



Latvijas Lauksaimniecības universitāte
Veterinārmedicīnas fakultāte
Klīniskais institūts
Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts "Sīgra"

Latvia University of Agriculture
Faculty of Veterinary Medicine
Clinical Institute
Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine "Sīgra"



SOLVEIGA LIEPIŅA
Mg. med. vet.

**STIRNU (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) UN NEBRĪVĒ
AUDZĒTO STALTBRIEŽU (*CERVUS ELAPHUS*) GAĻAS
MIKROBIĀLAIS PIESĀRŅOJUMS**

**ROE DEER (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) AND FARMED
RED DEER (*CERVUS ELAPHUS*) MEAT
MICROBIOLOGICAL POLLUTION**

Promocijas darba KOPSAVILKUMS
Dr. med.vet. zinātniskā grāda iegūšanai Veterinārmedicīnas nozarē

SUMMARY
of the Doctoral thesis for the scientific degree Dr. med.vet.

Jelgava, 2013. gads

LATVIJAS LAUKSAIMNIECĪBAS UNIVERSITĀTE
VETERINĀRMEDICĪNAS FAKULTĀTE
KLĪNISKAIS INSTITŪTS
BIOTEHNOLOĢIJAS UN VETERINĀRMEDICĪNAS ZINĀTNISKAIS
INSTITŪTS „SIGRA”

LATVIA UNIVERSITY OF AGRICULTURE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
CLINICAL INSTITUTE
RESEARCH INSTITUTE OF BIOTECHNOLOGY AND VETERINARY
MEDICINE „SIGRA”

Doktorante, Mg. med.vet.

Solveiga Liepiņa

**STIRNU (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) UN NEBRĪVĒ AUDZĒTO
STALTBRIEŽU (*CERVUS ELAPHUS*) GAĻAS MIKROBIĀLAIS
PIESĀRŅOJUMS**

**ROE DEER (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) AND FARMED RED DEER
(*CERVUS ELAPHUS*) MEAT MICROBIOLOGICAL POLLUTION**

Promocijas darba

KOPSAVILKUMS

Dr. med. vet. doktora grāda ieguvei Veterinārmedicīnas nozarē

SUMMARY

of the Doctoral thesis for scientific degree Dr. med. vet.



**PROMOCIJAS DARBA IZSTRĀDE UN NOFORMĒŠANA LĪDZFINANSĒTA ESF NACIONĀLĀS
PROGRAMMAS „ATBALSTS LLU DOKTORA STUDIJU ĪSTENOŠANAI”, IETVARĀ, LĪGUMS
NR. 04.4-08/EF2.D1.22**

**DEVELOPMENT AND DESIGN OF THE DOCTORAL THESIS WAS ESF COFINANCED: ESF
PROJECT SUPPORT FOR IMPLEMENTATION OF DOCTORAL STUDIES AT LLU,
AGREEMENT NO. 04.4-08/EF2.D1.22**

Jelgava, 2013

Promocijas darbs izstrādāts:

Latvijas Lauksaimniecības universitātes Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniski pētnieciskajā institūtā „Sīgra”

Research has been carried out at:

Latvia University of Agriculture, Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine “Sīgra”

Promocijas darba zinātniskie vadītājs:**Scientific supervisor:**

Dr. habil. agr., Dr. med. vet. profesors, LZA akadēmiķis

Aleksandrs Jemeljanovs

Oficiālie recenzenti:**Official reviewers:**

LLU VMF Dr.med.vet. asoc. profesore **Anda Valdovska**

LLU PTF Dr.sc.ing. profesore **Līga Skudra**

LU BF Dr. biol. docente **Vizma Nikolajeva**

Promocijas darba aizstāvēšana notiks 2014. gada 8. janvārī plkst. 12.00 LLU Veterinārmedicīnas fakultātē, Jelgavā, K. Helmaņa ielā 8, 1. klausītavā.

The defence of thesis will take place at the LUA Faculty of Veterinary medicine, 1st auditorium, on the 8 of January, 2014 at 12.00 o'clock.

Ar promocijas darbu var iepazīties Latvijas Lauksaimniecības universitātes Fundamentālajā bibliotēkā, Jelgavā, Lielajā ielā 2 un http://llufb.llu.lv/promoc_darbi.html

The thesis is available at the Fundamental Library of the Latvia University of Agriculture. Lielā iela 2. Jelgava and http://llufb.llu.lv/promoc_darbi.html

ISBN 978-9984-861-65-4 (online)

SATURA RĀDĪTĀJS

IEVADS	5
Pētījuma mērķis un uzdevumi.....	6
Darba zinātniskā novitāte.....	6
Pētījumu rezultātu aprobācija	7
MATERIĀLS UN METODES	9
Pētījuma laiks, vieta un materiāla raksturojums	9
Pētījuma veikšanas shēma	10
Pētījumā izmantotās metodes.....	11
Gaļas bakterioloģiskā izmeklēšana	11
Molekulārās bioloģijas izmeklējumi.	12
Mikoloģiskie izmeklējumi	12
PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA	13
Savvaļas stirnu (<i>Capreolus capreolus</i>) un nebrīvē audzētu staltbriežu (<i>Cervus elaphus</i>) gaļas pH un tā izmaiņas	13
Dažādos temperatūras režīmos un noteiktu laiku uzglabātas medījamo dzīvnieku gaļas bakteriālais piesārņojums un tā dinamika	15
Patogēnā <i>E.coli</i> O157:H7 serotipa identifikācija un virulences faktoru izvērtēšana staltbriežu gaļā.....	22
Stirnu un staltbriežu gaļas mikoloģiskais piesārņojums	23
SECINĀJUMI	27
ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES.....	28

CONTENTS

INTRODUCTION	30
Objective and tasks of the study	31
Scientific novelty of the work	31
Approbation of the study results	32
MATERIALS AND METHODS	34
Time, place of the study and material description	34
Study scheme	34
Methods used in the study	35
Bacteriologic examination of the meat	35
Examinations molecular biology	36
Mycological examinations	36
STUDY RESULTS AND DISCUSSION	37
pH of the meat of wild roe deer (<i>Capreolus capreolus</i>) and farmed red deer (<i>Cervus elaphus</i>) and its changes	37
Bacterial pollution of the game animal meat stored at different temperature regiments and for certain time and its dynamics	38
Identification of the pathogenic <i>E.coli</i> O157:H7 serotype and assessment of the virulence factors in the red deer meat	43
Mycologic pollution of the roe deer and red deer meat	44
CONCLUSIONS	46
SCIENTIFIC PUBLICATIONS AND THESES	47

IEVADS

Medījamo dzīvnieku gaļa ir kvalitatīvs, cilvēka organisma fizioloģiskiem procesiem atbilstošs uztur līdzeklis ar labu proteīna, minerālvielu un mikroelementu sastāvu, zemu tauku saturu un zemu holesterīna līmeni. Lai gan medījumu gaļas patēriņš salīdzinājumā ar mājdzīvnieku (cūku, liellopu, putnu) gaļu nav liels, tomēr pieprasījums pēc tās palielinās, un medījumu gaļas ieguve kļūst par nozīmīgu pārtikas ražošanas sastāvdaļu. Pēdējos gados strauji pieaug nebrīvē – briežu dārzos – audzētu dzīvnieku ganāmpulku skaits. Lai iegūtu optimālu gaļas kvalitāti, briežu fermās stingri jāievēro dzīvnieku labturības apstākļi. Atkarībā no briežu audzēšanas veida, audzētāji iegūst atšķirīgas kvalitātes produkciju. Lai briežus varētu uzskatīt par bioloģiskā lauksaimniecībā audzētiem dzīvniekiem, teritorijai jābūt pietiekami lielai, lai netraucētu to dabisko pārvietošanos, ēdināšanai jāparedz labas ganības un jāveic papildus piebarošana. Attīstīti izdzīvošanas instinkti ļauj briežiem eksistēt arī nebrīves apstākļos. Salīdzinot ar mājdzīvniekiem, savvaļas dzīvnieki ir jūtīgāki pret stresu.

Savvaļas dzīvnieku gaļas iegūšana saistīta ar medībām, kas ir komplekss process, kurā notiek dzīvnieku nošaušana, pirmapstrāde, nošautā dzīvnieka transportēšana uz turpmāko dzīvnieka ķermeņa apstrādes vietu. Pieļautas kļūdas, dzīvnieku nošaujot, veicot pirmapstrādi, transportējot un veicot liemeņu apstrādi gaļas pārstrādes uzņēmumā vai brīvā dabā, var sekmēt medījuma gaļas piesārņojumu, ko izraisa aerobie un anaerobie mikroorganismi. Kā parāda pētījumu (Adams, Moss, 2006) dati, uz medījumu gaļas virsmas un gaļā labi vairojas mikroorganismi un mikroskopiskās sēnes. Pierādīts, ka medījumu gaļā galvenokārt konstatē *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismus. Literatūras avotos (Reinken et al., 1980; Hoffman, Wiklund, 2006) norādīts, ka bīstamākā medījuma piesārņošanās notiek gadījumos, kad dzīvnieks ir sašauts vēderā vai ievainots un turpina pārvietoties: pārvietošanās laikā, lodes radītais piesārņojums izplatās dzīvnieka ķermenī. Patērētājs no medījumu gaļas, tāpat kā no mājdzīvnieku gaļas, var inficēties ar mikroorganismiem, kuri ierosina pārtikas infekcijas (Prendergast et al., 2004). Tādēļ, lai novērtētu medījumu gaļas higiēnisko stāvokli, svarīgi tajā noteikt mezofilo aerobo un fakultatīvi anaerobo (MAFAM) mikroorganismu skaitu un *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismu skaitu. Kā liecina zinātnieku pētījumi (Carter, 1990a; Хоули др., 1997), *Enterobacteriaceae* dzimta ietver sevī 30 baktēriju ģintis un vairāk nekā 120 sugas, no kurām vairākas uzturas dzīvnieku un cilvēku zarnu traktā, kā arī apkārtējā vidē. Pēdējos gados daudzi pētījumi (Rogerie et al., 2001; Keen, Elder, 2002; Nielsen, Scheutz, 2002; Omisakin et al., 2003; Aysun et al., 2006) veltīti patogēnajiem *Escherichia* ģints mikroorganismu serotipiem, kuri izdala verotoksīnus (VT1, VT2), kā arī satur intīmīna gēnu (*eaeA*), piesārņojot medījumu gaļu un izraisot bīstamas cilvēku saslimšanas.

Medījumu gaļas piesārņojumu rada arī mikroskopiskās sēnes. Lai gan lielākā daļa mikroskopisko sēņu ir nosacīti patogēnas, tām attīstoties ilgāku laika periodu piemērotos apstākļos, veidojas bīstamība cilvēku un dzīvnieku veselībai. Mikroskopiskās sēnes var radīt arī tauku bojāšanos un producēt mikotoksīnus (Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections, 1981). Autoru (Литвинов, 1967; Asefa et al., 2009; Asefa et al., 2010) pētījumi rāda, ka no medījumu gaļas galvenokārt tiek izdalītas *Ascomycota* un *Zygomycota* ģints mikroskopiskās sēnes, kas spēj nomākt organisma imunitātes aizsargfaktoros, ir izturīgas pret apkārtējās vides temperatūras, mitruma un pH izmaiņām, turklāt, tās var saglabāt dzīvotspēju ar nelielu barības vielu daudzumu apkārtējā vidē. Autori (Venkitasubramanian, 1977; Smith, Anderson, 1992; Ulloa, Hanlin, 2000; Asefa, 2009) uzsver, ka lielākā daļa no medījumu gaļā izolētajām mikroskopiskajām sēnēm sastopamas apkārtējā vidē, kas kalpo kā viens no gaļas piesārņojuma avotiem.

Pētījuma mērķis un uzdevumi

Promocijas **darba mērķis** bija noskaidrot un izvērtēt stirnu (*Capreolus capreolus*) un nebrīvē audzēto staltbriežu (*Cervus elaphus*) gaļas mikrobioloģiskā un mikoloģiskā piesārņojuma pakāpi gaļas ieguves un uzglabāšanas procesa laikā dažādu temperatūras režīmu apstākļos.

Mērķa sasniegšanai tika izvirzīti sekojoši **darba uzdevumi**:

1. noteikt stirnu un staltbriežu liemeņu mikrobiālo un mikoloģisko piesārņojumu, kā arī mikrobioloģiskā piesārņojuma un gaļas pH savstarpējo sakarību;
2. noteikt stirnu un staltbriežu gaļas mikrobioloģiskā piesārņojuma dinamiku uzglabāšanas laikā dažādos temperatūras režīmos;
3. noskaidrot staltbriežu gaļas iespējamo piesārņojumu ar *Escherichia coli* patogēno serotipu, kā arī noteikt verotoksīnu VT1, VT2 un intimīna piesaistes gēna *eaeA* klātbūtni;
4. noskaidrot mikroskopisko sēņu izplatības intensitāti un kontaminācijas pakāpi stirnu un staltbriežu gaļā.

Darba zinātniskā novitāte

- Pirmo reizi Latvijā noteikts un sistematizēts stirnu un staltbriežu gaļas mikrobioloģiskais un mikoloģiskais piesārņojums;
- Noteikta medījumu gaļas mikrobioloģiskā piesārņojuma dinamika noteiktos laika periodos dažādu temperatūras režīmu apstākļos;
- No staltbriežu gaļas izolēts un identificēts patogēnais *E. coli* O157:H7 serotips ar verotoksīnu un intimīna piesaistes producējošiem gēniem.

Pētījumu rezultātu aprobācija

Pētījuma rezultāti aprobēti sekojošās starptautiskās zinātniskās konferencēs un semināros:

1. Liepiņa S., Jemeljanovs A. „Mold Pollution on Fresh Red Deer (*Cervus Elaphus*) Meat in Latvia”. IAFP European Symposium on Food Safety 15–17 May, 2013, Marseille, France.
2. Liepiņa S., Jemeljanovs A. Latvijā medījumu dzīvnieku gaļas mikrobiālais piesārņojums. Wild animals' meat pollution by microbial agents in Latvia. Conference Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes 22–23. 11. 2012, Jelgavā.
3. Liepina S., Jemeljanovs A. “Pathogenic *Escherichia coli* strains in red deer meat hunted in Latvia”. International scientific conference “Research for rural development” 18–20 May, 2012, Jelgava, Latvia.
4. Liepina S., Jemeljanovs A. International conference on agricultural, biotechnology, biological and biosystems engineering. „Detection of pathogenic *Escherichia coli* strains pollution in red deer meat in Latvia and determination the compatibility of VT1, VT2, *eaeA* genes in their isolate”. 13–14 May, 2012, Amsterdam, Netherlands.
5. Liepina S., Jemeljanovs A. “Moulds contaminants on fresh meat derived from roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*)”. International scientific conference “Research for rural development” 18–20 May, 2011, Jelgava, Latvia.
6. Liepina S., Jemeljanovs A. „Prolonging Possibilities of Wild Animals' (*Capreolus capreolus* and *Cervus elaphus*) Meat Quality”. 6th International CIGR Technical Symposium: Towards a Sustainable Food Chain–Food Process, 18–20 April, 2011, Nantes, France.
7. Liepina S., Jemeljanovs A. “Wild Animals (*Capreolus capreolus*, *Cervus elaphus*) meat microbiological pollution in Latvia”. 12th International Meat Technology Symposium “Noda 2010”. Meat–technology, Quality and Safety. 19–21 October, 2010, Novi–Sad, Srbija.
8. Liepina S., Jemeljanovs A. Farmed deer (*Cervus elaphus*) meat microbiological pollution. 3rd Annual International Conference on Agriculture, 15–18 July, 2010, Athens, Greece.
9. Liepina S., Jemeljanovs A. Wild animals (*Capreolus capreolus* and *Cervus elaphus*) meat microbiological pollution. International scientific conference “Research for rural development” 18–20 May, 2010, Jelgava, Latvia.

