

EWELINA WĘSIERSKA

OCENA ILOŚCIOWEGO I JAKOŚCIOWEGO SKŁADU MIKROFLORY SUROWYCH WĘDLIN DOJRZEWAJĄCYCH ZA POMOCĄ NOWOCZESNYCH METOD DIAGNOSTYCZNYCH

Streszczenie

Celem pracy była identyfikacja mikroflory kwaszącej i denitryfikującej surowych wędlin dojrzewających regionu Podlasia. Na podstawie różnic morfologicznych kolonii wyodrębniono reprezentatywne szczepy, które poddano identyfikacji z zastosowaniem selektywno-różnicujących podłoży i testów mikrobiologicznych oraz identyfikacji z zastosowaniem systemów MALDI TOF MS Biotyper oraz Vitek® 2. Najliczniej reprezentowaną grupą były Gram-dodatnie ziarniaki stanowiące 88,5 % zidentyfikowanych bakterii. Udział poszczególnych rodzajów w tej grupie wyniósł: 56,3 % – *Staphylococcus* sp., 26 % – *Enterococcus* sp., 3,1 % – *Weissella* sp., 14,6 % – pozostałe. W puli oznaczonych gronkowców poszczególne gatunki stanowiły odpowiednio: 18,7 % – *S. equorum*, 11,5 % – *S. saprophyticus*, 16,7 % – *S. xylo-*
sus, 6,2 % – *S. warneri*, 1,1 % – *S. vitulinus*, 1,1 % – *S. gallinarum* oraz 1 % – *S. simulans* i *S. hominis* ssp. *novobiosepticus*. W obrębie rodzaju *Enterococcus* zidentyfikowano 2 gatunki: *E. faecium* (22,9 %) oraz *E. faecalis* (3,1 %). Blisko 98 % badanych szczepów nie wykazała cech chorobotwórczości – nie stwierdzono zdolności hemolitycznych, obecności czynnika CF i bakteryjnej oksydazy cytochromowej. Szczepy *Staphylococcus* sp. były wrażliwe na polimyksynę B (100 %) i bacytracynę (> 60 %). Szczepy *Enterococcus* sp. identyfikowane systemem Vitek® 2 wykazały oporność na wszystkie proponowane antybiotyki. Oznaczone bakterie stanowiły mikroflorę fizjologiczną człowieka i zwierząt, z których pozyskano surowce do produkcji wędlin lub były związane ze środowiskiem chowu.

Słowa kluczowe: surowe wędliny dojrzewające, mikroflora, identyfikacja, oporność na antybiotyki

Wprowadzenie

Tradycyjne, bogato przyprawione trwałe wędliny surowe kresów suwalsko-wileńskich, produkowane z mięsa wieprzowego, wołowego, baraniego oraz słoniny, charakteryzują się wieloletnią historią, wyjątkową smakowitością oraz atrakcyjnym wyglądem. Mocno podsuszone, powstające na bazie kuchni karaimejskiej, doprawiane są

Dr hab. E. Węsierska, Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydz. Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 31-149 Kraków.

Kontakt: ewelina.wesierska@urk.edu.pl

jedynie solą i pieprzem. Receptury wynikające z doświadczeń Litwinów wprowadzają dodatkowo czosnek i jałowiec. W gospodarstwach położonych w pobliżu granicy z Białorusią wyrabiane są wędliny bogato doprawione pieprzem, czosnkiem oraz majerankiem. Stopień zanieczyszczenia mikrobiologicznego użytych surowców i dodatków przyprawowych, parametry solenia, peklowania, wędzenia, dojrzewania produkcyjnego i poprodukcyjnego wpływają bezpośrednio na zawartość wody, aktywność wody i pH wyrobów, a pośrednio na ich barwę, aromat oraz skład ilościowy i jakościowy mikroflory [17].

