



Сторінка молодого вченого

УДК 576.809
© 2010

Г.В. Бурцева

Технологічний інститут
молока та м'яса УААН

* Науковий керівник —
доктор технічних наук
Н.Ф. Кігель

ВИЗНАЧЕННЯ НАЯВНОСТІ КОАГУЛАЗИ У СТАФІЛОКОКІВ, ВИДІЛЕНИХ З ФЕРМЕНТОВАНИХ М'ЯСНИХ ПРОДУКТІВ*

Проведено дослідження на наявність коагулази у
55 штамів стафілококів, попередньо вилучених з
ферментованих м'ясних продуктів
непромислового виробництва.

Великий асортимент сирокочених і сиров'ялених м'ясних продуктів на європейському ринку залежить від різноманіття сировини та особливостей процесів виробництва у різних країнах та регіонах. Відомо, що північні ферментовані продукти характеризуються специфічною кислотною, середземноморські — твердішою консистенцією, а промислове виробництво продуктів обох категорій базується на використанні спеціальних бактеріальних культур, що надає можливість стандартизувати та контролювати кінцевий продукт [11].

Підбір культур для створення такого препарату є кропітким і багатостадійним процесом. Для повноцінного функціонування бактеріальні культури повинні бути адаптованими до певної сировини та технології, задовольняти органолептичні уподобання місцевих споживачів. На думку вчених, оптимальний заквашувальний препарат для м'ясного ферментованого продукту має складатися не тільки з молочнокислих бактерій (гомоферментативних лактобацил і/або педіококів), а й грампозитивних каталазопозитивних коків, серед яких найперспективнішими вважають непатогенні стафілококи, адже саме ці мікроорганізми характеризуються широким спектром біохімічної активності, що дає змогу отримувати смакову гаму ферментованих м'ясних виробів [5, 8].

За діючою номенклатурою, рід *Staphylococcus* об'єднує 36 видів, з яких 4 поділені на підвиди. Класифікація продовжує розвиватися. За результатами досліджень послідовності 16S rRNA роду *Staphylococcus* віднесено до грампозитивних бактерій з низьким вмістом Г+Ц у ДНК, які філогенетично тісно пов'язані з ентєрококами, стрептококами, лактобацилами. Стафілококи широко розповсюджені у природі: їх

ізолюють зі шкіри і слизових оболонок тварин та людини, з харчових продуктів, ґрунту, піску, повітря та води. Але серед представників роду *Staphylococcus* є патогенні і токсигенні штами [7, 12]. Отже, дослідження з вивчення технологічного потенціалу культур обов'язково супроводжуються перевіркою їхньої безпеки для здоров'я людини [2].

Одним із критеріїв попередньої оцінки ступеня безпеки стафілококів є реакція на наявність ферменту коагулази. Цей фермент, зазвичай, визначається у патогенних стафілококів [1]. Донедавна штами коагулазонегативних стафілококів (КНС) апіорно вважали непатогенними, хоч за сучасними даними вони також можуть викликати патогенез. У медичних публікаціях нерідко з'являються такі КНС як *S. epidermidis* (нозокоміальні інфекції, особливо у пацієнтів з протезами, трансплантатами), *S. haemolyticus* (ендокардити, перитоніти, септицемія, інфекції ран, кісток, сполучної тканини), *S. lugdunensis* (ендокардити, септичні артрити, абсцеси), *S. caprae* (ендокардити, септицемія, інфекції сечостатевої системи), рідше з клінічного матеріалу ізолюють *S. auricularis*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. saccharoliticus*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. pasteurii*, *S. warneri*, *S. xyloso*, але слід враховувати труднощі при віднесенні їх до виду за фенотипічними проявами [7, 10].

Коагулаза, мікробна екзогенна протеаза, спричиняє утворення згустку плазми крові та існує у 2-х формах: вільна коагулаза реагує на протромбін та його похідні; зв'язана коагулаза — локалізована на поверхні клітинної стінки і реагує на α - та β -ланцюги фібриногенів. За наявності ферменту в активному стані поверхня бактеріальної клітини вкривається шаром фіб-

1. Результати тесту на наявність коагулази у стафілококів, виділених з ферментованих м'ясних продуктів

Культура або джерело вилучення	Загальна кількість, штами	Кількість коагулазопозитивних штамів за термін інкубування, год		
		4	6	24
3 ферментованих продуктів непромислового виробництва	26	2	6	6 (3)*
3 музею відділу біотехнології ТІММ	29	0	0	0 (15)*
<i>S. aureus</i> ATCC 209	1	1	1	1
<i>K. varians</i> ATCC 9341	1	0	0	0

* У дужках — кількість культур, які після 24 год інкубування утворювали невеликий згусток (несформований чи сформований).