Piedalīšanās citās konferencēs un semināros promocijas darba rezultātu ziņošanai:

1. Liepiņa S., Jemeljanovs A., Konošonoka I.H., Strazdiņa V. Meža dzīvnieku – stirnu (*Capreolus capreolus*) un briežu (*Cervus elaphus*) kvalitatīvas gaļas uzglabāšanas laika pagarināšanas iespējas. (pateicības raksts) LLMZA kopsapulce, 07.06.2012, Latvijas Lauksaimniecības universitāte.
2. Liepiņa S., Jemeljanovs A. Meža dzīvnieku (*Capreolus capreolus* un *Cervus elaphus*) kvalitatīvas gaļas uzglabāšanas laika pagarināšanas iespējas. LZA Apvienotā Pasaules latviešu zinātnieku 3. kongresā sekcijas „Lauksaimniecības un meža zinātnes” 24–27. 10, 2011, Latvijas Lauksaimniecības universitāte.
3. Liepiņa S., Jemeljanovs A. „Potential microbiological contamination of meat in carcasses of roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*)”. 2nd international food safety, veterinary and animal feeding congress „Congress «Bridge over Europe 2011”, 24.09.2011. Rīga, Latvija.
4. Liepiņa S., Jemeljanovs A. Ziņojums LLMZA seminārā (pateicības raksts) „Stirnu (*Capreolus capreolus*) un staltbriežu (*Cervus elaphus*) liemeņu iespējamā mikrobiālā piesārņojuma pētījumi gaļas ieguves procesā” 15.09.2011. Latvijas Lauksaimniecības universitātes Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts „Sigrā”. Latvija.

Darba apjoms: promocijas darbs noformēts 109 lappusēs un sastāv no anotācijas, ievada, literatūras apskata, darba metodikas, pētījuma rezultātiem, diskusijas, secinājumiem, ieteikumiem praksei, izmantotās literatūras saraksta un pielikuma.

MATERIĀLS UN METODES

Pētījuma laiks, vieta un materiāla raksturojums

Pētījums veikts laika posmā no 2009. gada oktobra līdz 2012. gada augustam. Pētījuma veikšanai medību sezonas laikā kopumā iegūti 30 dzīvnieku gaļas paraugi, t.i., divos medību kolektīvos novembra mēnesī 15 savvaļas stirnu (*Capreolus capreolus*) gaļas kopparaugi un divās Vidzemes reģiona briežu audzētāju saimniecībās oktobra mēnesī 15 nebrīvē audzētu staltbriežu (*Cervus elaphus*) gaļas kopparaugi, kas saimniecībās tika iegūti, dzīvniekus atšaujot gaļas ieguves nolūkā speciāli paredzētā aplokā.

Liemeņu un iekšējo orgānu pēcnāves veterināri sanitārās ekspertīzes veikšanas laikā tika ņemti arī pētījumam paredzētie paraugi. Saskaņā ar standarta LVS ISO 17604:2005 „Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija” prasībām, paraugi mikrobioloģiskai izmeklēšanai tika ņemti 12 stundu laikā pēc dzīvnieka nošaušanas.

No stirnu un nebrīvē audzēto staltbriežu liemeņa pētījumam tika ņemti paraugi no garākā jostas muskuļa (*m.longissimus lumborum*), ciskas divgalvainā (*m.biceps femoris*) un pleca trīsgalvainā muskuļa (*m.triceps brachii*) (Brūveris, 2007) tā, lai visu 3 muskuļu veidojošā apvienotā parauga kopējā masa būtu vismaz 0.250 kg.

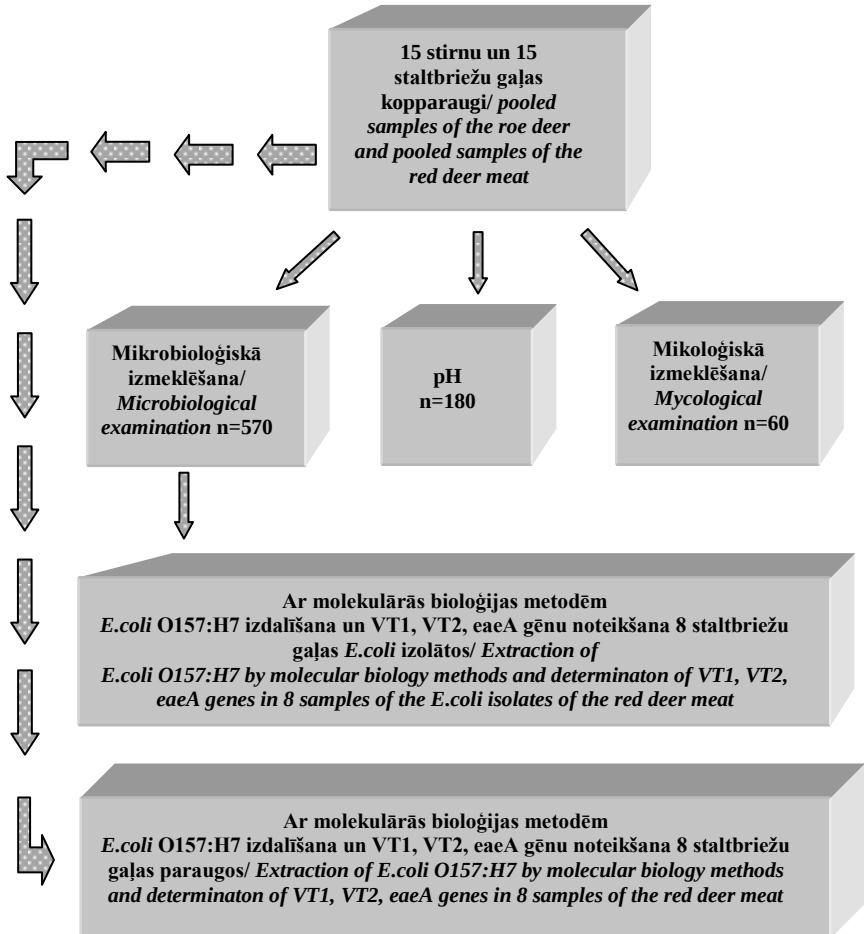
Medījumu gaļas paraugiem mikrobioloģiskā izmeklēšana tika veikta Latvijas Lauksaimniecības universitātes „Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniski pētnieciskā institūta „Siga” (turpmāk – ZI „Siga”) Latvijas Nacionālā akreditācijas biroja akreditētā (LATAK–T–038–08–99) Bioķīmijas un mikrobioloģijas zinātniskajā laboratorijā.

Medījumu gaļas mikrobiālā piesārņojuma izmeklējumu metodika papildināta Zviedrijas Lauksaimniecības Zinātņu universitātē Veterinārmedicīnas un lauksaimniecības dzīvnieku fakultātē, taču izolēto mikroorganismu kultūru patogenitātes apstiprināšana veikta institūta „Siga” Molekulārās bioloģijas laboratorijā.

Pētījuma veikšanas shēma

Katram pētījumā atlasītajam medījuma dzīvnieka (t.i., 15 stirnu un 15 staltbriežu) liemenim tika veikts muskuļaudos pH mērījums, gaļu uzglabājot 12, 24, 36, 48, 60 un 72 h pie + 4 °C.

Pētījuma kopējā shēma parādīta 1. attēlā.



1. att. Pētījuma veikšanas shēma/
Fig.1. Study scheme

Lai noskaidrotu mezofīli aerobo un fakultatīvi anaerobo (MAFAM), kā arī *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismu piesārņojuma izmaiņas (pēc 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 un 168 stundām) medījumu gaļā tās uzglabāšanas laikā pie +4 °C un pie +8 °C, kā arī pēc 12, 24 un 48 h pie +20 °C, no 15 stirnu un 15 staltbriežu liemeņiem kopumā tika veikti 570 paraugu bakterioloģiskie uzsējumi.

Izmantojot molekulārās bioloģijas metodes (polimerāzes ķēdes reakciju (PKR) un reālā laika polimerāzes ķēdes reakciju (RL-PKR)), tika pierādīta *E. coli* identifikācija astoņām *E.coli* tīrkultūrām, kuras ar mikrobioloģijas metodēm izolējām no staltbriežu gaļas kopparaugiem. Ar molekulārām metodēm tika pētīta arī patogēnā *E. coli* O151:H7 serotipa klātbūtne gan 8 *E.coli* tīrkultūrās, gan staltbriežu gaļā, kā arī pārbaudījām, vai *E. coli* (staltbriežu gaļā un tīrkultūrā) satur toksīnus producējošos VT1, VT2 un *eaeA* gēnus.

Medījumu gaļas mikoloģiskā piesārņojuma analīze tika veikta 30 stirnu un 30 staltbriežu gaļas kopparaugiem, lai noskaidrotu mikroskopisko sēņu klātbūtni, uzglabājot gaļu pie +4 °C 12 h.

Pētījumā izmantotās metodes

Gaļas paraugu pH noteikšana. Medījuma gaļas paraugos pH tika noteikts saskaņā ar LVS ISO 2917:2004 standartu, izmantojot verificētu „JENWAY 3520 pH Meter”. Katram pētījumā izvēlēta dzīvnieka liemenim pH tika mērīts kreisajā pusē, pH mērītāja elektrodu ievadot garajā jostas muskulī (*m.longissimus lumborum*) 2 – 3.5 cm dziļi un 70–90 ° leņķī attiecībā pret medījuma liemeņa garenisko asi.

Gaļas bakterioloģiskā izmeklēšana. Kopējo dzīvotspējīgo mikroorganismu šūnu skaitu noteicām, ņemot vērā autoru (Finegold, Martin, 1982; Difco, 1998; Forsythe, 2010) pētniecības darba pieredzi un saskaņā ar standarta LVS EN ISO 4833:2003 prasībām. Paraugu sagatavošana mikrobioloģiskai testēšanai tika veikta saskaņā ar standarta LVS EN ISO 6887-2:2004 2. daļas noteikumiem. MAFAM skaits paraugos tika noteikts saskaņā ar standartu LVS EN ISO 4833:2003 „Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija. Mikroorganismu skaitīšanas horizontālā metode.” *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaits noteikts saskaņā ar standartu LVS ISO 21528-2:2004. *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju sugu noteikšanai tika izmantots MacConkey agars, no kura katru pierādīšanai atlasīto koloniju uzsējām uz barojošā agara, inkubējām 24 ± 1 h +37 °C temperatūrā, kolonijas krāsojām pēc Grama un tika noteiktas bioķīmiskās īpašības: oksidāzes, indola veidošana, citrāta izmantošana, glukozes (metilsarkanā tests) un ogļhidrātu fermentēšanu (Foges-Proskauera tests).

Iegūto bioķīmisko īpašību rezultāti tika analizēti, lai izvēlētos baktēriju tīrkultūras noteikšanai līdz sugai, izmantojot BBL Crystal gramnegatīvo mikroorganismu identifikācijas blokus (BBL Crystal E/NF, 245000) un salīdzināti ar *E. coli* ATCC 25922 references tīrkultūru.

Mikroorganismu augšanas ātruma noteikšana. Mikroorganismu augšanas ātruma rādītājs tika aprēķināts novērojuma perioda sākumā un beigās, noteikto

mikroorganismu skaita starpību izdalot ar novērojuma perioda ilgumu (stundās vai dienās) un tika noteikts pēc autora (Стеле, 2008) ieteiktās formulas.

Molekulārās bioloģijas izmeklējumi. Lai veiktu PĶR, no izvēlētajiem paraugiem tika izdalīta DNS, vadoties pēc ražotāja instrukcijas un izmantojot DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) komplektu. Mērot ar spektrofotometru NanoDrop (Applied Biosystems), tika pārbaudīta izdalīto DNS koncentrācija un tīrība. Sekvenēšanas reakcija tika veikta, izmantojot komerciālo komplektu MicroSeq® 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit (Applied Biosystems) vadoties pēc ražotāja norādījumiem. Tika sekvenēts 16S rRNS rajons un iegūtais rezultāts salīdzināts ar internetā pieejamo datubāzi NCBI.

PĶR paraugu sagatavošana amplifikācijai. DNS līdz izmantošanas brīdim tika uzglabātas -70°C temperatūrā. PĶR reakcijas veikšanai *E. coli* gēnu reģiona amplifikācijai, saskaņā ar ražotāja norādījumiem, tika izmantots komerciālais komplekts (Genekam Biotechnology AG). Izmantojot Profesional Gradient (Biometra, ASV) amplifikatoru, tika izdarīta amplifikācija. *E. coli* verocitotoksīnu VT1 un VT2 gēnu, un intimīna gēna *eaeA* amplifikācija tika veikta saskaņā ar aprakstu (Verocytotoxigenic *Escherichia coli*, 2004). Ar RL-PĶR tika identificēts *E.coli* patogēnā celma serovariants *E.coli* O157:H7, izmantojot (PrimerDesignTM, Ltd).

Mikoloģiskie izmeklējumi tika veikti saskaņā ar standartu LVS ISO 21527 – 2:2008 (E).

Datu statistiskā apstrāde izmantota divfaktoru dispersiju analīze ANOVA metode, lai salīdzinātu faktoru (temperatūras un uzglabāšanas laika) ietekmi uz rezultātīvo pazīmi – MAFAM un *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismu daudzumu. Izvērtētās hipotēzes pārbaudītas ar ticamības intervāla un p-vērtības metodi, un faktori novērtēti kā būtiski, ja $p < 0.05$.

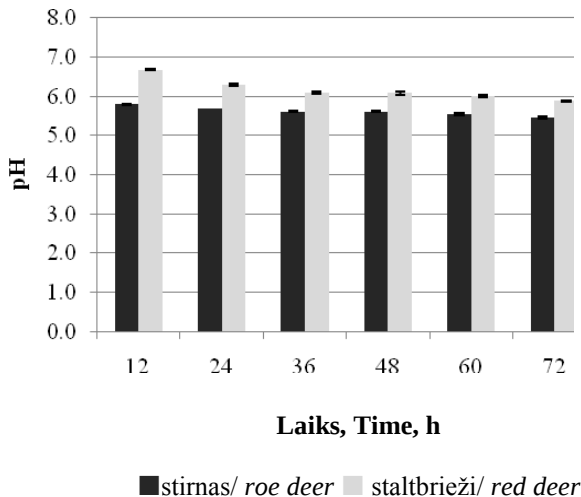
Eksperimentālo datu apstrādei un sakarību noteikšanai tiek izmantota matemātiskā programmu pakete MathCad-14, bet iegūto sakarību grafiskai attēlošanai izmantota programmu pakete MatLab-7. Datu apstrādei tiek izmantota divfaktoru nelineārā regresijas analīzes metode.

PĒTĪJUMA REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Medījumu gaļas ieguvē, pirmapstrādē, transportēšanā un sadalīšanā ļoti liela nozīme ir stingru higiēnas prasību ievērošanai. Lai to izvērtētu, veicām pētījumu, kas ļautu noskaidrot medījumu gaļas iespējamo mikrobiālo un mikoloģisko piesārņojumu. Darba gaitā tika pētīts stirnu un staltbriežu gaļas pH rādītāji, mikrobiālā piesārņojuma kopējais dzīvotspējīgo mikroorganismu skaits, kā arī mikroorganismu skaita pieauguma dinamika medījamo dzīvnieku svaigajā gaļā un tās turpmākajā uzglabāšanas laikā.

Savvaļas stirnu (*Capreolus capreolus*) un nebrīvē audzētu staltbriežu (*Cervus elaphus*) gaļas pH un tā izmaiņas

Savvaļas stirnu un nebrīvē audzētu staltbriežu gaļas pH tika analizēts, uzglabājot +4 °C ar 12 h intervālu, t.i., 12, 24, 36, 48, 60, 72 stundas pēc dzīvnieka nošaušanas. Iegūtie rezultāti parādīja, ka stirnām un staltbriežiem gaļas uzglabāšanas laikā pH samazināšanās būtiski ($p < 0.05$) atšķiras.



2. att. pH izmaiņas stirnu un staltbriežu gaļā, to uzglabājot pie +4 °C/
Fig.2. pH changes in the roe and red deer meat storing it at +4 °C

Vidējais pH **stirnu** gaļas paraugos, tos uzglabājot pie +4 °C 12 h, bija 5.8, bet, uzglabājot 72 stundas ilgi, pH samazinās līdz 5.47 jeb kopumā par 5.6% no 12 h rādījuma. Kā redzams no 2.att., tad visstraujākais pH samazinājums gaļā vērojams pie 24 h un 36 h ilgas glabāšanas, taču pH samazināšanos nenovēro, stirnu gaļu uzglabājot 48 h ilgi redzams 1. tabulā.

