

STIRNU (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) UN STALTBRIEŽU (*CERVUS ELAPHUS*) GAĻAS BAKTERIĀLĀ PIESĀRŅŪMA NOTEIKŠANA PIELIETOJOT DAŽĀDAS MIKROBIOĻĢIJAS UN MOLEKULĀRĀS BIOĻĢIJAS METODES

DETECTION OF BACTERIAL POLLUTION OF ROE DEER'S (*CAPREOLUS CAPREOLUS*) AND RED DEER'S (*CERVUS ELAPHUS*) MEAT USING CLASICAL MICROBIOLOGICAL AND MOLECULAR BIOLOGY METHODS

Solveiga Liepina, Aleksandrs Jemeljanovs, Ināra-Helēna Konošonoka

LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskais institūts „Sigra”, Latvia
LUA, Research Institute of Biotechnology and Veterinary Medicine ”Sigra”, Latvia
sigra@lis.lv

ABSTRACT

To get high quality game meat, it is very important to observe strict deer farming and transporting conditions. Microbiological control of the meat is important factor providing harmlessness of the food. Classical microbiology and molecular biology methods were applied to detect microorganisms. Investigations on bacterial pollution of roe deer's (*Capreolus capreolus*) and red deer's (*Cervus elaphus*) meat revealed amount number of microbes in venisions. Ratio of the numbers of *Enterobacteriaceae* and count of total colony count culture was constant in all storage period of meat of both animal species, and the numbers of *Enterobacteriaceae* composes 60% of total bacterial count. When storing fresh meat of captive deer (*Cervus elaphus*) and wild animals at different temperatures of microorganisms of *Enterobacteriaceae* species whose growth are not limited predominate. Increase in colony forming units culture count in roe meat during storage was slower than in deer meat however growth rate of *Enterobacteriaceae* was higher than in deer meat. Analysed venison samples were not contained verotoxin-producing strains of *E.coli* thus proving that this meat is safe for customers. It was proven by the sequestration reaction of *E.coli* and by comparison of the obtained results with the database of microorganism genome available on the internet.

KEY WORDS: wild animals' meat, microbiological pollution.

IEVADS

Medījumu gaļa ir kvalitatīvs, cilvēka organisma fizioloģiskām prasībām atbilstošs uzturvielzēklis, kas raksturojas ar diētiskumu, augstu proteīna līmeni, to aminoskābju saturu un to optimālām attiecībām (triptopāns: oksiprolīns - 2 : 1), raksturojas ar augstu 33.7% nepiesātināto taukskābju saturu: linolskābe, linolēnskābe, arahidonskābe u.c., zemu holesterīna līmeni, optimālu muskuļaudu un taukaudu attiecību, augstu minerālvielu saturu, (Cu, Fe, Zn). Lai gan medījumu gaļas patēriņš nav liels, salīdzinot ar mājdzīvnieku (cūku, liellopu, putnu) gaļu, tomēr pieprasījums pēc tās pieaug, un šīs gaļas ieguve kļūst par nozīmīgu pārtikas ražošanas sastāvdaļu.

Vērtējot stirnu un briežu gaļas mikrobiālo piesārņojumu, ir jāvērtē zarnu nūjiņu klātbūtne (*E.coli*) mezofili aerobos, un fakultatīvi anaerobie mikroorganismus, kas plaši sastopami ārējā vidē, un līdz ar to viegli var kļūt par gaļas piesārņojuma cēloni. Ar pārtiku saistītās infekcijas slimības bieži vien izraisa patogēnie mikroorganismi, kas

nonāk cilvēka organismā ar dzīvnieku izcelsmes pārtiku. Patogēno baktēriju noteikšana ar tradicionālajām metodēm ir apgrūtināta, jo bieži mikroorganismi ir nelielā skaitā un tiek nomākti ar organismā esošo vietējo mikrofloru, ienāk jaunas metodes, kas ir precīzas. Modernajām tehnoloģijām pilnveidojoties, lai atvieglotu un paātrinātu patogēno mikroorganismu noteikšanu un paaugstinātu identifikācijas jutību, dažādu bakteriālo infekciju diagnostikā vienlaicīgi ar klasiskajām mikrobioloģijas metodēm aizvien vairāk izmanto molekulārās bioloģijas un ģenētisko izmeklējumu metodes (Olsen, 2000). Gaļas mikrobiālā kontrole ir svarīgs faktors pārtikas nekaitīguma nodrošināšanā. Šim nolūkam arvien vairāk tiek izmantotas tehnoloģijas, kas identificē un klasificē mikroorganismus DNS līmenī (Tutenel et al., 2003). Viena no biežāk izmantotajām metodēm ir polimerāzes ķēdes reakcija - PĶR (Olsen, 2000).