W grupie drobnoustrojów pożądaných technologicznie w procesie dojrzewania wymieniane są m.in. bakterie kwaszące przypisane do rzędu *Lactobacillales* i rodzin *Aerococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae*, *Streptococcaceae* [7, 10] oraz denitryfikujące ziarniaki rodzin *Staphylococcaceae* i *Micrococcaceae* [3, 15]. Większość gatunków rzędu *Lactobacillales* ma duże wymagania pokarmowe, do wzrostu potrzebuje podłoża bogatych w witaminy z grupy B, aminokwasy, pochodne kwasów nukleinowych, kwasy tłuszczowe, mono- i disacharydy. Niektóre z nich mają zdolność wykorzystywania soli kwasów organicznych, np. cytrynianów. Rozkład związków będących źródłem węgla prowadzi do kumulacji kwasu mlekowego tworzonoego z różną wydajnością w odmianach D(-), L(+), zależną od rodzaju i gatunku [1, 9]. Ze względu na jakościowy skład końcowych produktów fermentacji bakterie mlekowe dzieli się na homo- i heterofermentatywne. Bakterie homofermentatywne (*Lactobacillus plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *Streptococcus acidophilus*, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Enterococcus* sp.) wytwarzają głównie kwas mlekowy (90 %). Gatunki heterofermentatywne produkują kwas mlekowy oraz inne związki, np. kwas octowy i CO₂ (*L. fermentum*, *L. brevis*) lub etanol i CO₂ (*Leuconostoc mesenteroides*). Oprócz właściwości kwaszących wiele gatunków wykazuje zdolności proteolityczne oraz lipolityczne. Inną korzystną cechą jest ich zdolność do syntetyzowania bakteriocyn, takich jak nizyna, laktobrewina czy laktolina.

Obecność pożądaných technologicznie szczepów rodzaju *Staphylococcus* i *Micrococcus* zapobiega procesowi jęlczenia, sprzyja kształtowaniu typowej barwy, aromatu oraz tekstury wędlin dojrzewających [2, 5, 6, 8]. Produkowana przez gronkowce katalaza zapobiega przebarwieniom powodowanym przez nadtlutki wytwarzane przez szczepy bakterii kwaszących [11], a związki o charakterze bakteriostatycznym wydłużają okres bezpiecznego przechowywania wędlin [4]. Gronkowce związane z surowcami wykorzystywanymi do produkcji fermentowanych wyrobów mięsnych wykazują niski potencjał enterotoksyczny, a dodane do żywności w formie kultur starterowych nie przejawiają wzrostu oporności na antybiotyki [5, 13, 19]. W wędlinach dojrzewających technologią tradycyjną rozwija się zatem mikroflora dzika nie-starterowa, która może być dodatkowym źródłem pożądaných technologicznie enzymów.

Celem pracy była identyfikacja mikroflory kwaszącej i denitryfikującej tradycyjnych surowych wędlin dojrzewających regionu Podlasia oraz ocena właściwości biochemicznych i chorobotwórczych oznaczonych szczepów. Badane wyroby mięsne, odtwarzane obecnie przez niekilku gospodarzy i gospodynie, regularnie zdobywają nagrody w konkursie „Nasze Kulinarne Dziedzictwo – Smaki Regionów”, organizowanym przez Marszałka Województwa Podlaskiego, Polską Izbę Produktu Regionalnego i Lokalnego oraz Podlaski Ośrodek Doradztwa Rolniczego w Szepietowie. Niektóre z nich są dodatkowo wyróżniane jako „Perły” targów Polagra. Proces dojrzewania wędlin i sukcesja mikroflory zostały zbadane w ramach projektu badawczego MNiSW N N312 305740 „Właściwości denitryfikujące, aromatyzujące i zakwaszające bakterii kwasu mlekowego oraz ziarniaków izolowanych z tradycyjnych surowych wyrobów mięsnych fermentowanych” [21, 22, 23].

Material i metody badań

Materiałem doświadczalnym było 97 szczepów bakterii kwaszących i denitryfikujących, izolowanych z tradycyjnych surowych wędlin dojrzewających regionu Podlasia, fermentowanych spontanicznie. Zgodnie z zaleceniami norm PN-EN ISO 7218:2008 [24] i PN-EN ISO 6887-2:2017-05 [25] wędliny rozdrabniano z zachowaniem aseptycznych warunków pracy w maszynce do mięsa (MG700, Kenwood, Wielka Brytania), homogenizowano (Stomacher 80, Seward, Wielka Brytania) a następnie posiewano metodą powierzchniową na selektywne podłoża Baird-Parkera (emulsja żółtka, tellurowy sodu, 37 ± 1 °C, 24 - 48 h, Merck, Polska), MRS (kwas octowy, pH 5,4, 30 ± 1 °C, 24 - 48 h, 20 % CO₂, Merck, Polska) i M17 (30 ± 1 °C, 24 - 48 h, Merck, Polska). Bakterie dodatkowo pasażowano na podłoże Slanetza i Bartley (azydek sodu, chlorek 2,3,5-trifenyloctanowy, 37 ± 1 °C, 24 - 48 h, Merck, Polska) oraz E.S.T.Y. Medium (3-procentowy nadtlenek wodoru (Laboratorium Galenowe, Polska), 37 ± 1 °C, 24 - 48 h, warunki tlenowe (Biocorp Polska Sp. z o.o).