1. tabula/*Table 1*

Medijumu gaļas pH rādījumu izmaiņas dažādos uzglabāšanas laikos
Changes in the pH values at different storage times

Paraugu uzglabāšanas ilgums/ <i>Duration of the sample storage,</i> <i>h</i>	Stirnu gaļa /Roe deer meat				Staltbrīežu gaļa /Red deer meat			
	$\bar{x}$	SE	pH samazināšanās no uzglabāšanas sākuma /pH decrease comparing with the storage beginning (%)	pH samazināšanās ik pēc 12 h/pH decrease in each 12 h (%)	$\bar{x}$	SE	pH samazināšanās no uzglabāšanas sākuma /pH decrease comparing with the storage beginning (%)	pH samazināšanās ik pēc 12 h/pH decrease in each 12 h (%)
12	5.79	±0.009	-	-	6.68	±0.015	-	-
24	5.69	±0.009	1.8	1.8	6.30	±0.026	5.7	5.7
36	5.61	±0.012	3.1	1.5	6.09	±0.025	8.8	3.7
48	5.61	±0.015	3.1	0.0	6.08	±0.048	9.0	0.2
60	5.54	±0.025	4.4	1.3	6.01	±0.021	10.0	1.2
72	5.47	±0.029	5.6	1.3	5.89	±0.013	11.8	2.0

Izvērtējot pH rādītāja izmaiņu dinamiku **staltbrīežu** gaļā, konstatējām, ka pH samazināšanās tendences ir līdzīgas kā stirnu gaļā, tikai pirmajās 36 stundās process norit 3 reizes straujāk (skat. 1. tab.).

Kas attiecas uz stirnu gaļā konstatēto vidējo pH 5.78, tad jāsecina, ka tas sakrīt ar citu autoru novērojumiem (Atanassova et al., 2008; Daszkiewicz et al., 2009) un raksturo labu gaļas kvalitāti, jo vērtība no 5.5 – 5.8 tiek uzskatīta par atbilstošu (Wiklund, Smulders, 2011). To varētu skaidrot ar faktu, ka stirnas tika medītas ziemā mazāka stresa apstākļos un dzīvnieki nebija fiziski novārguši.

Attiecībā uz mūsu pētīto (rudens mēnešos iegūto) staltbrīežu gaļas pH (t.i., 6.68), jāatzīmē, ka tas bija par 10% augstāks, nekā zinātnieku ieteiktais. Autori (Wiklund et al., 2001), dažādos gadalaikos pētot staltbrīežu gaļas pH, konstatējuši, ka tas variē. Piemēram, decembrī iegūtā gaļā pH ir vidēji 5.45, martā – 5.63, bet rudenī – 5.61. Lai arī pH muskulatūrā biežāk konstatē ap 5.5 (Pollard et al., (2002) – 5.54 līdz 5.60, Wiklund et al., (2001) – 5.71 un Wiklund et al., (2003) – 5.59 līdz 5.64), tomēr

staltbriežu gaļas pH par atbilstošu tiek uzskatīta no 5.8 līdz 6.0 (Stevenson-Barry et al., 1999; Mach et al., 2008).

Vērā ņemama ietekme uz muskuļu glikogēna daudzumu un tādējādi arī uz gaļas pH līmeni ir dzīvnieku barošanas statusam un fiziskai kondīcijai (Wiklund et al., 1996; Wiklund et al., 2003). Ja staltbrieži divus mēnešus pirms nošaušanas tiek piebaroti ar rūpniecisko barības maisījumu, palielinās glikogēna rezerves muskuļos, tādējādi pH līmenis pēc dzīvnieka nošaušanas strauji samazinās (Wiklund et al., 2001; Wiklund et al., 2002).

Mūsu pētījumā iekļautie nebrīvē audzētie staltbrieži, no kuriem paraugus ieguva oktobra mēnesī, bija ļoti labā fiziskā kondīcijā, pie tam, dzīvnieki tika papildus piebaroti ar graudiem, tātad pH līmenim staltbriežu gaļā vajadzēja būt būtiski zemākam par mūsu iegūto 6.68. Varam izdarīt pieņēmumu, ka, lai arī par nebrīvē audzētiem dzīvniekiem īpašnieki ļoti rūpējas, tomēr savvaļas dzīvniekiem iedzimtās īpašības – just, nojaust, baidīties – ir radījušas pastiprinātu pirmskaušanas stresu, jo būtisks faktors, kas samazina glikogēna līmeni, ir pirmskaušanas stress (Brian McIntyre, 2006; Mach et al., 2008).

Kas attiecas uz pH līmeņa samazināšanos medījumu gaļā pie 24 h un 36 h ilgas uzglabāšanas, tad mūsu konstatētie pH samazinājumi sakrīt ar pēcnāves sastinguma procesa norisi muskulatūrā, kas iestājas pēc 24 – 36 stundām un parasti izbeidzas pēc 72 stundām (Wiklund et al., 2001; Wiklund et al., 2002). Stresainiem dzīvniekiem *rigor mortis* parasti iestājas ātrāk, kas saistīts ar straujāku glikogēna samazināšanos muskuļaudos (Taylor et al., 1995; James et al., 2005), tāpēc pH samazināšanos muskulatūrā praktiski nenovērojām jau pie 48 h ilgas gan stirnu, gan staltbriežu gaļas uzglabāšanas.

Dažādos temperatūras režīmos un noteiktu laiku uzglabātas medījamo dzīvnieku gaļas bakteriālais piesārņojums un tā dinamika

Viens no darba uzdevumiem bija noteikt stirnu un nebrīvē audzētu staltbriežu gaļas mikrobiālā piesārņojuma dinamiku uzglabāšanas laikā. Uzglabājot ilgāk par 168 h, varēja novērot pūšanas procesa attīstību, tādēļ medījuma gaļā notiekošo procesu izziņāšanai paraugi, uzglabājot ilgāk par 168 h, vairs pētījumā tālāk netika iekļauti.

Mikrobioloģisko pētījumu rezultāti, uzglabājot medījumu gaļu atšķirīgos temperatūras režīmos un dažādā laika periodā, parādīti 2. tabulā.

**Medijamo dzīvnieku gaļā noteikto MAFAM un enterobaktēriju skaita dinamika
saistībā ar uzglabāšanas ilgumu un temperatūru**
***Dynamics of the count of MAFAM and Enterobacteriaceae found in the game
animal meat depending on the storage time and temperature***

Tempera- tūra/ Tem- perature	Laiks/ Time h	Stirnu gaļa/ Roe deer meat		Nebrīvē audzētu staltbriežu gaļa/ Farmed deer meat	
		MAFAM (lg kvv g ⁻¹)	Enterobacte- riaceae (lg kvv g ⁻¹)	MAFAM (lg kvv g ⁻¹)	Enterobacte riaceae (lg kvv g ⁻¹)
+4 °C	12	3.46 ± 0.50	2.64±0.49	4.13±0.72	3.86±0.71
	24	3.51 ± 0.47	2.69±0.46	4.25±0.64	3.98±0.64
	48	4.34 ± 0.19	3.40±0.20	6.00±0.92	4.82±0.92
	72	4.43 ± 0.17	3.50±0.18	6.38±0.93	5.19±0.92
	96	4.40 ± 0.18	3.46±0.18	6.74±0.93	5.55±0.92
	120	4.21 ± 0.08	3.29±0.10	6.69±0.93	5.51±0.92
	144	4.12 ± 0.10	3.20±0.09	6.68±0.92	5.49±0.92
	168	4.04 ± 0.10	3.10±0.09	5.24±0.09	4.05±0.09
+8 °C	12	3.69 ± 0.44	2.86±0.35	5.50±0.36	5.23±0.36
	24	4.50 ± 0.35	3.67±0.30	6.32±0.38	6.05±0.38
	48	4.58 ± 0.30	3.66±0.09	7.22±0.36	6.00±0.35
	72	5.37 ± 0.10	4.44±0.11	7.99±0.35	6.81±0.35
	96	5.33 ± 0.11	4.39±0.11	7.95±0.35	6.76±0.36
	120	5.06 ± 0.11	4.12±0.11	7.69±0.39	6.49±0.38
	144	4.89 ± 0.11	3.96±0.11	7.53±0.37	6.34±0.38
	168	4.83 ± 0.12	3.90±0.11	7.44±0.38	6.27±0.38
+20 °C	12	5.24 ± 0.11	4.31±0.35	7.88±0.37	6.69±0.36
	24	5.66 ± 0.24	4.73±0.24	8.29±0.36	7.10±0.36
	48	6.91 ± 0.32	5.97±0.31	9.54±0.40	8.35±0.40

Sakarā ar to, ka norādes normatīvajos dokumentos par MAFAM un *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismu pieļaujamo daudzumu savvaļas dzīvnieku gaļā nav, vērtējumam izmantojām autoru (Membré et al., 2011) ieteiktās pieļaujamās normas, ka bakteriālais piesārņojums medījumu gaļā var būt par vienu logaritmu augstāks nekā EK Regulā Nr. 2073/2005 tas noteikts liellopu, aitu, kazu un zirgu gaļai (aerobo mikroorganismu piesārņojums robežās no 3.5 līdz 5.0 lg kvv g⁻¹, bet *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismiem – no 1.5 līdz 2.5 lg kvv g⁻¹).

Mūsu pētījumā iegūtie rezultāti (skat. 2. tab.) parādīja, ka, uzglabājot stirnu gaļu līdz 168 h pie +4 °C un pie +8 °C, kopējā bakteriālā piesārņojuma vidējās vērtības bija pieļaujamās normas robežās, kaut arī novērojām, ka pie +4 °C MAFAM

skaits, uzglabājot 168 h, palielinās par 14.4%, salīdzinot ar MAFAM rādītāju pie 12 h uzglabāšanas, bet pie +8 °C – par 23.6%, salīdzinot ar 12 h rādījumu.

Izvērtējot **MAFAM** vidējo vērtību izmaiņas stirnu gaļā pie +4 °C, redzam, ka būtisku ($p<0.05$) rādītāja palielināšanos (skat. 2. tabula) novēro pie 48 h uzglabāšanas (par 19.2%, salīdzinot ar 24 h rādītāju), turpretim būtisku ($p<0.05$) mikroorganismu skaita samazināšanos novēro pie 120 h uzglabāšanas. MAFAM samazināšanos novēro arī turpmākos uzglabāšanas periodos, t.i., pie 144 h par 2.2% un pie 168 h – par 2%.

Kas attiecas uz MAFAM vidējo vērtību izmaiņām stirnu gaļā pie +8 °C, redzam, ka būtisku ($p<0.05$) rādītāja palielināšanos par 18% novēro jau pie 24 h uzglabāšanas, salīdzinot ar 12 h rādītāju, kā arī pie 72 h uzglabāšanas (par 14.8%, salīdzinot ar 48 h rādītāju). Jāatzīmē, ka būtisku ($p<0.05$) mikroorganismu skaita samazināšanos, tāpat, kā pie +4 °C temperatūras, novēro gaļu uzglabājot 120 h ilgi. Nelielu MAFAM samazināšanos novērojām arī turpmākos uzglabāšanas periodos, t.i., pie 144 h par 3.4% un pie 168 h – par 1.3%.

Būtiski atšķirīgākas ir MAFAM piesārņojuma izmaiņas, uzglabājot stirnu gaļu + 20 °C temperatūrā, salīdzinot ar baktēriju skaita dinamiku, uzglabājot gaļu pie +4 °C un +8 °C. Kā redzam no 2. tabulas, gan 24 h, gan 48 h ilga uzglabāšana pie +20 °C rada MAFAM skaita būtisku ($p<0.05$) pieaugumu, turklāt, 48 stundu ilga glabāšana iepriekšminētā temperatūrā jau radīja MAFAM pieļaujamās normas pārsniegšanu stirnu gaļā par 13.2%.

Analizējot MAFAM vidējās vērtības izmaiņas staltbriežu gaļā, no 2. tabulas redzam, ka tikai 21% gadījumā gaļa atbilst pieļaujamām normām. Uzglabājot staltbriežu gaļu +4 °C temperatūrā, redzam (2. tabula), ka 48 h ilga uzglabāšana rada būtisku ($p<0.05$) MAFAM skaita pieaugumu, t.i., par 22.8%, salīdzinot ar 24 h rezultātu. Turpretim, izvērtējot bakteriālā piesārņojuma samazināšanos, secinām, ka, atšķirībā no stirnu gaļā novērotā, staltbriežu gaļā MAFAM būtiska ($p<0.05$) samazināšanās (par 21.6%) pie +4 °C uzglabāšanas notiek tikai 168 h laikā, salīdzinot ar rezultātu pie 144 h.

Kas attiecas uz MAFAM vidējo vērtību izmaiņām staltbriežu gaļā pie +8 °C, redzam, ka pēc 24 h uzglabāšanas būtiski ($p<0.05$) pieaug MAFAM skaits, pārsniedzot pieļaujamo normu. Vislielāko mikroorganismu skaita pieaugumu novēro pēc 72 h, t.i., jo tas palielinās par 9.7%, salīdzinot ar 48 h rezultātu. Turpretim, atšķirībā no baktēriju skaita vērtību izmaiņām, uzglabājot staltbriežu gaļu pie + 4 °C, kā arī stirnu gaļu, to uzglabājot vēsajās temperatūrās, staltbriežu gaļā gan MAFAM skaita nelielu samazināšanos pēc 120 h ilgas uzglabāšanas tomēr novēro, taču tā ir nebūtiska ($p>0.05$).

Analizējot MAFAM skaita vērtību izmaiņas, uzglabājot staltbriežu gaļu +20 °C temperatūrā, jāsecina, ka šeit vērojams ļoti būtisks ($p<0.05$) minēto mikroorganismu skaita pieaugums visos pētāmajos uzglabāšanas laikos, turklāt, 48 h laikā MAFAM skaits pieauga pat par 13.2%, salīdzinot ar 24 h rezultātu. Visos pētāmajos uzglabāšanas laikos MAFAM skaits staltbriežu gaļā pārsniedza pieļaujamo normu, t.i., 12 h laikā – par 23.9%, 24 h laikā – par 27.7%, bet 48 h laikā – par 37.1%.

Analizējot medījumu gaļas mikrobiālo piesārņojumu tās uzglabāšanas laikā, konstatējām, ka stirnu gaļā MAFAM daudzums visos uzglabāšanas laikos pie + 4 °C

un pie +8 °C atbilda pieļaujamai normai, ko varētu skaidrot ar mikroorganismu attīstībai slīktāku vidi, kas stirnu gaļai variēja no pH 5.79 pie 12 h līdz 5.47 pie 72 h. Citādāku sakarību novērojām staltbriežu gaļā, kad pieļaujamo normu MAFAM pārsniedz pie 72 h, kad pH bija 5.89 (augstāks nekā stirnu gaļai pie 12 h), tātad nodrošinot mikroorganismu attīstībai labvēlīgākus apstākļus ilgstošāku laika periodu. Ja gaļas pH vērtība tuvojas maksimāli ieteiktajam līmenim (no 5.6 līdz 6), tas veicina produktu kvalitātes pasliktināšanos un gaļas derīguma termiņa samazināšanos (Wiklund, Malmfors, 2004; Gill, 2007).

Izvērtējot mikroorganismu augšanas dinamiku starp pētāmo dzīvnieku sugām, konstatējām, ka vēsajās temperatūrās (t.i., +4 °C un +8 °C) MAFAM visstraujāk vairojas staltbriežu gaļā, bet +20 °C – stirnu gaļā.

Analizējot MAFAM izmaiņas, paraugus uzglabājot 24 h, jāatzīmē, ka mūsu iegūtie rezultāti ir būtiski augstāki par Atanassova et al., (2008) rezultātiem, saskaņā ar kuriem stirnu gaļā MAFAM sasniedza 2.9 lg kvv/ cm², bet staltbriežu gaļā – 2.6 lg kvv/cm², un būtiski zemāki par Deutz ar līdzautoriem (Deutz et al., 2006) iegūtajiem datiem (no 5.4 līdz 5.6 lg kvv/cm²).

Vispārzināms, ka *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismi ir gan dzīvnieku, gan cilvēku gremošanas trakta kolonizētāji (Nottingham, 1982; James et al., 2005; Lawrie, Ledward 2007), tapēc svarīgi bija izvērtēt šīs grupas baktēriju daudzumu medījumu gaļā kā fekālā piesārņojuma indikatoru.

Izvērtējot *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismu daudzuma vidējo vērtību izmaiņas stirnu gaļā, redzam, ka enterobaktēriju skaita pārsniegšanu pār pieļaujamo normu novēro, uzglabājot gaļu 24 h ilgi pie +8 °C, kā arī visā uzglabāšanas laikā pie +20 °C.