Mūsu **pētījuma** mērķis bija noskaidrot un izvērtēt savvaļas stirnu (*Capreolus capreolus*) un nebrīvē audzējamo staltbrīžu (*Cervus elaphus*) gaļas mikrobiālo piesārņojumu un tā pakāpi uzglabāšanas laikā dažādos temperatūras režīmos, šim nolūkam izvirzot sekojošus uzdevumus:

- 1) pētīt savvaļas dzīvnieku (*Capreolus capreolus*, *Cervus elaphus*) gaļas sākotnējo un turpmāk - glabāšanas laikā dažādās temperatūrās turētās gaļas mikrobiālo piesārņojumu, pielietojot klasiskās mikrobioloģijas metodes;
- 2) veikt mikroorganismu identifikāciju savvaļas dzīvnieku gaļā un to mikroorganismu atbilstību sugai, pielietojot molekulārās bioloģijas metodi – polimerāzes ķēdes reakciju;
- 3) salīdzināt ar mikrobioloģijas metodēm (klasisko) un PCR iegūtos rezultātus, vienlaicīgi nosakot, mikrobu celmos patogēnos verotoksīnus producējošus gēnus.

MATERIĀLS UN METODES

Medību sezonas laikā no 2009. gada oktobra līdz 2010. gada janvārim medībās, vairākos medību kolektīvos, tika iegūti 20 stirnu (*Capreolus capreolus*) gaļas paraugi, bet no nebrīvē audzētiem 20 dzīvniekiem (*Cervus elaphus*) - gaļas paraugi iegūti divās brīžaudzētāju saimniecībās Vidzemē.

Saskaņā ar instrukciju, ievērojot standarta LVS ISO17604:2005 „Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija, mikrobioloģiskai analīzei paredzētu paraugu ņemšana no liemeņa” atbilstošu metodiku, gaļas pārstrādes uzņēmumā no muskulatūras tika noņemti svaigas gaļas paraugi.

Pētot iegūto 40 svaigas gaļas paraugu (no 20 savvaļas stirnām un no 20 nebrīvē audzētiem brīžiem) mikrobioloģiskā piesārņojuma pakāpi, mikrobioloģiskās analīzes un molekulārās bioloģijas metode – polimerāzes ķēdes reakcija (PĶR) tika veiktas LLU Biotehnoloģijas un veterinārmedicīnas zinātniskajā institūtā „Sigra”, nosakot sākotnējo gaļas paraugu mezofilo aerobo un fakultatīvi anaerobo mikroorganismu (*MAFAM*) skaitu un *Enterobacteriaceae* dzimtas baktēriju skaitu vienlaicīgi. Ņemot vērā nepieciešamību noteikt optimālāko uzglabāšanas temperatūru, katras sugas dzīvnieku gaļas paraugi aseptiskos apstākļos tika sadalīti trīs daļās, turpmāk analizējamās gaļas paraugus ievietojot uz 168 stundām (7 diennaktīm) uzglabāšanas temperatūrās: +4°C, +8°C, +20 °C. Gaļas paraugu mikrobioloģiskie izmeklējumi tika veikti pēc 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 un 168 stundām augstākminētās temperatūrās uzglabātiem gaļas paraugiem. Iegūtie rezultāti tika savstarpēji salīdzināti.

Paraugu sagatavošana mikrobioloģiskai testēšanai tika veikta saskaņā ar standarta „Pārtikas un dzīvnieku barības mikrobioloģija. Testēšanas paraugu, sākotnējās suspensijas un decimālšķīdumu sagatavošana mikrobioloģiskām pārbaudēm. 2. daļa. Īpaši noteikumi kā sagatavot gaļu un gaļas izstrādājumus” (LVS EN ISO 6887, 2,

2004). Atšķaidījumu pagatavošanai tika izmantots sāls-peptona šķīdums (*Maximum recovery diluent, OXOID, CM0733*). Visi mikrobioloģiskie izmeklējumi tika veikti saskaņā ar vispārpieņemtām metodikām.