рину і тоді мікроорганізм стає недосяжним для фагоцитів [6]. Визначення наявності коагулази є доступним та досить показовим методом для первинної оцінки патогенності штаму, а у разі виконання тесту у пробірках визначаються обидві форми цього ферменту [1].

Переважає кількість стафілококів — коагулазонегативні, за винятком *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. scheiferi subsp. coagulans*, *S. lutrae* та деяких штамів *S. hyicus*. Всі промислові штами стафілококів за своїми технологічними характеристиками та ступенем залучення у бажані метаболічні процеси (смако- та ароматоутворення) під час дозрівання ферментованих продуктів, особливо сирів та ковбас, є коагулазонегативними.

Мета роботи — встановити наявність коагулази у стафілококів, виділених з ферментованих м'ясних продуктів непромислового виробництва.

Об'єкти та методи дослідження. *Культури стафілококів:* 26 штамів, вилучених із ферментованих продуктів непромислового виробництва, 29 штамів з музею відділу біотехнології ТІММ УААН та контрольні штами *S. aureus* ATCC 209 і *Kocuria varians* ATCC 9341.

Метод визначення коагулази. Для постановки тесту на наявність коагулази штами, що піддавали випробуванню, інкубували у пробірках з серцево-мозковим бульйоном (HiMedia Laboratories Pvt Ltd., Індія) протягом 22—24 год за температури 36±1°C. Відбирали стерильно по 0,1 см³ кожної культури та додавали до 0,3 см³ попередньо відновленої кролячої плазми *Vac-tident Coagulase* EDTA (Merck KGaA, Німеччина), інкубували за температури 36±1°C. За позитивний контроль брали реакцію зі *S. aureus* ATCC 209, а негативний — *Kocuria varians* ATCC 9341. Для контролю реагентів (КР) до 0,3 см³ кролячої плазми додавали 0,1 см³ серцево-мозкового бульйону без инокуляції. Результати реєстрували через 4, 6 і 24 год інкубування за температури 36±1°C. Штам визначали як коагулазопозитивний, якщо культура давала реакцію «+++», тобто утворювала у пробірці великий сформований згусток, або «++++»

— весь уміст пробірки коагулювався і не виливався при перевертанні. Штам визначали як коагулазонегативний, якщо видиме фіброутворення було відсутнє (таку реакцію оцінювали «-»), культура утворювала невеликий несформований згусток — «+», невеликий сформований згусток — «++». Повторність дослідів 3-разова.

Результати досліджень та їхнє обговорення. Результати досліджень показали, що в контрольній плазмі (КР) ознаки коагуляції не спостерігали жодного разу. Для *S. aureus* ATCC 209 була характерною реакція «++++» через 4 год інкубування; для *K. varians* ATCC 9341 — реакція «-». При постановці тесту оцінювали також залежність прояву реакції коагуляції від тривалості досліду (табл. 1).

Усі штами з музею відділу біотехнології ТІММ були коагулазонегативними. Однак слід зазначити, що через 24 год експозиції близько половини цих штамів продемонстрували реакцію коагуляції плазми, яку було оцінено на один чи два плюси. Це може свідчити про наявність у цих культур інших неспецифічних протеаз, здатних розщеплювати протромбін і (або) плазміноген і спричиняти коагуляцію плазми [1].

Установлено, що серед 26 штамів, вилучених із ферментованих продуктів непромислового виробництва, 6 є коагулазопозитивними. Два з них (15.3, 14.1) уже через 4 год інкубування показали повну плазмокоагуляцію, так само як і *S. aureus* ATCC 209. Через 6 год ще 2 штами (7.1, 15.4) також повністю зкоагулювали вміст пробірок, а штами 6.1 та 15.2 реагували на «+++». Жоден із штамів, що прокоагулювали, через 24 год не продемонстрував реверсної реакції, тобто згусток не розчинився, що може бути непрямым свідченням відсутності фібринолізину.