Uzglabājot stirnu gaļu +4 °C temperatūrā, redzam, ka būtisku ($p < 0.05$) enterobaktēriju skaita palielināšanos (2. tabula) novēro pie 48 h uzglabāšanas, turpretim būtisku ($p < 0.05$) enterobaktēriju skaita samazināšanos par 5% novēro pie 120 h uzglabāšanas. Enterobaktēriju, tāpat kā MAFAM, skaita samazināšanos novēro arī turpmākos uzglabāšanas periodos, t.i., pie 144 h par 2.8% un pie 168 h – par 3.2%.

Maksimālā pieļaujamā norma enterobaktēriju piesārņojumam stirnu gaļā, uzglabājot to +4 °C temperatūrā, netika pārsniegta pat pēc 72 h un pēc tam novērojām pakāpenisku iepriekšminēto mikroorganismu skaita samazināšanos.

Izvērtējot enterobaktēriju skaita vidējo vērtību izmaiņas stirnu gaļā pie +8 °C, redzam, ka būtisku ($p < 0.05$) rādītāja palielināšanos (skat. 2. tabula), tāpat kā MAFAM, novēro jau pie 24 h uzglabāšanas (par 22.1%), kā arī pie 72 h uzglabāšanas (par 17.6%). Jāpiezīmē, ka būtisku ($p < 0.05$) enterobaktēriju skaita samazināšanos stirnu gaļā pie +8 °C, tāpat kā pie +4 °C, novēro stirnu gaļu uzglabājot 120 h ilgi (par 6.2%, salīdzinot ar 96 h rādītāju). Tāpat kā MAFAM, enterobaktēriju skaita nebūtisku samazināšanos novēro arī turpmākos uzglabāšanas periodos, t.i., pie 144 h par 3.9%, salīdzinot ar 120 h rezultātu, un pie 168 h – par 1.6%, salīdzinot ar 144 h rezultātu.

Analizējot enterobaktēriju skaita atbilstību pieļaujamai normai, redzam, ka, uzglabājot stirnu gaļu pie +8 °C temperatūras ilgāk kā 24 h, tā tiek pārsniegta, turklāt, visaugstāko rādītāju sasniedzot (pārsniedz pieļaujamo normu par 21.2%), gaļu glabājot 72 h.

Kas attiecās uz enterobaktēriju skaita vērtību izmaiņām, uzglabājot stirnu gaļu +20 °C temperatūrā, tad jāsecina, ka gan 24 h, gan 48 h ilga uzglabāšana pie +20 °C rada *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismu (tāpat kā MAFAM) skaita būtisku ($p < 0.05$) pieaugumu, turklāt, gan 12, gan 24, gan 48 stundu ilga glabāšana iepriekšminētā temperatūrā jau rada enterobaktēriju skaita pieļaujamās normas pārsniegšanu stirnu gaļā attiecīgi par 18.8%, 26.1% un 41.4%.

Staltbriežu gaļā *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismu daudzuma rezultāti pārsniedz pieļaujamo normu. Uzglabājot staltbriežu gaļu pie +4 °C, redzam (skat. 1. tabula), ka vērojama enterobaktēriju skaita pieauguma tendence līdz pat 144 h ilgai uzglabāšanai, taču šis pieaugums mērījumu laikos savā starpā būtiski neatšķiras ($p > 0.05$). Visbūtiskākā īpatnība enterobaktēriju skaita dinamikas vērtējumā, uzglabājot staltbriežu gaļu +4 °C, ir tā, ka tikai pie 168 h ilgas uzglabāšanas vērojama ļoti strauja minēto mikroorganismu skaita samazināšanās par 26.3%, atšķirībā no stirnu gaļā notiekošās tendences, ka enterobaktēriju skaita samazināšanās, kaut arī nebūtiska ($p > 0.05$), vērojama jau pie 120 h.

Runājot par enterobaktēriju spēju vairoties +8 °C temperatūrā, redzam būtisku minēto mikroorganismu pieaugumus visos pētījuma laikos. Uzglabājot staltbriežu gaļu ilgāk par 72 h, vērojama enterobaktēriju skaita samazināšanās, kaut arī samazināšanās atšķirības turpmākos laika posmos savā starpā ir nebūtiskas ($p > 0.05$).

Analizējot enterobaktēriju vērtību izmaiņas, uzglabājot staltbriežu gaļu +20 °C temperatūrā, jāsecina, ka šeit vērojama ļoti būtisks ($p < 0.05$) minēto mikroorganismu (tāpat kā MAFAM gadījumā) skaita pieaugums visos pētāmajos uzglabāšanas laikos. Visos pētāmajos uzglabāšanas laikos MAFAM skaits staltbriežu gaļā būtiski pārsniedza pieļaujamo normu.

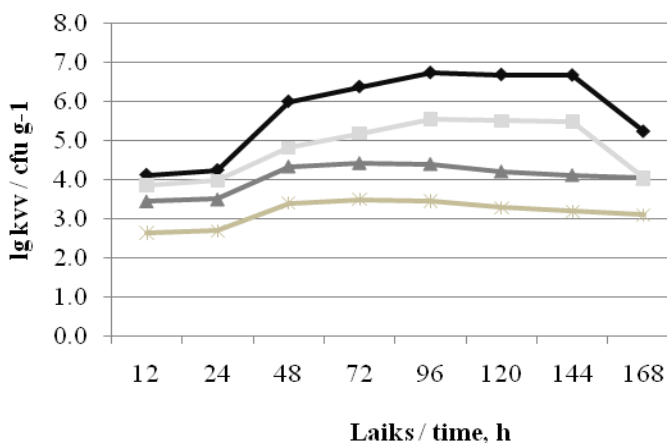
Izvērtējot *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismu daudzuma vidējo vērtību izmaiņas starp dzīvnieku sugām, konstatējām, ka stirnu gaļā pie +4 °C uzglabāšanas 12 h ilgi to līmenis ir 2.64 lg kvv/ g⁻¹, bet staltbriežu gaļā - 3.86 lg kvv/ g⁻¹. Arī Paulsen, Winkelmayer (2004) ieguva līdzīgus datus briežu gaļā, kas pārsniedza piesārņojuma pieļaujamās normas. Pēc citu zinātnieku (Atanassova et al., 2008) pētījumiem stirnu gaļā 12 līdz 24 stundas pēc nošaušanas *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismu piesārņojums variē no 1.7 – 2.6 lg kvv/ g⁻¹; bet staltbriežu gaļā no 1.7 līdz 2.8 lg kvv/ g⁻¹, kas ir būtiski zemāks par mūsu konstatēto.

Tātad enterobaktēriju pieļaujamais līmenis tika pārsniegts ātrākā laikā nekā MAFAM daudzums. Novērojumu varētu izskaidrot ar matemātiskās modelēšanas sakarību, kad pieļaujamo maksimālo enterobaktēriju līmeni (≤ 3.5 lg kvv g⁻¹) stirnu gaļā var sasniegt vidēji 50 – 52 stundās pie pH 5.95, bet staltbriežu gaļā – vidēji 30 stundās pie pH 6.0. Tā kā pētītajā stirnu gaļā augstākais pH (5.79) bija pie 12 h, kas ir zemāks kā nepieciešamais (5.95), tad arī neviens stirnu gaļas paraugs līdz 168 h ilgai uzglabāšanai pie +4 °C nepārsniedza pieļaujamo enterobaktēriju līmeni. Citādāka situācija ir ar pH staltbriežu gaļā. Ar modelēšanu pieļaujamais līmenis pH ir 6, taču tādu līmeni uzrādīja gaļas paraugi pie 60 h ilgas uzglabāšanas. Tātad – pieļaujamās 30 h varētu sasniegt, ja vien 12 h laikā staltbriežu paraugos esošais pH būtu 6 nevis

6.68, kas radīja ļoti labvēlīgu vidi baktēriju attīstībai, kā rezultātā 72 h jau pārsniedza pieļaujamo piesārņojuma normu.

Kas attiecas uz bakteriālā piesārņojuma atšķirībām abu pētāmo dzīvnieku gaļā, jāsecina, ka visos temperatūras režīmos un uzglabāšanas laikos staltbriežu gaļas paraugos mikrobioloģiskais piesārņojums (gan MAFAM, gan enterobaktērijas) ir lielāks, salīdzinot ar stirnu gaļas paraugiem, ko apstiprina arī citi zinātnieki (Deutz et al., 2000; Gill, 2007; Atanassova et al., 2008; García-Ruiz et al., 2010; Membré et al., 2011).

Izvērtējot pētījuma laikā iegūtās MAFAM un *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismu vidējās vērtības medījumu dzīvnieku gaļā **uzglabāšanas laikā** +4 °C temperatūrā (skat. 3.att.), varam konstatēt, ka kopumā mikroorganismu skaita būtisks pieaugums vērojams pie 48 h. Augstākais bakteriālā piesārņojuma rezultāts gaļā tiek sasniegts 96 stundās, tad līdz 144 h ilgai uzglabāšanai vērojama ļoti neliela mikroorganismu skaita samazināšanās, taču baktēriju skaita samazināšanās notiek, ja gaļu uzglabā ilgāk kā 144 h, turklāt, šis skaita samazināšanās process īpaši strauji notiek staltbriežu gaļā.



◆ MAFAM staltbriežu gaļā; / MAFAM in the red deer meat;

▲ MAFAM stirnu gaļā; /MAFAM in the roe deer meat;

■ *Enterobacteriaceae* staltbriežu gaļā; *Enterobacteriaceae* in the red deer meat;

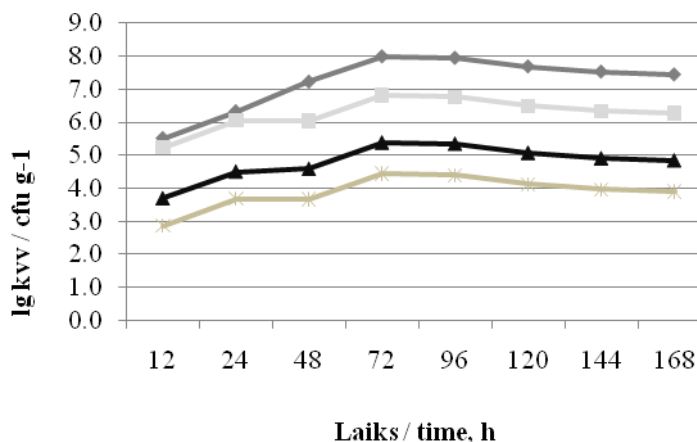
✱ *Enterobacteriaceae* stirnu gaļā; *Enterobacteriaceae* in the roe deer meat

3.att. MAFAM un enterobaktēriju augšanas līknes +4 °C temperatūrā uzglabātos medījumu dzīvnieku gaļas paraugos

Fig.3. Growing curves of MAFAM and Enterobacteriaceae in the meat samples of game animals stored at +4 °C

Vērtējot augstāko bakteriālā piesārņojuma rezultātu gaļā +8 °C temperatūrā, jāsecina, ka tas tiek sasniegts nevis 96 stundās (kā tas bija pie +4 °C uzglabāšanas), bet gan ātrāk, t.i., pie 72 h (skat. 4.att.). Būtiskāka baktēriju skaita samazināšanās notiek, ja gaļu uzglabā ilgāk kā 120 h, turklāt, šeit tendenci, ka straujāk mikroorganismu skaita samazināšanās process notiek staltbriežu gaļā, nenovēro.

Ja vēsākos turēšanas apstākļos gaļā pēc 24 h baktēriju augšanas kāpums ir neliels vai pat nenorīt nemaz, tad pie +20 °C – pēc 24 h glabāšanas vērojama ļoti strauja mikroorganismu savairošanās, un process norit līdzvērtīgi gan stirnu, gan staltbriežu gaļā.



- ◆ MAFAM staltbriežu gaļā; /MAFAM in the red deer meat;
- ▲ MAFAM stirnu gaļā; /MAFAM in the roe deer meat;
- Enterobacteriaceae staltbriežu gaļā; / Enterobacteriaceae in the red deer meat;
- × Enterobacteriaceae stirnu gaļā./ Enterobacteriaceae in the roe deer meat

4. att. MAFAM un enterobaktēriju augšanas liknes +8 °C temperatūrā uzglabātos medījumu dzīvnieku gaļas paraugos

Fig. 4. Growing curves of MAFAM and Enterobacteriaceae in the meat samples of game animals stored at +8 °C

Identificējot *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju sugas, konstatējām, ka gan stirnu, gan staltbriežu gaļā atrodas *Enterobacteriaceae* dzimtas nosacīti patogēnie mikroorganismi – *Enterobacter cloacae*, *Escherichia fergusonii*, *E. coli*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, *LNGNB* un *Pantoea agglomerans*. Interesanti, ka staltbriežu gaļā vēl papildus sastopama *Kluyvera cryocrescens*, taču stirnu gaļā – *Citrobacter freundii* un *Escherichia vulneris*.

Lai arī mums pieejamā literatūrā nebija iegūstami dati par citu pētnieku konstatētajām mikroorganismu sugām medījumu gaļā, tomēr kopumā zināms, ka visas

augstāk minētās baktēriju sugas ir oportūniskie patogēni ar optimālo augšanas temperatūru +37 °C un kas plaši izplatīti apkārtējā vidē – augsnē, notekūdeņos, uz augiem, dārzeniem, arī cilvēka un dzīvnieku fekālijās (Хоулт и. др., 1997; Weber, 2003).

Patogēnā *E.coli* O157:H7 serotipa identifikācija un virulences faktoru izvērtēšana staltbriežu gaļā

Kas attiecas uz *E.coli* O157:H7 serotipa izplatību mūsu pētītajos staltbriežu gaļas un *E.coli* tīrkultūru paraugos, tad jāsecina, ka pozitīvi bija 12.5% (t.i., 1 no 8) paraugi (viens staltbriežu gaļas un no tā izolētais *E.coli* tīrkultūras paraugs) (skat. 3. tab.), tādējādi uzskatām, ka patogēnā mikroorganisma izplatība pētītajā staltbriežu gaļā ir samērā augsta un apstiprina tās neatbilstību drošai izmantošanai pārtikā.

Kā apgalvo citi pētnieki, verotoksisko *E.coli* celmu procentuālā iespējamība ir daudz lielāka par mūsu konstatēto, pat no 30% līdz 70%, bet tas ir atkarīgs no analizētajiem virulences gēniem (Heuvelink et al., 1998; Meng et al., 1998; Barkocy-Gallagher et al., 2001; Chapman et al., 2001; Lahti et al., 2001; Rogerie et al., 2001; Keen, Elder, 2002; Nielsen, Scheutz, 2002; Omisakin et al., 2003).

3. tabula/Table3

No staltbriežu paraugiem iegūto *E.coli* patogenitātes rezultāti/ *Pathogenity results of the E.coli obtained from the red deer samples*

Gaļas parauga Nr., <i>Meat sample Nr.</i>	<i>E. coli</i>	<i>E.coli</i> O157:H7	VT1	VT2	<i>eaeA</i>
1	+	+	-	+	+
2	+	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-
5	+	-	-	-	-
6	+	-	-	+	-
7	+	-	-	-	-
8	+	-	-	-	-

Tā kā zinātnieki (Garcia-Sánchez et al., 2007; Bindu Kiranmayi et al., 2010) pierādījuši, ka staltbriežu dzimtas dzīvnieki ir *E.coli* O157:H7 dabiskais rezervuārs, tad uzskatām, ka mūsu pētījumā iekļauto dzīvnieku gaļas inficēšana notikusi liemeņu pirmapstrādes procesā, t.i., izņemot iekšējos orgānus no gremošanas trakta, nošautā dzīvnieka transportēšanas vai gaļas uzglabāšanas laikā.

Kopumā vērtējot pētāmo staltbriežu gaļas paraugu rezultātus, jāsecina, ka verotoksīna VT1 gēns netika konstatēts nevienā gaļas un no tās izolētajās *E.coli* tīrkultūras paraugā, taču verotoksīna VT2 gēnu atradām 25% jeb 2 paraugos, pie tam tikai vienā, kas uzrādīja atbilstību *E.coli* O157:H7 serotipam.

Kopumā ar molekulārām metodēm iegūtie rezultāti parādīja, ka *E.coli* patogenitāte ne vienmēr ir saistīta ar *E.coli* O157:H7 esamību, jo verotoksīna VT2 gēns ir atrodams arī paraugos, kuri uzrāda tikai pret *E.coli*, nevis pret *E.coli* O157:H7 pozitīvu rezultātu. Mūsu iegūtos rezultātus apstiprina citu pētnieku konstatētais, ka *E. coli* O157:H7 var ražot VT1vai VT2, vai abus toksīnus, un šie toksīni ir saistīti ar cilvēka saslimšanām (Mead, Griffin, 1998; Boerling et al., 1999; Philips, 1999).