Pozyskane szczepy oceniano pod względem zdolności przemiany tryptofanu w indol (odczynnik Kovasca, Biocorp Polska Sp. z o.o), redukcji azotanów (V) do (III) (odczynnik NIT 1, NIT 2, Zn, bioMérieux, Polska) oraz reakcji proteolitycznych (Calcium Caseinate Agar acc. to FRAZIER and RUPP, 37 ± 1 °C, 24 - 48 h, Merck, Polska). Ocena właściwości chorobotwórczych polegała na stwierdzeniu obecności czynnika CF (ang. *clumping factor*; osocze królicze, Biomed, Polska), aktywności bakteryjnej oksydazy (odczynnik NADI, OXI test, Pliva-Lachema Diagnostica) oraz możliwości przeprowadzenia hemolizy (5-procentowa odwłókniona krew barania, 37 °C, 24 - 48 h, Biocorp Polska Sp. z o.o). Czyste kultury poddawano identyfikacji, wykorzystując MALDI TOF MS Biotyper (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, Bruker Daltonik, Niemcy) oraz Vitek® 2 (bioMérieux, Polska). MALDI TOF MS Biotyper wykorzystano do identyfi-

kacji szczepów bakterii kwaszących wyhodowanych na agarze MRS w warunkach mikroaerofilnych z 20-procentowym dodatkiem CO₂ (ShelLab CO₂ Series Incubator, Sheldon Manufacturing, USA). Monokultury nanoszono w postaci cienkiej warstwy na płytkę ze stali nierdzewnej i pozostawiano w temp. 20 ± 2 °C do wyschnięcia. Płytkę pokrywano 1 μl roztworu nasyconego kwasu α-cyjano-4-hydroksycynamonowego (HCCA), zawieszzonego w rozpuszczalniku organicznym (10 mg HCCA/ml) o składzie: 50 % acetonitril, 47,5 % woda, 2,5 % kwas trifluorooctowy (TFA) i ponownie pozostawiano do wyschnięcia. Automatyczny pomiar widma i jego analizę porównawczą z widmami wzorcowymi wykonywano przy użyciu spektrometru masowego Microflex LT, współpracującego z programem MALDI-Biotyper 2.0 (Bruker Daltonik, Niemcy). Prawdopodobieństwo poprawnej identyfikacji wyrażano wskaźnikiem punktowym: wiarygodna identyfikacja drobnoustroju do poziomu gatunku (2,30 ÷ 3,00), wiarygodna identyfikacja drobnoustroju do poziomu rodzaju, prawdopodobny wynik identyfikacji do poziomu gatunku (2,00 ÷ 2,29), prawdopodobny wynik identyfikacji do poziomu rodzaju (1,70 ÷ 1,99) i niewiarygodny wynik identyfikacji (0,00 ÷ 1,69).