Lai apstiprinātu mikrobioloģiskās analīzēs konstatēto *Escherichia coli* (*E.coli*) klātbūtni gaļas paraugos un izolētās *E.coli* celmu tīrkultūras, pielietojot randomizācijas metodi, 10% izmeklējumiem papildus klasiskajām mikrobioloģiskajām metodēm - 8 gaļas paraugu un 8 *E.coli* celmu tīrkultūras analīzēm, tika izmantota PĶR tehnika. PĶR reakciju arī veicām, lai noskaidrotu, vai kāds no celmiem nesatur patogēnos toksīnus producējošos gēnus VT1, VT2 un intīmāna gēnu *eaeA*, kuri kalpo kā piesaistes vieta toksīniem.

Ar PĶR izdalītās *E.coli* identifikācija tika pārbaudīta, iegūtos datus saskaņojot ar Nacionālā centra biotehnoloģiskās informācijas datu bāzi („*National Center for Biotechnology Information*”). Pārbaudot sekvenčēšanas datu korektumu, izmantojām „Sekvences salīdzināšanas datu bāzi” („*Sequence Similarity Search – Blast*”).

Mikroorganismu koloniju veidojošo vienību absolūtais skaits tika izteikts logaritmos pie bāzes 10. Datu apstrāde veikta ar matemātiskās statistikas metodēm. Metožu novērtējumam un salīdzinājumam izmantota regresijas analīze, izmaiņu būtiskums pārbaudīts ar dispersiju salīdzinošiem testiem.

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Veiktās paraugu analīzes, pirms ievietošanas uzglabāšanai metodikā noteiktajās temperatūrās, parādīja ievērojamu gaļas virsmas mikrobioloģisko piesārņojumu: baktēriju kvv g⁻¹ kopskaita lg bija 7.41 stirnu gaļai un kvv g⁻¹ lg 6.84 briežu gaļai, bet enterobaktēriju kopskaits - attiecīgi kvv g⁻¹ lg 3.87 un 3.96. Iegūtie rezultāti parādīja, ka, stirnu un briežu gaļas mikrobiālais piesārņojums pirms ievietošanas uzglabāšanai sasniedza sekojošas robežvērtības 5 × 10⁶ kvv g⁻¹ (10⁶ = lg 6).

Mūsu rezultāti sakrīt ar citu pētnieku (H. Zaube, M.Šraiters) Заупе, Шрайтер (1985) un Lawrie (2006) iegūtiem datiem, ka pārtikas higiēnas prasībām atbilstoša gaļas kvalitāte saglabājas temperatūras robežās no 0 līdz -10 °C. Vairumam baktēriju -10 °C temperatūras apstājas augšana un vairošanās, līdz ar to tiek pārtraukta arī taukus un proteīnus šķeļošo fermentu veidošanās procesi.

Identificējot *Enterobacteriaceae* dzimtas baktērijas sugu līmenī, konstatējām, ka visbiežāk gaļu kontaminēja *Escherichia coli*, *Escherichia freundii*, *Hafnia alvei*, *Kluyvera cryocrescens*, *Pantoea agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*. Kā briežu gaļas sporādisks infekcijas avots literatūras datos tiek minēts *E.coli O157:H7* (Carter, 1990; Rabatsky-Ehr et al., 2002).

Mūsu pētījums atklāj, ka MAFAM kvv g⁻¹ kopskaita lg stirnas gaļai, uzglabājot 168 stundas +4 °C temperatūrā, pieauga no 7.41 pirms uzglabāšanas uzsākšanas līdz 9.55, bet staltbriežu gaļai - kvv g⁻¹ kopskaita lg atbilstoši no 6.84 līdz 9.40. Arī enterobaktēriju skaits kā stirnu gaļā, tā arī briežu gaļā pieauga līdzvērtīgi.

Uzglabājot gaļu +8 °C temperatūrā 168 stundas, MAFAM kopskaits stirnu gaļai pieauga no 7.20 pirms uzglabāšanas uzsākšanas līdz 9.73 lg kvv g⁻¹, bet staltbriežu gaļai atbilstoši no 6.84 līdz 9.94 lg kvv g⁻¹. Tā kā gaļas paraugi jau pirms ievietošanas uzglabāšanai +8 °C temperatūrā bija stipri kontaminēti, tad uzglabāšanas laikā MAFAM skaits 1.5 reizes pārsniedza nekaitīguma kritērijus abām grupām. Kā stirnu gaļā, tā arī staltbriežu gaļā palielinājās arī *Enterobacteriaceae* baktēriju skaits.