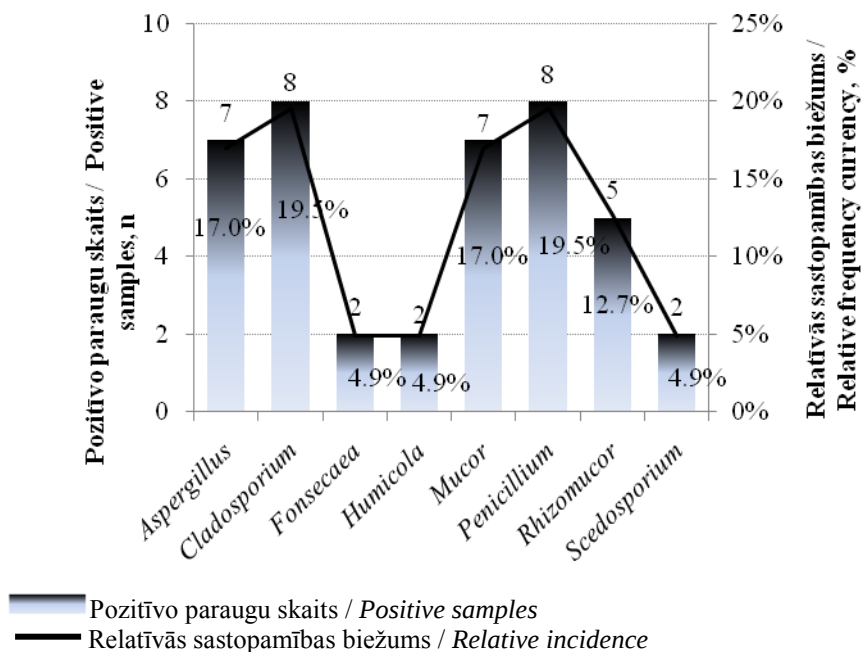
Kas attiecas uz *eaeA* gēna klātbūtni staltbriežu gaļā, tad to konstatējām tikai vienā paraugā un pie tam tajā, kur konstatējām *E.coli* O157:H7 ar VT2 gēnu, kas pēc citu pētnieku (Louie et al., 1993), uzskatiem liecina, ka mūsu pētījuma rezultātā 12.5% staltbriežu gaļas paraugos esošais *E. coli* ir virulets un inficētspējīgs mikroorganisms.

Lai arī zinātnieku pētījumi apstiprina, ka VT2 gēna klātbūtne ir saistīta ar *eaeA* gēna klātbūtni (Barkocy-Gallagher et al., 2001; Chapman et al., 2001; Omisakin et al., 2003), tomēr mēs VT2 gēnu konstatējām arī paraugā, kas neuzrādīja atbilstību *E.coli* O157:H7 serotipam. Tātad no iegūtajiem rezultātiem varam secināt, ka patogenitātes gēnu klātbūtne raksturīga ne tikai noteiktam *E.coli* serotipam, bet visai *E.coli* sugai kopumā.

Stirnu un staltbriežu gaļas mikoloģiskais piesārņojums

Veicot medījamo dzīvnieku liemeņu, kuri glabāti pie +4 °C 12 stundas, mikoloģisko izpēti, stirnu gaļā konstatējām 8 (skat. 5. att.), bet staltbriežu gaļā – 9 mikroskopisko sēņu ģintis (skat. 6. att.), kas liecina par to, ka mikroskopisko sēņu attīstību nav veicinājis gaļas pH (jeb gaļas dziļāko slāņu labvēlīga vide), bet gan liemeņa virsmas kontaminācija no apkārtējās vides. Pēc mūsu iegūtajiem gaļas pH rezultātiem, stirnu gaļā pH bija 5.78, kas mikroskopisko sēņu augšanai būtu optimālāks (Carter, Wise, 2004) par staltbriežu gaļas pH (6.68).

Kopumā no 30 stirnu gaļas paraugiem mikroskopiskās sēnes tika izdalītas 14 paraugos jeb 47% gadījumos. Stirnu gaļā konstatētais katras mikroskopisko sēņu ģints gadījumu skaits un to relatīvās sastopamības biežums redzams 5. attēlā.



5. att. **Konstatēto mikroskopisko sēņu ģinšu relatīvā sastopamība stirnu gaļā**

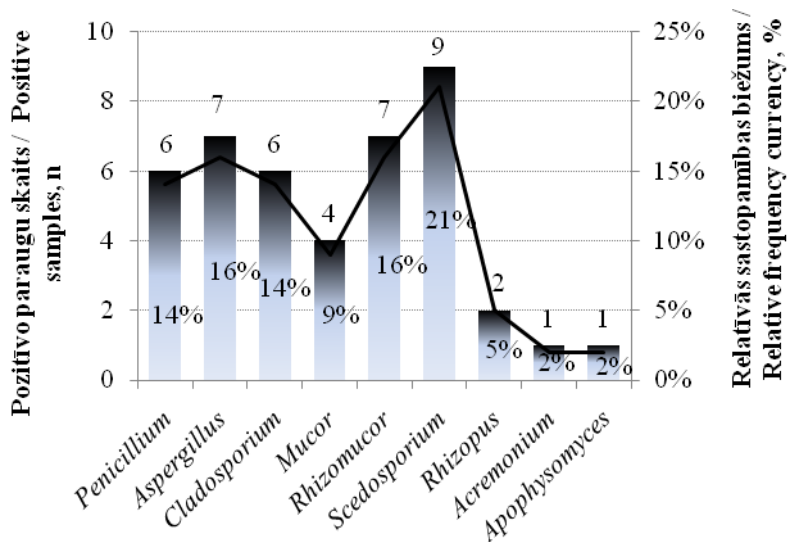
Fig. 5. Relative incidence of the detected genera of the microscopic fungi in the roe deer meat

Dominējošās mikroskopisko sēņu ģintis stirnu gaļā bija – *Penicillium* un *Cladosporium* – 57% paraugos, *Aspergillus* un *Mucor* – 50%, *Rhizomucor* – 36%, bet *Fonsecaea*, *Humicola* un *Scedosporium* – 14% paraugos.

Kopumā no 30 stirnu gaļas paraugiem mikroskopiskās sēnes tika izdalītas 14 paraugos jeb 47% gadījumos.

No kopējā stirnu gaļas paraugos (n = 30) konstatēto visu mikroskopisko sēņu gadījumu skaita (n = 41), ar vislielāko sastopamību izceļas *Cladosporium* un *Penicillium* (19.5% gadījumos), kā arī *Mucor* un *Aspergillus* (17%), taču vismazāko izplatību uzrāda *Fonsecaea*, *Humicola* un *Scedosporium* mikroskopisko sēņu ģintis (4.9% gadījumos).

Analizējot staltbriežu liemeņu piesārņojumu ar mikroskopiskām sēnēm, jāsecina, ka, atšķirībā no stirnu paraugiem, izdalījām 9 mikroskopisko sēņu ģintis (skat. 6. att.). Kopumā no 30 staltbriežu gaļas paraugiem mikroskopiskās sēnes tika izdalītas 15 paraugos jeb 50% gadījumos.



 Pozitīvo paraugu skaits / Positive samples
 Relatīvās sastopamības biežums / Relative incidence

6. att. Konstatēto mikroskopisko sēņu ģinšu relatīvā sastopamība staltbriežu gaļā
 Fig. 6. Relative incidence of the detected genera of the microscopic fungi in the red deer meat

Dominējošās mikroskopisko sēņu ģintis staltbriežu gaļā bija: *Scedosporium* – 60%, *Aspergillus* un *Rhizomucor* – 46%, *Cladosporium* un *Penicillium* – 40%, *Mucor* – 26%, *Rhizopus* – 13%, bet *Acremonium* un *Apophysomyces* visretāk, tikai – 7% gadījumos.

No kopējā staltbriežu gaļas paraugos (n=30) visu konstatēto mikroskopisko sēņu gadījumu skaita (n = 43), vislielāko sastopamību uzrāda *Scedosporium* (21% gadījumos), nedaudz mazāka izplatība ir *Aspergillus* un *Rhizomucor* mikroskopisko sēņu ģintīm (16%), bet visretāk gaļas paraugos konstatējām *Rhizopus* (5%) un *Acremonium*, *Apophysomyces* mikroskopisko sēņu ģintis (2% gadījumos).

Savā pētījumā konstatējām, ka stirnu gaļā par 24% biežāk nekā staltbriežu gaļā ir sastopama *Mucor* un par 13% – *Cladosporium* un *Penicillium* ģints mikroskopiskās sēnes, taču staltbriežu gaļā – par 46% biežāk sastopama *Scedosporium* un par 10% biežāk – *Rhizomucor* nekā stirnu gaļā. Tikai stirnu gaļā ir sastopamas *Fonsecaea* un *Humicola* ģintis mikroskopiskās sēnes, bet tikai staltbriežu gaļā – *Acremonium* un *Apophysomyces* mikroskopiskās sēnes.

Kopā no visiem pētījumā izmeklētajiem 60 medījamo dzīvnieku gaļas paraugiem visbiežāk (97% paraugos) izolējām *Cladosporium* un *Penicillium* ģints sēnes; *Aspergillus* – 96% paraugos, *Mucor* – 76% pozitīvajos paraugos.

Vērtējot mikroskopisko sēņu piesārņojuma līmeni medījamo dzīvnieku gaļā, ieguvām, ka stirnu gaļā vislielāko piesārņojuma līmeni uzrāda *Fonsecaea* (5.28 lg), *Mucor* (4.86 lg), *Cladosporium* (4.82 lg) un *Aspergillus* (4.81 lg) ģints sēnes, taču vismazāko piesārņojumu radījusi *Humicola* (3.81 lg) mikroskopiskās sēnes. Vērtējot mikroskopisko sēņu piesārņojuma līmeni staltbriežu gaļā, ieguvām, ka vislielāko piesārņojuma līmeni uzrāda *Mucor* (6.04 lg), pēc tam būtiski zemāku līmeni – *Acremonium* (5.23 lg), *Cladosporium* (5.05 lg) un aiz tām sekoja *Scedosporium* (4.67 lg) ģints mikroskopiskās sēnes. Vismazāko piesārņojumu radījusi *Penicillium* (3.58 lg) ģints mikroskopiskās sēnes.

Lai veiktu mikroskopisko sēņu piesārņojuma līmeņa salīdzinājumu medījamo dzīvnieku gaļā, redzams, ka izmeklētajos gaļas paraugos identificētais mikroskopisko sēņu piesārņojuma daudzums variēja relatīvi plašā apjomā, tādējādi pierādot, ka būtiskas atšķirības nepastāv nedz starp mikroskopisko sēņu atsevišķo ģinšu izplatību, nedz starp abu dzīvnieku sugu gaļā konstatēto mikroskopisko sēņu izplatību. Vidēji visaugstāko piesārņojumu uzrādīja *Mucor* ģints mikroskopiskās sēnes (6.04 lg), par 13% zemāku – *Fonsecaea* (5.28 lg) un par 14% – *Acremonium* (5.23 lg).

Tātad, mikroskopisko sēņu piesārņojuma daudzums variēja relatīvi plašā apjomā, kā rezultātā varam secināt, ka būtiskas atšķirības nepastāv starp mikroskopisko sēņu atsevišķo ģinšu izplatību stirnu un staltbriežu gaļā, ko pierāda izolētās mikroskopisko sēņu ģintis, kas ir plaši sastopamas apkārtējā vidē – augsnē, uz atmirušu organisku materiālu virsmas, gaisā (Carter et al., 2001).

Faktu, ka *Penicillium* un *Mucor* pārstāvjus konstatējām biežāk stirnu gaļā, var izskaidrot ar īpatnību, ka šīs grupas mikroskopiskās sēnes ir īpaši izvēlīgas pret zema pH un skābekļa klātbūtnes nepieciešamību (Dillon, 1998; Jay, 1998), kas vēlreiz apstiprina šo sēņu iespējamo nokļūšanu gaļā no apkārtējās vides kontaminācijas.

Cladosporium ģints sēnes samērā lielo izplatību medījumu gaļas paraugos var izskaidrot ar mikroskopisko sēņu spēju lēni augt pat +5 °C temperatūrā, tādēļ tā ir bieži sastopama arī citu zinātnieku ziņojumos (Carter, Wise, 2004; Asefa, Kure et al., 2010).

Tātad kopumā medījumu gaļā mūsu konstatētās mikroskopiskās sēnes pieder *Ascomycota* un *Zygomycota* sēņu grupām, kurām piemīt paaugstināta izturība pret apkārtējās vides temperatūras, mitrumu, pH izmaiņām un var eksistēt ar nelielu barības vielu daudzumu. To apstiprina arī virkne zinātnieku (Koburger, 1973; Venkitasubramanian, 1977; Munro et al., 1985; Myrvik, Weiser, 1988; Smith, Anderson, 1992; Ulloa, Hanlin, 2000; Hata et al., 2008; Asefa et al., 2009), norādot, ka lielākā daļa no izolētajām mikroskopiskajām sēnēm atrodas apkārtējā vidē.

SECINĀJUMI

1. Stirnu un staltbriežu gaļas pH līmenis 12 h pēc dzīvnieku nošaušanas ir atbilstoši 5.8 un 6.7. Staltbriežu gaļā pirmajās 36 h pH samazināšanās norit 3 reizes straujāk nekā stirnu gaļā.
2. MAFAM pieļaujamā norma tiek pārsniegta, uzglabājot stirnu gaļu pie +20 °C temperatūras ilgāk par 48 h, bet staltbriežu gaļu – pie +4 °C ilgāk par 72 h un pie +8 °C ilgāk par 24 stundām.
3. *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismu daudzuma pieļaujamās normas pārsniegšanu stirnu gaļā novēro pie +8 °C, uzglabājot to ilgāk par 24 stundām, bet staltbriežu gaļā – visās temperatūrās pētāmajos uzglabāšanas laikos.
4. MAFAM vidējais skaits staltbriežu gaļā, to uzglabājot +4 °C, ir par 29.5% un pie +8 °C – par 34% lielāks nekā tas ir stirnu gaļā.
5. *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismu vidējais skaits staltbriežu gaļā, to uzglabājot pie +4 °C, ir par 34.2% un pie +8 °C – par 38% lielāks nekā stirnu gaļā.
6. No staltbriežu gaļas izolētie *E.coli* 12.5% gadījumos (1 no 8) bija *E. coli* O157:H7 serotipa pozitīvi un uzrādīja verotoksīna VT2 kodējošā gēna un intimīna piesaistes gēna *eaeA* klātbūtni. VT1 gēns *E.coli* paraugos netika konstatēts.
7. Salīdzinot pelējumsēņu relatīvo sastopamību medījumu gaļā, visbiežāk stirnu gaļā konstatē *Cladosporium* un *Penicillium* 19.5% gadījumos), bet staltbriežu gaļā – *Scedosporium* ģints sēnes (21% gadījumos).

