. Aymerich, B. Martin, M. Garriga et al. // *Appl. and environ. microbiol.* — 2003. — Vol. 69, No. 8. — P. 4583–4594.
- 5 Tannock G.W. Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria / G.W. Tannock // *Current Issues Molecular Biol.* — 1999. — Vol. 1(1). — P. 53–64.
- 6 Нетрусов А.И. Практикум по микробиологии / А.И. Нетрусов. — М.: Академия, 2005. — 608 с.
- 7 Копылова Г.Е. Частная (медицинская) микробиология: учеб.-метод. пособие / Г.Е. Копылова, Г.А. Кравченко. — Нижний Новгород: Нижегородский гос. ун-т, 2015. — 46 с.
- 8 Melendez A.M. Molecular epidemiology of coagulase-negative bloodstream isolates: Detection of *Staphylococcus epidermidis* ST2, ST7 and linezolid-resistant ST23 / A.M. Melendez, M.R. Otero, L.V. Trevino, A.C. Ortiz, G.G. Gonzalez, J.L. Diaz, et al. // *Brazilian J. of Infectious diseases*. — 2016. — Vol. 20, No. 5. — P. 419–428.

М.Ж. Каирова

Жылқы етінің микрофлорасын зерттеу

Солтүстік Қазақстан және Ақмола облыстарының жылқы еті сынамаларының микрофлорасы зерттелді. Нәтижесінде Ақмола облысының 1 г жылқы еті үлгідегі микроағзалардың саны $7,8 \cdot 10^5$ КОЕ және Солтүстік Қазақстан облысының сынамасында $1,1 \cdot 10^5$ КОЕ деп анықталды. Солтүстік Қазақстанға қарағанда, Ақмола облысының жылқы еті сынамаларының микроағзалармен контаминациялану деңгейі жеті есе жоғары болды. Микробиологиялық әдістердің көмегімен тоғыз түрлі бактериялардың таза өсінділері бөліп алынды. Осы изоляттардың арасында ішек таяқшалар тобына жататын бактериялар (колиформалар) жоқтығы, зерттелінген ет сынамаларының санитарлық-гигиеналық талаптарына сәйкес келетінін растады. Алайда бөліп алынған 8 изоляттар кокктарға жататындығы микроскопиялық әдіс арқылы анықталды. Алынған бактерия изоляттарының морфологиялық, өсінділік және биохимиялық қасиеттерін зерттеу барысында олардың алтауының шартты-патогенді және коагулаза-негативті стафилококктар тобына жататындығы айқындалды.

Кілт сөздер: микрофлора, изоляттар, пигментелінген бактериялар, жылқы еті, қазы, контаминация, сериялық ерітінділер, колония қалыптастыратын бірліктер, стафилококктар, коагулаза-негативті, шартты-патогенді микроағзалар.

M.G. Kairova

Studying microflora of horsemeat

Microflora of horsemeat samples that collected in North Kazakhstan and Akmola regions are studied. It was found that Akmolinsky's kazy contains in average of $7.8 \cdot 10^5$ CFU/g and the kazy from North Kazakhstan have $1.1 \cdot 10^5$ CFU/g. The level of contamination of horsemeat from the Akmola region was seven times higher than that of the North Kazakhstan region. Nine bacterial cultures were isolated and obtained their pure cultures by using traditional microbiological methods. The general group of intestine rod-shaped bacteria (coli-forms) indicating a lack of adherence to good sanitary hygienic practices did not find among these microorganisms isolated from meat samples. However, microscopic analysis showed that 8 bacterial isolates is assigning to coccoid bacteria. Six of these cultures are belonging to a group of opportunistic and coagulase-negative staphylococci according to cultural-morphological and biochemical tests.

Key words: microflora, isolates, pigmented bacteria, horsemeat, kazy, contamination, serial dilution, colony-forming units, staphylococci, coagulase-negative, opportunistic microorganisms.

References

- 1 Guven K., Mutlu M.B., Gulbandilar A., & Cakir P. (2010). Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in Turkey. *Journal of Food Safety*, 30, 1, 196–212.
- 2 de Vos P., Garrity G.M., Jones D., & Krieg N.R., et al. (2009). *Bergey's manual of Systematic bacteriology. The Firmicutes* (2nd ed., Vol. 3). New-York, 392–426.
- 3 Podkowika M., Seob K.S., Schuberta J., Toloc I., Robinsonc D.A., & Baniaa J. (2016). Genotype and enterotoxigenicity of *Staphylococcus epidermidis* isolate from ready to eat meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 229, 52–59.
- 4 Aymerich T., Martin B., & Garriga M., et al. (2003). Microbial quality and direct PCR identification of Lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausages. *Appl. and environ. microbial*, 69, 8, 4583–4594.
- 5 Tannock G.W. (1999). Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues Molecular Biol.*, 1(1), 53–64.
- 6 Netrusov A.I. (2005). *Praktikum po mikrobiologii. [Workshop on Microbiology]*. Moscow: Akademiia [in Russian].
- 7 Kopylova G.E., & Kravchenko G.A. (2015) *Chastnaia (medicinskaia) mikrobiologia: Uchebno-metodicheskoe posobie [Private (medical) microbiology: Educational and methodological manual]*. Nizhnii Novgorod: Nizhegorodskii gos. universitet [in Russian].
- 8 Melendez A.M., Otero M.R., Trevino L.V., Ortiz A.C., Gonzalez G.G., Diaz J.L., et al. (2016). Molecular epidemiology of coagulase-negative bloodstream isolates: Detection of *Staphylococcus epidermidis* ST2, ST7 and linezolid-resistant ST23. *Brazilian J. of Infectious diseases*, 20, 5, 419–428.