З 4 штамів, вилучених з сиров'яленого продукту з телятини, не було жодного коагулазопозитивного (табл. 2). Серед 16 штамів зі зразків сиров'ялених виробів із свинини непромислового виробництва 3 були коагулазопозитивними: 15.4, 15.3, 15.2, які різнилися візуальним проявом інтенсивності коагуляції. Ці штами були вилучені з одного джерела (зразок № 15) з

2. Характеристика штамів, вилучених з різних типів ферментованих продуктів непромислового виробництва

Тип продукту	Загальна кількість штамів	Коагулазопозитивні штами	Коагулазонегативні штами
Балик із свинини:			
сирокопчений	6	3 (14.1, 7.1, 6.1)	3
сиров'ялений	16	3 (15.4, 15.3, 15.2)	13
Сиров'ялений продукт із телятини	4	0	4

великим ступенем ймовірності, що він був вироблений з м'яса від хворої тварини.

Серед 6 штамів із сирокопчених виробів із свинини половина вилучених була коагулазопозитивною: 6.1, 7.1, 14.1. Така закономірність свідчить про низьку якість сировини, з якої виготовлено продукцію, або про вторинну контамінацію через низький санітарно-гігієнічний рівень у виробника.

Слід зазначити, що з європейських ферментованих м'ясних продуктів, виготовлених за традиційною технологією, також ізолюють коагулазопозитивні коки, але порівняно з нашими даними у меншій кількості: грецькі ковбаси — 9,2% [3], іспанські хорізо — 2,3% [4]. Визначен-

ня наявності коагулази не є вичерпним. Це лише перший крок для встановлення безпеки стафілококових культур, які плануються до застосування у виробництві ферментованих м'ясних продуктів. Відомо, що деякі штами КНС, вилучені з ферментованих м'ясних та молочних виробів, можуть продукувати ентеротоксини, бути резервуарами генів антимікробної резистентності, утворювати внаслідок декарбоксилазної активності біогенні аміни [7, 9, 12]. Отже, для остаточного висновку щодо безпеки штамів необхідно провести додаткові дослідження відбору за бажаними технологічними властивостями та підтвердження безпеки обраних культур для здоров'я споживачів.

Висновки

Проведено скринінг 55 штамів стафілококів, виділених з ферментованих м'ясних продуктів непромислового виробництва, на наявність коагулази.

Установлено, що 6 штамів стафілококів є коагулазопозитивними, що свідчить про потенційну небезпеку і не уможлиблює їхнє промислове використання.

Бібліографія

1. Акатов А.К., Зуева Т.С. Стафилококки. — М.: Медицина. — 1983. — 254 с.
 2. Покровский В.И., Поздеев О.К. Медицинская микробиология. — М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. — 1200 с.
 3. Drosinos E.H., Mataragas M., Xiraphi N., Moschonas G., Gaitis F. and Metaxopoulos J. Characterization of the microbial flora from a traditional Greek fermented sausage//Meat Science. — 2005. — 69, № 2. — P. 307—317.
 4. Garcia-Varona M., Santos E.M., Jaime I., Rovira J. Characterization of Micrococcaceae isolated from different varieties of chorizo//Int. J. Food Microbiol. — 2000. — 54, № 3. — P. 189—195.
 5. Hammes W.P. and Hertel C. New developments in meat starter culture//Meat Science. — 1998. — V. 49. — P. 125—138.
 6. Ieven M., Verhoeven J., Pattyn S.R., Goossens H. Rapid and economical method for species identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci//J. of Clinical Microbiology. — 1995. — 33, № 5. — P. 1060—1063.
 7. Irlinger F. Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci//Int.

J. Food Microbiol. — 2008. — 126, № 3. — P. 302—310.
 8. Leroy F., Verluyten J., De Vuyst L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation//Int. J. Food Microbiol. — 2006. — 106, № 3. — P. 270—285.
 9. Martin B., Garriga M., Hugas M., Bover-Cid S., Veciana-Nogues M.T., Aymerich T. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive cocci from slightly fermented sausages//Int. J. Food Microbiol. — 2007. — 107, № 2. — P. 148—158.
 10. Pfaller M.A., Herwaldt L.A. Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci//Clinical Microbiology Reviews — 1998. — 1, № 3. — P. 281—299.
 11. Talon R., Leroy S. and Lebert L. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters//Meat Science. — 2007. — 77, № 1. — P. 55—62.
 12. Zell C., Resch M., Rosenstein R., Albrecht T., Hertel C. and Gutz F. Characterization of toxin production of coagulase-negative staphylococci isolated from food and starter cultures//Int. J. Food Microbiol. — 2008. — 127, № 3. — P. 246—251.