ZINĀTNISKĀS PUBLIKĀCIJAS UN TĒZES

1. Liepiņa S., Jemeljanovs A. (2013) IAFP European Symposium on Food Safety proceedings 15.–17. 05. 2013. in Marseille the Parc Chanot Convention Center. Abstract. „Mold Pollution on Fresh Red Deer (*Cervus Elaphus*) Meat in Latvia” p. 57.
2. Liepiņa S., Jemeljanovs A., Konošonoka I.H. (2012) Latvijā medījumu dzīvnieku gaļas mikrobiālais piesārņojums. Wild animals' meat pollution by microbial agents in Latvia. Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna: Konference Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes Veterinārmedicīnas raksti (Jelgava, Latvija 2012. gada 22. –23. novembrī) 82–87.
3. Liepiņa S., Jemeljanovs A. (2012) Detection of pathogenic *Escherichia coli* strains pollution in red deer meat in Latvia and determination the compatibility of VT1, VT2, *eaeA* genes in their isolate. Internacional Journal of Medical and Biological Sciences. Vol.6 p. 279 – 282.
4. Liepiņa S., Jemeljanovs A. (2012) Detection of pathogenic *Escherichia coli* strains pollution in red deer meat in Latvia and determination the compatibility of VT1, VT2, *eaeA* genes in their isolate. World Academy of Science, Engineering and Technology. – Vol. 65p. 340–343.
5. Liepiņa S., Jemeljanovs A. (2012) Microscopic Fungi on Fresh Meat Derived from Roe Deer (*Capreolus Capreolus*) and Red Deer (*Cervus Elaphus*) Proceedings of the Latvia University of Agriculture - London : Versita, Vol. 27. (1) p. 59–72.
6. Liepiņa S., Jemeljanovs A., Konošonoka I.H. (2010) „Mikrobiālā piesārņojuma pakāpes noteikšana savvaļas dzīvnieku (*Capreolus capreolus* un *Cervus elaphus*) gaļā. Microbiological pollution rate of wild animal (*Capreolus capreolus* and *Cervus elaphus*) meat. LLU Raksti, 25(320) p. 102–115.
7. Liepiņa S., Jemeljanovs A. (2011) „Potential microbiological contamination of meat in carcasses of roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*)”. Bridge over Europe 2. Starptautiskais pārtikas drošības, veterinārijas un dzīvnieku barošanas kongress: kongresa materiāli, Rīga, 22.-24.Sept., 2011 / East-West Veterinary Foundation. - Rīga, 2011. - 53 –54 lpp.
8. Liepiņa S., Jemeljanovs A. (2011) Prolonging Possibilities of Wild Animals' (*Capreolus Capreolus* and *Cervus Elaphus*) Meat Quality. Proceedings of the International conference. 6th International CIGR technical symposium "Towards a sustainable food chain: food process, bioprocessing and food quality management": proceedings, Nantes, France, 18th–20th April 2011 International Commission of Agricultural Engineering. - Nantes, 2011. p. 112–116.

9. Liepiņa S., Jemeljanovs A., Konošonoka I.H. (2010) Stirnu (*Capreolus capreolus*) un staltbriežu (*Cervus elaphus*) gaļas bakteriālā piesārņojuma noteikšana pielietojot dažādas mikrobioloģijas un molekulārās bioloģijas metodes. Detection of bacterial pollution of roe deer's (*Capreolus capreolus*) and red deer's (*Cervus elaphus*) meat using classical microbiological and molecular biology methods. Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna: Starptautiskās zinātniskās konferences raksti. (Jelgava, Latvija 2010.gada 29.oktobrī) 78 –81 lpp.
10. Liepina S., Jemeljanovs A. (2010) Wild animals' (*Cervus Elaphus*, *Capreolus Capreolus*) meat microbiological pollution. Proceedings of the International conference XIV International Symposium „Feed technology”. XII International Symposium „NODA 2010”, (Novi Sad, Serbia 19.10.–21.10. 2010), p. 55–62.
11. Vītiņa I., Krastiņa V., L.Proškina L., Lujāne B., Liepiņa S. (2010) Comparison of venison and beef quality. Baltic animal breeding XV conference, (Riga, Latvia 31.05.– 01.06. 2010), p. 147–150.

INTRODUCTION

Game meat is qualitative food appropriate for physiological processes of the human body with optimal content of protein, minerals and microelements and low content of fats and cholesterol. Although consumption of the game meat is not high comparing with domestic meat (pork, beef, poultry); however demand for it increases and obtaining of the game meat becomes a significant part of the food production. During the last years, number of the herds of farmed animals – farmed in the deer gardens - increased significantly. For obtaining the optimal meat quality, animal welfare condition should be followed in the deer farms. Depending on the type of deer farming farmers can obtain the production of different quality. For considering deers as animals farmed in the biological farming the territory should be large enough not to interfere with natural movement of the animals, there should be good pastures for feeding and additional feeding should be done. Developed survival instincts allow to exist the deers also in captive conditions. Comparing with the domestic animals wild animals are more sensitive to stress.

Obtaining of meat of wild animals involves hunting that is a complicated process during which animal shooting, pre-processing and transporting to the place of further processing of the animal carcass is done. Errors in shooting, transporting and processing of the animals results in meat contamination caused by aerobic and anaerobic microorganisms. As shown by the study (Adams, Moss, 2006), microorganisms and microscopic fungi are multiplying well on the surface of game meat. It is shown that mostly microorganisms of *Enterobacteriaceae* species is found in the game meat. It is indicated in the literature sources (Reinken et al., 1980; Hoffman, Wiklund, 2006) that the most dangerous contamination of the game occurs when the animal shot in its abdomen and continues to move: during the movement the pollution created by slug is spreading in the animal's body. Consumers can be infected from game meat, as well as domestic animal meat, by microorganisms causing food-borne infections (Prendergast et al., 2004). Therefore, for assessment of hygienic status of the game meat it is important to determine the count of mesophilic aerobes and facultative anaerobic (TCC) microorganisms and *Enterobacteriaceae* species. According to the studies of scientists (Carter, 1990a; Хоулти др., 1997), *Enterobacteriaceae* species involve 30 bacterial genera and more than 120 species several of which are found in the animal and human intestinal tract, as well as in the environment. During the last years, many studies (Rogerie et al., 2001; Keen, Elder, 2002; Nielsen, Scheutz, 2002; Omisakin et al., 2003; Aysun et al., 2006) have been devoted to the pathogenic serotypes of microorganisms if the *Escherichia* genera producing verotoxins (VT1, VT2), as well as containing intimin gene (*eaeA*) and contaminating game meat and causing dangerous human diseases.

Pollution of the game meat is also caused by microscopic fungi. Although most of the microscopic fungi are opportunistic, developing for longer time and in appropriate conditions they become hazardous to human and animal health. Microscopic fungi can cause also fat spoilage and produce the micotoxins (Diagnostic Procedures for Bacterial, Mycotic and Parasitic Infections, 1981). The studies of authors (Литвинов, 1967; Asefa et al., 2009; Asefa et al., 2010) shows that mostly the microscopic fungi of the *Ascomycota* and *Zygomycota* genera are isolated from the game meat which can suppress the protective factors of the organism's immunity, are resistant to the changes in ambient temperature, humidity and pH; furthermore they can maintain the viability in the environment with low amount of nutrients. The authors (Venkitasubramanian, 1977; Smith, Anderson, 1992; Ulloa, Hanlin, 2000; Asefa, 2009) emphasize that most of the microscopic fungi isolated from the game meat are found in the environment that serves as one of the pollution sources.

Objective and tasks of the study

Purpose of the promotion work is to find out and evaluate the degree of microbial and mycologic contamination of meat of roe deer (*Capreolus capreolus*) and farmed red deer (*Cervus elaphus*) during the obtaining process and storage at different temperature regimens.

The following **tasks** are set for reaching the work purpose:

1. Determine the microbial and mycologic contamination of the meat of roe deer and red deer, as well as the relationship between microbial contamination and meat pH;
2. Determine dynamics of the microbial contamination of the roe and red deer meat during storage at different temperature regimens;
3. Clear out the possible contamination by pathogenic serotype of *Escherichia coli*, as well as determine the presence of verotoxins VT1, VT2 and intimin binding gene *eaeA* in the red deer meat;
4. Clear out the intensity of incidence of microscopic fungi and contamination degree in roe and red deer meat.

Scientific novelty of the work

- Microbiological and mycological contamination of the meat of roe and red deer is determined and systematized for the first time in Latvia;
- Dynamic of the microbiological contamination of the game meat is determined in the certain time periods at different temperature regimens;
- Pathogenic serotype O157:H7 of the *E. coli* with verotoxin and intimin binding producing genes is isolated from the red deer meat and identified.

Approbation of the study results

The study results are approbated in the following international scientific conferences and seminars:

1. Liepiņa S., Jemeljanovs A. „Mold Pollution on Fresh Red Deer (*Cervus Elaphus*) Meat in Latvia”. IAFP European Symposium on Food Safety 15–17 May, 2013, Marseille, France.
2. Liepina S., Jemeljanovs A. “Wild animals’ meat pollution by microbial agents in Latvia”. Conference “Highlights of the veterinary medicine science and practice” 22–23 November, 2012, Jelgava, Latvia.
3. Liepina S., Jemeljanovs A. “Pathogenic *Escherichia coli* strains in red deer meat hunted in Latvia”. International scientific conference “Research for rural development” 18–20 May, 2012, Jelgava, Latvia.
4. Liepina S., Jemeljanovs A. „Detection of pathogenic *Escherichia coli* strains pollution in red deer meat in Latvia and determination the compatibility of VT1, VT2, *eaeA* genes in their isolate”. International conference on agricultural, biotechnology, biological and biosystems engineering. 13–14 May, 2012, Amsterdam, Netherlands.
5. Liepina S., Jemeljanovs A. “Moulds contaminants on fresh meat derived from roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*)”. International scientific conference “Research for rural development” 18–20 May, 2011, Jelgava, Latvia.
6. Liepina S., Jemeljanovs A. „Prolonging Possibilities of Wild Animals’ (*Capreolus capreolus* and *Cervus elaphus*) Meat Quality”. 6th International CIGR Technical Symposium: Towards a Sustainable Food Chain – Food Process, 18–20 April, 2011, Nantes, France.
7. Liepina S., Jemeljanovs A. “Wild Animals (*Capreolus capreolus*, *Cervus elaphus*) meat microbiological pollution in Latvia”. 12th International Meat Technology Symposium “Noda 2010”. Meat–technology, Quality and Safety. 19–21 October, 2010, Novi–Sad, Srbija.
8. Liepina S., Jemeljanovs A. Farmed deer (*Cervus elaphus*) meat microbiological pollution. 3rd Annual International Conference on Agriculture, 15–18 July, 2010, Athens, Greece.
9. Liepina S., Jemeljanovs A. Wild animals (*Capreolus capreolus* and *Cervus elaphus*) meat microbiological pollution. International scientific conference “Research for rural development” 18–20 May, 2010, Jelgava, Latvia.

Participation in other conferences and seminars for reporting of the promotion work results:

1. Liepina S., Jemeljanovs A., Konosonoka I.H., Strazdina V. "Possibilities of extending the qualitative shelf life of the meat of wild animals – roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*)". (gratitude) AAFSL General Meeting, 07.06.2012, Latvia University of Agriculture, Latvia.
2. Liepina S., Jemeljanovs A. "Possibilities of extending the qualitative shelf life of the meat of wild animals (*Capreolus capreolus* and *Cervus elaphus*). Joined section of the 3rd Congress of the World Latvian Scientists of the Latvian Academy of Sciences (LAS) "Agricultural and Forestry Sciences", 24–27. 10. 2011. Latvia University of Agriculture, Latvia.
3. Liepina S., Jemeljanovs A. „Potential microbiological contamination of meat in carcasses of roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*)". 2nd international food safety, veterinary and animal feeding congress „Congress "Bridge over Europe 2011", 24.09.2011. Riga, Latvia.
4. Liepina S., Jemeljanovs A. Report in the seminar of the Academy of Agricultural and Forestry Sciences (AAFS) (gratitude) "Studies on possible microbial pollution of the carcasses of roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*) during meat obtaining process. 15.09.2011. Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine "Siga" of the Agricultural University of Latvia.

Amount of the work: the promotion work is written on 109 pages and consists of annotation, introduction, literature review, work methodology, study results, discussion, conclusions, recommendations for the practice, references and annex.

MATERIALS AND METHODS

Time, place of the study and material description

The study was conducted from October, 2009 till August, 2012. Totally 30 samples of the animal meat were obtained during the hunting season for the study – i.e. 15 pooled samples of the meat of wild roe deer (*Capreolus capreolus*) in two hunting collectives October and 15 pooled samples of the meat of farmed red deer (*Cervus elaphus*) in two deer breeding farms November of the Vidzeme region: the samples were obtained by shooting animals for meat acquiring purpose in the specially designed corral.

During the postmortem veterinary-sanitary expertise of the carcasses and viscera, also the samples intended for the study were taken. According to the requirements of the standard LVS ISO 17604:2005 "Microbiology of the food and animal feed", the samples were taken for the microbiologic examinations within 12 hours after animal shooting.

For the study, the samples from the longissimus muscle (*m.longissimus lumborum*), biceps femoris muscle (*m.biceps femoris*) and triceps brachii muscle (*m.triceps brachii*) of the carcasses of roe deer and farmed red deer were taken (Brūveris, 2007) in such a way that the total weight of the pooled sample of all 3 muscles would be 0.250 kg.

Microbiologic examination of the game meat samples was done in the Biochemistry and Microbiology Research Laboratory accredited (LATAK–T–038–08–99) of the Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine "Sīgra" (hereafter, RI "Sīgra") of the Agricultural University of Latvia accredited (LATAK–T–038–08–99) by the National Accreditation Bureau.

Methodology of examinations of the meat microbial pollution was improved in the Faculty of the Livestock of the Swedish University of Agricultural Sciences; however the pathogenity of the isolated microorganism cultures was confirmed in the Molecular Biology Laboratory of the RI "Sīgra".

Study scheme

For each animal carcass selected for the study (i.e., 15 roe deer and 15 red deer), pH was measured in the muscle tissues storing the meat for 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h at + 4 °C.

General scheme of the study is showed in the (Figure 1).

To clear out the changes in pollution by mesophilic aerobic and facultative anaerobic (TCC) microorganisms, as well as organisms of *Enterobacteriaceae* species

(after 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 and 168 hours) in the game meat during its storage at +8 °C, as well as after 12, 24 and 48 h at +20 °C, totally 570 bacteriologic inoculants were done from 15 carcasses of the roe deer and 15 carcasses of the red deer.

Using molecular biology methods – polymerase chain reaction (PCR) and real time polymerase chain reaction (RT–PCR), *E. coli* identification was showed in eight *E.coli* pure cultures isolated from the pooled samples of the red deer meet by microbiologic methods. The presence of the pathogenic *E. coli* O151:H7 serotype also was investigated by molecular methods both in 8 *E.coli* pure cultures and red deer meet, as well as we also tested whether *E. coli* (in red deer meat and pure culture) contains toxins-producing VT1, VT2 and *eaeA* genes.

Analysis of the mycologic pollution of the game meat was also done for 30 pooled samples of roe deer meet and 30 pooled samples of red deer meet to find the presence of microscopic fungi when storing the meat at +4 °C for 12 h.

Methods used in the study

Determination of pH of the meat samples. pH in the samples of game meat was measured according to the standard LVS ISO 2917:2004 using a verified “JENWAY 3520 pH Meter”. In each carcass selected for the study, pH was measured at the left side by passing the electrode of pH–meter in the longissimus muscle (*m.longissimus lumborum*) at depth of 2–3.5 cm and at angle 70–90° relative to the longitudinal axis of the game carcass.

Bacteriologic examination of the meat. Total number of the viable cells was determined considering the investigational experience of the (Finegold, Martin, 1982; Difco, 1998; Forsythe, 2010), as well as according to the requirements of the standard LVS EN ISO 4833:2003. Preparation of the samples for microbiologic testing was performed according to the terms of the 2nd part of the standard LVS EN ISO 6887-2:2004. Number of TCC in the samples was determined according to the standard LVS EN ISO 4833:2003 “Microbiology of the food and animal feed. Horizontal method of the microorganisms counting.” Number of bacteria of the *Enterobacteriaceae* species was determined according to the standard LVS ISO 21528-2:2004. For determination of the *Enterobacteriaceae* species, MacConkey agar was used from which each colony selected for demonstration was inoculated on the feeding agar, incubated for 24 ± 1 h at +37 °C; colonies were stained according to the Gram method and their biochemical properties were detected: formation of oxydase and indole, citrate use, fermentation of glucose (methyl red test) and carbohydrates (Foges-Proskauer test).

The obtained results of biochemical properties were analyzed to chose for the determination of the bacterial pure culture up to the species using BBL Crystal blocks for identification of Gram-negative microorganisms (BBL Crystal E/NF, 245000) and compared with the reference pure culture of *E. coli* ATCC 25922.

Determination of the growing rate of microorganisms. The growing rate parameter of microorganisms was calculated at the beginning end of the observation by dividing the determined difference of the microorganisms count by the duration of the observation period (in hours or days); it was calculated using the formula proposed by the author (Стеле, 2008).

Molecular biology examination. For PCR, DNA was extracted from the selected samples following the manufacturer instructions and using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Measuring by the spectrophotometer NanoDrop (Applied Biosystems), the concentration and purity of the extracted DNA was tested. Sequencing reaction was done by using the commercial MicroSeq® 16S rDNA Bacterial Sequencing Kit (Applied Biosystems) and following the manufacturer instructions. 16S rRNS region was sequenced and the obtained result was compared with the database NCBI available in the internet.