Lai pārbaudītu klasisko mikrobioloģijas metožu un PĶR reakcijas datu sakrītību, pirmais tīrkultūras paraugs tika izvēlēts sekvenčēšanas reakcijas veikšanai, kas arī ir bieži izmantojama metode bakteriālo infekciju konstatēšanā. Pētījumi atklāja, ka neviens no 8

izvēlētajiem *E.coli* celmu paraugiem nesaturēja ne verocitotoksīnus producējošos gēnus, ne intimīna gēnu *eaeA*, tādējādi pierādot, ka gaļa droši izmantojama pārtikā.

Veicot *E.coli* DNS sekvenēšanas reakciju un mūsu iegūtos rezultātus salīdzinot ar internetā pieejamo mikroorganismu genomu datubāzi, varējām konstatēt, ka izolētās tūrkultūras atbilst *E.coli* 16S rDNS rajonam, tādējādi apstiprinot veikto tradicionālo mikrobioloģisko metožu korektumu (*National Center for Biotechnology Information*, „*Sequence Similarity Search*”).

SECINĀJUMI

1. Pieaugot stirnu (*Capreolus, capreolus*) un nebrīvē audzējamo staltbriežu (*Cervus elaphus*) svaigas gaļas uzglabāšanas ilgumam, attiecīgi, pieaug arī MAFAM un *Enterobacteriaceae* skaits visos uzglabāšanas temperatūru režīmos.
2. Abu sugu dzīvnieku gaļas uzglabāšanas periodā (168 stundas) MAFAM un enterobaktēriju skaita attiecība bija konstanta un enterobaktēriju skaits sastādīja apmēram 60% no kopējo baktēriju skaita.
3. Savvaļas dzīvnieku un nebrīvē audzējamo staltbriežu (*Cervus elaphus*) gaļā uzglabājot temperatūrā +4°C +8°C +20°C, dominē *Enterobacteriaceae* dzimtas mikroorganismi, kuru augšana minētajās temperatūrās netiek kavēta.
4. Gaļas uzglabāšanas laikā MAFAM skaita palielināšanās stirnu gaļā bija lēnāka nekā staltbriežu gaļā, bet enterobaktēriju augšanas ātrums straujāks nekā briežu gaļā, izņemot +20°C uzglabāšanas temperatūru, kad enterobaktēriju augšanas ātrums stirnu gaļā bija straujāks, salīdzinot ar staltbriežu gaļu.
5. Veicot *E.coli* DNS sekvenēšanas reakciju un iegūtos rezultātus salīdzinot ar internetā pieejamo mikroorganismu genomu datubāzi, varējām konstatēt, ka izolētās tūrkultūras atbilst *E.coli* 16S rDNS rajonam, parādot veikto mikrobioloģisko metožu korektumu.

LITERATŪRA

1. Carter, M.E. Enterobacteria. In: *Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology*. Carter, M.E., Cole, J.R. (eds.). 5th ed. Academic Press. San. Diego. 1990; 3 – 11.
2. Lawrie, R.A. *Meat Science*. 7th edition, 2006; 456.
3. National Center for Biotechnology Information. <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
4. Olsen, J.E. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. *Food Research International* 33 2000; 257-266.
5. [Rabatsky-Ehr T, Dingman D, Marcus R, Howard R, Kinney A, Mshar P](#). Deer meat as the source for a sporadic case of Escherichia coli O157:H7 infection // [Emerging Infectious Diseases](#), 2002 May; 8(5):525-7.
6. Sequence Similarity Search – Blast. <http://blast.genome.jp/>
7. Tuteneel, A.V., Pierard, D., Van Hoof, J., Cornelis, M., De Zutter, L. Isolation and molecular characterization of Escherichia coli O157 isolated from cattle, pigs and chickens at slaughter. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 2003; 63 - 69.
8. Заупе Х., Шрайтер М. Микробиология продуктов животного происхождения. (Перевод с немецкого) Дрезден, 1985; 34-63.