Preparing of the PCR samples for sequencing. DNA was stored at -70°C . The commercial kit (Genekam Biotechnology AG) was used for the PCR reaction, amplification of the gene region of *E. coli* according to the manufacturer directions. Using the Profesional Gradient (Biometra, USA) amplificator, amplification of the *E. coli* verocytotoxin VT1 and VT2 genes and intimin gene *eaeA* was done according to the description (Verocytotoxigenic *Escherichia coli*, 2004). By RT-PCR, serotype *E.coli* O157:H7 of the *E.coli* pathogenic strain was identified using (PrimerDesignTM, Ltd).

Mycologic examinations were done according to the standart LVS ISO 21527 – 2:2008 (E).

For statistical processing of the data the method of two-factor analysis of variance ANOVA is used to compare the impact of the factors (temperature and storage time) on the performance sign –TCC and count of the microorganisms of *Enterobacteriaceae* species. The evaluated hypotheses were tested by the method of confidence interval and p-value, and factors were assessed as significant if $p < 0.05$. Mathematic programming package MathCad-14 was used for processing of the experimental data and determination of the relationships, but for graphic depiction of the obtained relationships the programming package MatLab-7 was used. For data processing, the method of two-factor nonlinear regression analysis was used.

STUDY RESULTS AND DISCUSSION

It is very important to follow the stringent hygiene requirements during obtaining, pre-processing, transporting and splitting the game meat. For evaluating it, we conducted the study that could help to find out the microbial and mycologic pollution of the game meat. pH parameters of the roe and red deer meat, total count of the viable microorganisms of the microbial pollution, as well as dynamics of the increase in microorganisms count in the fresh meat of game animals un during its further storage.

pH of the meat of wild roe deer (*Capreolus capreolus*) and farmed red deer (*Cervus elaphus*) and its changes

pH of the meat of wild roe deer and farmed red deer was analyzed storing the meat at +4 °C with 12 h interval, ie., 12, 24, 36, 48, 60, 72 hours after animal shooting. The obtained results showed that the decrease in pH for roe deer meat and red deer meat differs significantly during the storage. (Figure 2).

Mean pH in the samples of **roe deer** meat when storing them at +4 °C for 12 h was 5.8, whereas when storing for 72 hours pH decreases up to 5.47 or generally for 5.6% from the 12-hours value. As seen in the Fig. 2, the rapid decrease in the meat is observed at 24 h and 36 h storage; however no decrease was seen when storing the roe deer meat for 48 h (Table 1).

After evaluating the dynamics of changes in the pH value in the **red deer** meat we detect that the pH decreasing trends are similar to roe deer meat, but during the first 36 hours the process is three times faster (see Table 1).

Regarding the mean pH 5.78 found in the red deer meat, it should be concluded that its coincides with the observations of other authors (Atanassova et al., 2008; Daszkiewicz et al., 2009) are is characteristic for good meat quality since the value 5.5 – 5.8 is considered to be appropriate (Wiklund, Smulders, 2011). It could be explained by the fact that the roe deers were hunted in winter in conditions of lower stress and the animals were no physically exhausted.

Regarding our studied (obtained during the autumn months) pH of the red deer meat (ie., 6.68), it should be noted that it was 10% higher than that proposed by scientists. The authors (Wiklund et al., 2001) have found when studying pH of the red deer that it is variable. For example, pH of the meat obtained on December it is an average of 5.45, on March – 5.63, but in autumn – 5.61. Although pH in the musculature is more often about 5.5 (Pollard et al., (2002) – 5.54 to 5.60, Wiklund et al., (2001) – 5.71 and Wiklund et al., (2003) – 5.59 to 5.64), however pH of the red deer meat from 5.8 to 6.0 is considered to be appropriate (Stevenson-Barry et al., 1999; Mach et al., 2008).

Animal feeding status and physical condition has a considerable effect on the amount of muscular glycogen and hence also on the meat pH level (Wiklund et al., 1996; Wiklund et al., 2003). If red deers are fed by industrial feed mixture before shooting glycogen reserves in the muscles increases and therefore the pH level decreases rapidly after shooting (Wiklund et al., 2001; Wiklund et al., 2002).

Farmed red deer included in our study samples of which were obtained in October were in very good physical condition, furthermore the animals were additionally fed by grains therefore pH level in the red deer meat should be significantly lower than 6.68 obtained by us. It can be assumed that although animal owners take great care of farmed animals, however the inherited characteristics of the animals – to sense, suspect, fear–have created increased pre-slaughtering stress because pre-slaughtering stress is an important factor lowering the glycogen level (Brian McIntyre, 2006, Mach et al., 2008).

Regarding the pH decrease in the game meat when storing it for 24 h and 36 h, our detected pH decreases are consistent with the process of *rigor mortis* in the musculature appearing after 24–36 hours and disappearing after 72 hours (Wiklund et al., 2001; Wiklund et al., 2002). In stressed animals *rigor mortis* usually appeared quicker; it is connected with the more rapid decrease of glycogen level in the muscles (Taylor et al., 1995; James et al., 2005) therefore pH lowering in the musculature are not observed already at 48–hours storage both of roe deer and red deer meat.

Bacterial pollution of the game animal meat stored at different temperature regiments and for certain time and its dynamics

One of the work tasks were determination of the dynamics of microbial pollution of the farmed red deer meat during storage. When storing the meat longer than for 168 h, development of the decay process was observed therefore samples stored longer than for 168 h was not further included in the study for investigation of the processes occurring in the game meat.

The results of microbiological studies when storing the game meat at different temperature regiments and for different time period are showed in the (Table 2).

Because there are no directions on the allowable number of TCC and microorganisms of *Enterobacteriaceae* species in wild animal meat, we used the permitted of the authors (Membré et al., 2011) that says that the bacterial pollution in the game meat can be one logarithm higher than noted in the EU regulation No. 2073/2005 for beef, goat and horseflesh (pollution by the aerobic microorganisms in the ranges from 3.5 to 5.0 lg kvv g⁻¹, but for microorganisms of *Enterobacteriaceae* species – from 1.5 to 2.5 lg kvv g⁻¹).

The results obtained in our study (see Table 2) showed that when storing roe deer meat up to 168 h at +4 °C and at +8 °C the mean values of the total bacterial pollution were in the allowable ranges of normal; however we observed that at +4 °C the number of TCC, when storing the meat for 168 h, increased for 11.4% comparing

with the TCC value at 12–hours storage time but +8 °C – for par 23.6% comparing with the 12–hours rate.

Evaluating the change in mean TCC values in the roe deer meat at +4 °C we see that the significant ($p<0.05$) increase (see Table 2) is observed at 48–hours storing (19.2% more comparing with the 24–hours rate), whereas the significant ($p<0.05$) decrease in the count of microorganisms is observed after 120–hours storage. TCC decrease is observed also in further storage periods, i.e., at 144 h for 2.2% and at 168 h–for 2%.

Regarding the changes in mean TCC values in the roe deer meat at +8 °C we see that the significant ($p<0.05$) increase for 18% is observed already at 24–hours storage comparing with with 12–hours rate, as well as at 72–hours storage (for 14.8% comparing with 48–hours rate). It should be noted that the significant ($p<0.05$) decrease in the count of microorganisms, like at +4 °C, is observed when storing the meat for 120 h. Little decrease in TCC is observed also in the further storage periods, i.e., at 144 h for 3.4% and at 168 h–for 1.3%.

Significantly different are changes of the TCC pollution when storing roe deer meat at +20 °C comparing with the dynamics of bacterial count when storing the meat at +4 °C and +8 °C. As seen in the Table 2, both storing for 24 h and for 48 h at +20 °C results in the significant ($p<0.05$) increase of the TCC, furthermore, storage for 48 hours at the aforementioned temperature already resulted in exceeding of the recommended norm of TCC in the roe deer meat for 13.2%.

When analyzing the changes in mean TCC value in the red deer meat, we can see in the Table 2 that only in 21% of cases the meat met the permitted norms. When storing the red deer meat at +4 °C, we see (Table 2) that storage for 48 h results in the significant ($p<0.05$) increase in TCC count, i.e., for 22.8% comparing with result after 24 h. Controversially, when assessing the decrease of bacterial pollution, it can be concluded that unlike that observed in the roe deer meat TCC in the red deer meat decreases significantly ($p<0.05$) (for 21.6%) when the meat is stored at +4 °C only after 168 h comparing with result at 144 h.

Regarding the changes in the mean TCC values in the red deer meat at +8 °C, we can see that after storage for 24 h TCC count increases significantly ($p<0.05$) and exceeds the permitted norm. The biggest increase in the microorganisms count is observed after 72 h, i.e., because it increases for 9.7% comparing with the 48–hours result. Controversially, opposite to the changes in value of bacterial count when storing the red deer meat at +4 °C, as well as roe deer meat when storing it at lower temperatures, in the red deer meat the little decrease in the TCC is observed indeed after 120–hours storage; however it is insignificant ($p>0.05$).

When analyzing the changes in TCC count values after storing the red deer meat at +20 °C, it should be concluded that there is a significant ($p<0.05$) increase in the microbial count at all investigated storage times; at 48 h the TCC count increased even 13.2% comparing with 24–hours result. In all storage times TCC count in the red deer meat exceeded the permitted norm, i.e., within 24 h–for 23.9%, within 24 h–for 27.7%, and within 48 h–for 37.1%.

When analyzing the microbial pollution of the meat during its storage, we found that TCC count in the roe deer meat at all storage times at +4 °C and at +8 °C corresponded to the permitted norm that could be explained by the environment worse for microorganisms development; for roe deer meat it is the environment with pH from 5.79 at 12 h to 5.47 at 72 h. We observed a different relationship for red deer meat when TCC exceeded the permitted norm at 73 h when pH was 5.89 (higher than for roe deer meat at 12 h), thus providing more benefit conditions for the microorganisms development for longer period. If the pH level of the meat is close to the maximal permitted level (from 5.6 to 6) it contributes to worsening of the product quality and reduction of the meat shelf-life (Wiklund, Malmfors, 2004; Gill, 2007).

Assessing the dynamics of the microorganisms growing between the studied animal species, we detected that at low temperatures (i.e., +4 °C and +8 °C) TCC are multiplying most rapidly in the red deer meat, whereas at +20 °C – in the roe deer meat.

When analyzing TCC changes storing the samples for 24 h, it should be noted that our obtained results are significantly higher than the results of Atanassova et al. (2008) according to which TCC in the roe deer meat reached 2.9 lg kvv/cm², but in red deer meat – 2.6 lg kvv/cm², and significantly lower than data obtained Deutz et al. (2006) (from 5.4 to 5.6 lg kvv/cm²).

It is well known that the microorganisms of *Enterobacteriaceae* species are both colonizers of human and animal gastrointestinal tract (Nottingham, 1982; James et al., 2005; Lawrie, Ledward 2007) therefore it is important to evaluate the number of bacteria of this group in the game meat as the indicator of fecal pollution.

When assessing the changes of the mean values of count of microorganisms of *Enterobacteriaceae* species in roe deer, we can see that exceeding of the allowable norm of the *Enterobacteriaceae* count is observed when storing the meat for 24 h at +8 °C, as well as all storage duration time at +20 °C.

Storing the roe deer meat at +4 °C temperature, we can see that significant ($p < 0.05$) increase of the *Enterobacteriaceae* count (Table 2) is observed at 48–hours storage, whereas significant ($p < 0.05$) decrease of the *Enterobacteriaceae* count for 5% is observed at 120–hours storage. Decrease of the *Enterobacteriaceae*, as well as TCC was seen also in further storage periods, i.e. at 144 h for 2.8% and at 168 h – for 3.2%.

Maximal allowable norm of the *Enterobacteriaceae* pollution in the roe deer meat when stored at +4 °C was not exceeded even after 72 h and after that we observed gradual decrease of the count of aforementioned microorganisms.

When assessing the changes of the mean values of *Enterobacteriaceae* count in the roe deer meat at +8 °C, we can see that significant ($p < 0.05$) increase of the value (see Table 2) like for TCC, is observed already after 24 hours storage (for 22.1%), as well as at 72–hours storage (for 17.6%). It should be noted that significant ($p < 0.05$) decrease of the *Enterobacteriaceae* count in the roe deer meat at +8 °C, as well as at +4 °C is observed when the roe deer meat is stored for 120 h (for 6.2% comparing with 96–hours rate). Like for TCC, insignificant decrease in the *Enterobacteriaceae* count is observed also in the further storage periods, i.e., after 144 h for 3.9%

comparing with 120–hours result, and at 168 h - for 1.6% comparing with 144–hours result.

Analyzing the conformity of the *Enterobacteriaceae* count to the permitted norm, we can see that when storing the roe deer meat at +8 °C for more than 24 h it is not exceeded, furthermore, the highest rate is reached (exceeds the permitted norm for 21.2%) when storing the meat for 72 h.

Regarding the changes of *Enterobacteriaceae* count when storing the roe deer meat at +20 °C, it should be concluded that both storage for 24 h and 48 h at +20 °C results in the significant ($p < 0.05$) increase of the count of microorganisms of *Enterobacteriaceae* (as well as TCC); furthermore, both storage for 12, 24 and 48 hours at the aforementioned temperatures already results in exceeding of the permitted norm for *Enterobacteriaceae* count in the roe deer meat for 18.8%, 26.1% and 41.4%, respectively.

Results of the count of microorganisms of *Enterobacteriaceae* species in the red deer meat exceed the permitted norm. We can see when storing the red deer meat at +4 °C (see Table 2) that trend to increasing *Enterobacteriaceae* count is observed for up to 144–hours storage; however this increases in the measurement times differs insignificantly ($p > 0.05$) between each other. The most important characteristic of the assessment of dynamics of *Enterobacteriaceae* count when storing the red deer meat at +4 °C is the following: only after 168 h storage very rapid decrease of aforementioned microorganisms count is observed for 26.3% unlike the trend for roe deer meat when the decrease of *Enterobacteriaceae* count, although insignificant ($p > 0.05$) is observed already after 120 h.

If talking about the ability of *Enterobacteriaceae* to multiply +8 °C, we can see a significant increase of the count of mentioned microorganisms at every study time. When storing the red deer meat for more than 72 h, the decrease in the *Enterobacteriaceae* count is observed; however differences of the decrease in the further time periods are insignificant ($p > 0.05$).

When analyzing the changes of *Enterobacteriaceae* values storing the red deer meat at +20 °C, it should be concluded that there is a significant ($p < 0.05$) increase of the count of aforementioned microorganisms (like in the case of TCC) at all studied storage times. At all storage times, the TCC in the red deer meat significantly exceeded the permitted norm.

When assessing the changes of the mean values of *Enterobacteriaceae* count between the animals species, we found that in roe deer meat at +4 °C when storing it for 12 h it was 2.64 lg kvv/ g⁻¹, but in the red deer meat – 3.86 lg kvv/ g⁻¹. Also Paulsen, Winkelmayer (2004) obtained similar results for deer meat that exceeded the permitted pollution norms. According to the studies of other scientists (Atanassova et al., 2008), the pollution by the microorganisms of *Enterobacteriaceae* species in the roe deer meat 12 to 24 hours after shooting varies from 1.7 to 2.6 lg kvv/ g⁻¹; but in red deer meat – from 1.7 to 2.8 lg kvv/ g⁻¹ that is significantly lower than that detected by us.

Thus the permitted level of *Enterobacteriaceae* is exceeded faster than the TCC. This observation could be explained by the mathematic modeling coincidence when the permitted maximal *Enterobacteriaceae* count (≤ 3.5 lg kvv g⁻¹) count in the

roe deer meat can be reached on average within 50 – 52 hours at pH 5.95, whereas in the red deer meat – on average within 30 hours at pH 6.0. Since the highest pH (5.79) of the roe deer was observed at 12 h that is lower than the necessary one (5.95), no sample of the roe deer stored for up to 168 h at +4 °C did not exceed the allowable *Enterobacteriaceae* level. There is a different situation with pH of the red deer meat. pH permitted by modeling is 6; however such level was observed in the meat samples after 60 h of storage. Thus the permitted 30 h could be reached if only pH of the red deer samples within 12 h would be 6 instead of 6.68 that creates very favorable environment for bacterial development resulting in exceed of the permitted pollution norm already within 72 hours.

Regarding the differences of bacterial pollution in both studies animal meat, it should be concluded that in all temperature regiments and at all storage times the microbiologic pollution of the red deer meat (both TCC and *Enterobacteriaceae*) is higher comparing with the samples of roe deer meat that is approved by other scientists (Deutz et al., 2000; Gill, 2007; Atanassova et al., 2008; García-Ruiz et al., 2010; Membré et al., 2011).

When assessing the **mean microorganisms values** of TCC and *Enterobacteriaceae* obtained during the study in the game animal meat **during storage** at +4 °C (see Fig.3.), it can be concluded that generally significant increase in the microorganisms count is observed at 48 h. The highest result of the bacterial pollution in the meat is reached within 96 hours, then up to the 144–hours storage very small decrease of the microorganisms count is observed, but decrease of the bacterial count occurs if the meat is stored longer than for 144 h, furthermore, this decrease develop especially quickly in the red deer meat. (Figure 3).

The highest result of the bacterial pollution in the meat stored at +8 °C is reached not within 96 hours (as when storing the meat at +4 °C) but faster – within 72 h (see Fig.4). The most significant decrease of the bacterial count occurs if the meat is stored longer than for 120 h; furthermore, the trend that this process is quicker in the red deer meat is not observed. (Figure 4).

Diverse trend in the dynamics of microorganisms growing is seen at +20 °C because, while very small or no increase of the bacterial growing in the cooler storage conditions for 24 h occurs, at +20 °C after 24–hours storage very rapid multiplying of the microorganisms. The process is similar both in roe deer and red deer meat.

We detected when identifying the bacteria of *Enterobacteriaceae* species that opportunistic microorganisms of the *Enterobacteriaceae* species – *Enterobacter cloacae*, *Escherichia fergusonii*, *E. coli*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella pneumoniae*, LNCNB and *Pantoea agglomerans* are found in the red deer meat. It is interesting that in the red deer meat also *Kluyvera cryocrescens* is found, whereas in the roe deer meat – *Citrobacter freundii* and *Escherichia vulneris*.

Although we could not obtain any data in the literature available for us on the microorganisms species found in the game meat by other investigators, however it is well known that all aforementioned bacterial species are opportunistic pathogens with

optimal growing temperature +37 °C, and they are particularly common in environment – soil, wastewater, on plants, vegetables, as well as in human and animal feces (Hoult et al., 1997; Weber, 2003).

Identification of the pathogenic *E.coli* O157:H7 serotype and assessment of the virulence factors in the red deer meat

Regarding the distribution of *E.coli* O157:H7 serotype in the samples of red deer meat and *E.coli* pure cultures investigated by us, we should conclude that positive were 12.5% of samples (i.e., 1 sample of red deer meat and the sample of *E.coli* pure culture isolated from it) (see Table 3), therefore we think that distribution of the pathogenic microorganism is quite high in the red deer meat and approves its non-compliance for using as food.

According to the averments of other investigators, the percentage possibility is much more higher than that detected by us, even for 30% to 70%, but it depends on the analyzed virulence genes (Heuvelink et al., 1998; Meng et al., 1998; Barkocy-Gallagher et al., 2001; Chapman et al., 2001; Lahti et al., 2001; Rogerie et al., 2001; Keen, Elder, 2002; Nielsen, Scheutz, 2002; Omisakin et al., 2003). (Table 3).

Since the scientists (Garcia-Sánchez et al., 2007; Bindu Kiranmayi et al., 2010) have showed that the animals of red deer family is a natural reservoir of the *E.coli* O157:H7 we believe that infecting of the meat of animals included in our study have occurred during the pre-processing of carcasses, i.e., during evisceration, transporting of the shot animal or during storage of the meat.

Generally when evaluating the results of the investigational samples of the roe deer, it should be concluded that verotoxin VT1 gene was not found in any sample of meat and pure culture of *E.coli* isolated from it; however verotoxin VT2 gene was detected in 25% or 2 samples, and only in one sample that correspond to the *E.coli* O157:H7 serotype.

Generally the results obtained by molecular methods showed that *E.coli* pathogenity is not always connected with the presence of *E.coli* O157:H7 because verotoxin VT2 gene is found also in the samples showing only *E.coli*-positive result instead of *E.coli* O157:H7-positive result. The results obtained by us are confirmed by the finding of other investigators – saying that *E. coli* O157:H7 can produce VT1 or VT2, or both toxins and they are associated with human diseases (Mead, Griffin, 1998; Boerling et al., 1999; Philips, 1999).

Regarding the presence of *eaeA* gene in the red deer meat, we detect it only in one sample and in that sample where we found the *E.coli* O157:H7 ar VT2 gene that indicates according to the opinion of other investigators (Louie et al., 1993) that in the result of our study 12.5% *E. coli* found in the samples of red deer meat is virulent and infecting microorganism.

Although the studies of investigators confirm that the presence of VT2 gene is associated with the presence of *eaeA* gene (Barkocy-Gallagher et al., 2001; Chapman

et al., 2001; Omisakin et al., 2003), however we found the VT2 gene also in the sample that did not showed compliance *E.coli* O157:H7 serotype. Thus according to the obtained results we can conclude that the presence of pathogenity genes is characteristic not only for certain *E.coli* serotype but for all *E.coli* species generally.

Mycologic pollution of the roe deer and red deer meat

When performing the mycologic research of carcasses of the game animals stored at +4 °C for 12 hours, we found 8 genera of the microscopic fungi in the roe deer meat (Fig.5), and 9 – in the red deer meat bet (see Fig. 6) indicating that the development of the microscopic fungi has not been promoted by the meat pH (or favorable environment of the deeper layers of the meat) but the contamination of the carcass surface from environment. According to the pH results obtained by us, pH of the roe deer meat was 5.78 that would be more optimal for growing of microscopic fungi (Carter, Wise, 2004) than pH of the red deer meat (6.68).

Totally from 30 samples of the roe deer meat microscopic fungi were extracted from 14 samples or in 47% of cases. Number of cases of each genus of the microscopic fungi detected in the roe deer meat and their relative incidence is seen in the (Figure 5).

Dominating genera of the microscopic fungi were the following: *Penicillium* and *Cladosporium* in 57% samples, *Aspergillus* and *Mucor* – 50%, *Rhizomucor* – 36%, whereas *Fonsecaea*, *Humicola* and *Scedosporium* in 14% samples.

Totally from 30 samples of the roe deer meat microscopic fungi were extracted from 14 samples or in 47% of cases.

Among the total number of cases of the microscopic fungi (n=41) found in the samples of roe deer meat (n=30) the most common were *Cladosporium* and *Penicillium* (19.5% cases), as well as *Mucor* and *Aspergillus* (17%), whereas the least common were microscopic fungi of the genera *Fonseceaea*, *Humicola* and *Scedosporium* (4.9% cases)

When analyzing the pollution of the red deer carcasses with microscopic fungi, it should be concluded that, unlike the roe deer samples, we extracted 9 genera of the microscopic fungi (see Fig. 6). Totally from 30 samples of the red deer meat microscopic fungi were extracted from 15 samples or in 50% of cases. (Figure 6).

Dominating genera of the microscopic fungi were the following: *Scedosporium* – 60%, *Aspergillus* and *Rhizomucor* – 46%, *Cladosporium* and *Penicillium* – 40%, *Mucor* – 26%, *Rhizopus* – 13%, whereas *Acremonium* and *Apophysomyces* were the least common, found only in 7% cases.

Among the total number of cases of the microscopic fungi (n=43) found in the samples of red deer meat (n=30) the most common were *Scedosporium* (21% cases), slightly less common were genera of the microscopic fungi *Aspergillus* and *Rhizomucor* (16%), whereas the least commonly found genera of the microscopic fungi were *Rhizopus* (5%) and *Acremonium*, *Apophysomyces* (2% cases).

We detected in our study that *Mucor* is presented in the roe deer meat for 24% more frequently than in the red deer meat, whereas microscopic fungi of the genera *Cladosporium* and *Penicillium* for 13% more frequently, but *Scedosporium* is found in the red deer meat for 46% and *Rhizomucor* for 10% commonly than in roe deer meat. Microscopic fungi of the genera *Fonsecaea* and *Humicola* were found only in the roe deer meat, whereas *Acremonium* and *Apophysomyces* microscopic fungi – only in red deer meat.

Totally from all 60 samples of the game meat investigated in the study we isolated fungi of the genera *Cladosporium* and *Penicillium* more (in 97% samples); *Aspergillus* – in 96% samples, *Mucor* – in 76% positive samples.

When assessing the level of microscopic fungal pollution in the game animal meat, we found that in roe deer meat the highest pollution level is showed by fungi of the genera *Fonsecaea* (5.28 lg), *Mucor* (4.86 lg), *Cladosporium* (4.82 lg) and *Aspergillus* (4.81 lg), whereas the lowest pollution is created by microscopic fungi of the genus *Humicola* (3.81 lg). When assessing the level of microscopic fungal pollution in the red deer meat, we found that the highest pollution level is showed by fungi of the genus *Mucor* (6.04 lg), then the significantly lower level is created by *Acremonium* (5.23 lg), *Cladosporium* (5.05 lg) following by the microscopic fungi of the genus *Scedosporium* (4.67 lg). the lowest pollution is created by microscopic fungi of the genus *Penicillium* (3.58 lg).

Comparing the level of microscopic fungal pollution in the game animal meat, we can see that the level of microscopic fungal pollution identified in the meat samples varied at relatively high degree thus showing that there are no significant difference neither between distribution of the separate genera of the microscopic fungi nor between the genera of the microscopic fungi found in both animal species. The highest pollution in average was showed by the genera of microscopic fungi *Mucor* (6.04 lg), lower for 13% – *Fonsecaea* (5.28 lg) and for 14% – *Acremonium* (5.23 lg).

Thus, the level of microscopic fungal pollution varied in relative high degree so we can conclude that there is no significant difference between the distribution of the genera of microscopic fungi in roe and red deer meat that is showed by the isolated genera of microscopic fungi found widely in the environment – in soil, on the surface of dead organic materials and in air (Catton et al., 2001).

We can explain the fact that *Penicillium* and *Mucor* fungi are found more frequently in the roe deer meat with the characteristics of the group of these microscopic fungi – they are extremely finicky against low pH and necessity for oxygen presence (Dillon, 1998; Jay, 1998) that again approves the possible incurrence of these fungi in the meat from the environmental contamination.

Relatively high incidence of the fungal genus *Cladosporium* in the game meat samples can be explained by the ability of these fungi to grow even at +5 °C temperature therefore they are commonly found also in the reports of other scientists (Carter, Wise, 2004; Asefa, Kure et al., 2010).

So generally the microscopic fungi detected in the game meat by us belong to the fungal groups *Ascomycota* and *Zygomycota* which have the increased resistance against the changes in ambient temperature, humidity, pH, and can exist with a little

amount of nutrients. It is confirmed also by many scientists (Koburger, 1973; Venkitasubramanian, 1977; Munro et al., 1985; Myrvik, Weiser, 1988; Smith, Anderson, 1992; Ulloa, Hanlin, 2000; Hata et al., 2008; Asefa et al., 2009) indicating that, the most of isolated microscopic fungi are found in environment.

CONCLUSIONS

1. pH level of the roe and red deer meat 12 h after the animal shooting is 5.8 and 6.7, respectively. In red deer meat, pH decrease occurs 3 times faster than in the roe deer meat within the first 36 h.
2. Exceeding of the TTC permitted norm is observed when storing the roe deer meat at +20 °C for longer than 48 h, but in red deer meat – at +4 °C longer than for 72 h and at +8 °C longer than for 24 hours.
3. Exceeding of the permitted norm for the microorganisms of *Enterobacteriaceae* species is observed in the roe deer meat at +8 °C when storing the meat for more than 24 hours, and in red deer meat – at all temperatures in all studied times.
4. The mean count of TTC in red deer meat at a storage temperature of +4 °C was 29.5% higher and at +8 °C – 34% higher than that found in roe deer meat.
5. The mean count of *Enterobacteriaceae* species in red deer meat at a storage temperature of +4 °C was 34.2% higher and at +8 °C – 38% higher than that found in roe deer meat.
6. *E.coli* isolated from the red deer meat were *E. coli* O157:H7–serotype positive in 12.5% cases (1–8) and showed the presence of verotoxin VT2 encoding gene and intimin binding *eaeA* gene. VT1 gene was not found in the *E.coli* samples.
7. When comparing with the relative incidence of microscopic fungi in the game meat, the most frequently *Cladosporium* and *Penicillium* (19.5% cases) were found in the roe deer meat, however in red deer meat – microscopic fungi of the genus *Scedosporium* (21% cases).

SCIENTIFIC PUBLICATIONS AND THESES

1. Liepiņa S., Jemeljanovs A. (2013) IAFP European Symposium on Food Safety proceedings 15.–17. 05. 2013. in Marseille the Parc Chanot Convention Center. Abstract. „Mold Pollution on Fresh Red Deer (*Cervus Elaphus*) Meat in Latvia” p. 57.
2. Liepiņa S., Jemeljanovs A., Konošonoka I.H. (2012) Latvijā medījumu dzīvnieku gaļas mikrobiālais piesārņojums. Wild animals' meat pollution by microbial agents in Latvia. Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna: Konfernce Veterinārmedicīnas zinātnes un prakses aktualitātes Veterinārmedicīnas raksti (Jelgava, Latvija 2012. gada 22. –23. novembrī) 82–87 lpp.
3. Liepina S., Jemeljanovs A. (2012) Detection of pathogenic *Escherichia coli* strains pollution in red deer meat in Latvia and determination the compatibility of VT1, VT2, *eaeA* genes in their isolate. Internaciona Journal of Medical and Biological Sciences. Vol.6 p. 279 – 282.
4. Liepina S., Jemeljanovs A. (2012) Detection of pathogenic *Escherichia coli* strains pollution in red deer meat in Latvia and determination the compatibility of VT1, VT2, *eaeA* genes in their isolate. World Academy of Science, Engineering and Technology. – Vol. 65p. 340–343.
5. Liepiņa S., Jemeljanovs A. (2012) Microscopic Fungi on Fresh Meat Derived from Roe Deer (*Capreolus Capreolus*) and Red Deer (*Cervus Elaphus*) Proceedings of the Latvia University of Agriculture - London : Versita, Vol. 27. (1) p. 59–72.
6. Liepiņa S., Jemeljanovs A., Konošonoka I.H. (2010) „Mikrobiālā piesārņojuma pakāpes noteikšana savvaļas dzīvnieku (*Capreolus capreolus* un *Cervus elaphus*) gaļā. Microbiological pollution rate of wild animal (*Capreolus capreolus* and *Cervus elaphus*) meat. LLU Raksti, 25(320) p. 102–115.
7. Liepina S., Jemeljanovs A. (2011) „Potential microbiological contamination of meat in carcasses of roe deer (*Capreolus capreolus*) and red deer (*Cervus elaphus*)”. Bridge over Europe 2. Starptautiskais pārtikas drošības, veterinārijas un dzīvnieku barošanas kongress: kongresa materiāli, Rīga, 22.-24.Sept., 2011 / East-West Veterinary Foundation. - Rīga, 2011. - 53.-54.lpp.
8. Liepina S., Jemeljanovs A. (2011) Prolonging Possibilities of Wild Animals' (*Capreolus Capreolus* and *Cervus Elaphus*) Meat Quality. Proceedings of the International conference. 6th International CIGR technical symposium "Towards a sustainable food chain: food process, bioprocessing and food quality management": proceedings, Nantes, France, 18th - 20th April 2011 International Commission of Agricultural Engineering. - Nantes, 2011. p. 112–116.

9. Liepiņa S., Jemeljanovs A., Konošonoka I.H. (2010) Stirnu (*Capreolus capreolus*) un staltbriežu (*Cervus elaphus*) gaļas bakteriālā piesārņojuma noteikšana pielietojot dažādas mikrobioloģijas un molekulārās bioloģijas metodes. Detection of bacterial pollution of roe deer's (*Capreolus capreolus*) and red deer's (*Cervus elaphus*) meat using classical microbiological and molecular biology methods. Dzīvnieki. Veselība. Pārtikas higiēna: Starptautiskās zinātniskās konferences raksti. (Jelgava, Latvija 2010.gada 29.oktobrī) 78 –81 lpp.
10. Liepina S., Jemeljanovs A. (2010) Wild animals' (*Cervus Elaphus*, *Capreolus Capreolus*) meat microbiological pollution. Proceedings of the International conference XIV International Symposium „Feed technology”. XII International Symposium „NODA 2010”, (Novi Sad, Serbia 19.10.– 21.10. 2010), p. 55–62.
11. Vītiņa I., Krastiņa V., L.Proškina L., Lujāne B., Liepiņa S. (2010) Comparison of venison and beef quality. Baltic animal breeding XV conference, (Riga, Latvia 31.05.– 01.06. 2010), p. 147–150.