System Vitek® 2 (bioMérieux, Polska) służył identyfikacji i oznaczeniu lekowrażliwości ziarniaków wyizolowanych z podłoża M17 (Merck, Polska) oraz gronkoców i innych wyizolowanych z podłoża Bairda-Parkera (Merck, Polska). Bezpośrednio przed wykonaniem testów w aparacie Vitek® 2 kultury bakteryjne hodowano na agarze z krwią owczą i inkubowano w temp. 37 °C przez 24 h. Indywidualne karty identyfikacji kolorymetrycznej dla bakterii Gram-dodatnich (Vitek® 2 GP) zawierały 43 studzienki, w tym 38 z substratami biochemicznymi (testy identyfikacyjne) oraz 5 z antybiotykami (testy lekowrażliwości). Indywidualne karty identyfikacji kolorymetrycznej dla bakterii Gram-ujemnych (Vitek® 2 GN) zawierały 47 studzienek, w tym 46 z substratami biochemicznymi (testy identyfikacyjne) i 1 z wibriostatycznym czynnikiem 0129/R (test lekowrażliwości). Testy antybiogramowe obrazowały wrażliwość bakterii na obecność wybranych antybiotyków: polimyksyny B, bacytracyny, nowobiocyny, optochiny oraz wibriostatycznego czynnika 0/129. Gęstość komórek drobnoustrojów wprowadzonych automatycznie w postaci zawiesiny do studzienek z substratami wynosiła 0,50 - 0,63 w skali McFarlanda. Inkubację prowadzono w temp. 35,5 ± 1 °C w ciągu 6 - 8 h Wyniki testów zostały opracowane w programie Vitek® 2 Compact z informacją o jakości identyfikacji: doskonała (96 ÷ 99 %), bardzo dobra (93 ÷ 95 %), dobra (89 ÷ 92 %), akceptowalna (85 ÷ 88 %), mało prawdopodobna (2 - 3 jednostki taksonomiczne wykazały ten sam wynik testu identyfikacji), nieidentyfikowalna (więcej niż 3 jednostki taksonomiczne wykazały ten sam wynik testu identyfikacji lub otrzymany wynik nie korespondował z żadnym przypadkiem bazy danych). Dalszym badaniom poddano szczepy o identyfikacji doskonałej, bardzo dobrej oraz dobrej. Oprogramowanie Advanced Expert System (AES™) umożliwiło interpretację oraz zatwierdzenie wyników lekowrażliwości.

Wyniki i dyskusja

Większość zidentyfikowanych gatunków mikroflory stanowiły Gram-dodatnie ziarniaki (88,5 %), tlenowe, względnie beztlenowe, pałeczki (4,3 %), laseczki (1 %) oraz formy pleomorficzne (3,1 %), tworzące lub nietworzące spor, reprezentujące mikroflorę fizjologiczną człowieka, zwierząt oraz mikroflorę dodatków zielonych. Pozostałe mikroorganizmy stanowiły nieoznaczoną pod względem gatunku/rodzaju grupę, o małej wiarygodności wyniku (tab. 1).

Tabela 1. Skład ilościowy i jakościowy mikroflory kwaszącej i denitryfikującej tradycyjnych surowych wędlin dojrzewających

Table 1. Quantitative and qualitative composition of acidifying and denitrifying microflora of traditional raw ripened meats

Identyfikacja / Identification	Udział Percent amount [%]	System	
		Vitek® 2 SC	MALDI TOF MS SC
<i>Staphylococcus equorum</i>	18,7	90 - 99	-
<i>Staphylococcus xylosus</i>	16,7	89 - 99	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	11,5	97 - 99	-
<i>Staphylococcus warneri</i>	6,2	87 - 99	-
<i>Staphylococcus simulans</i>	1	93	-
<i>Staph. hominis</i> ssp. <i>novobiosepticus</i>	1	98	-
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	1,1	99	-
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	1,1	97	-
<i>Enterococcus faecium</i>	22,9	93 - 99	2,03 - 2,42
<i>Enterococcus faecalis</i>	3,1	99	< 1,70
<i>Aerococcus viridans</i>	2,1	93 - 94	< 1,70
<i>Micrococcus luteus</i>	1	94	< 1,70
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1,1	94	< 1,70
<i>Acinetobacter pittii</i>	1,1	-	1,99
<i>Serratia liquefaciens</i> grupa	2,1	98 - 99	< 1,70
<i>Kocuria kristinae</i>	2,1	93	< 1,70
<i>Bacillus</i> sp.	1	97	< 1,70
<i>Weissella viridescens</i>	3,1	-	1,97 - 2,10
Niezidentyfikowane / Unidentified	3,1	> 3 j.t. / t.u.	< 1,70

Objaśnienia / Explanatory notes:

SC – wskaźnik identyfikacji / score; j.t./ t.u. – jednostka taksonomiczna / taxonomic unit; (-) – badań nie prowadzono / no studies have been conducted.

Gatunkami dominującymi były gronkowce koagulazo-ujemne *S. equorum*, *S. xylosus*, *S. saprophyticus* i *S. warneri*. W analizie jakościowej drobnoustrojów wyizolowanych z podłoży przygotowanych dla bakterii mlekowych oraz Gram-dodatnich ziarniaków wykazano, że 26 % izolatów należało do rodzaju *Enterococcus*, w tym 23 % do *E. faecium*. Drobnoustroje te przejawiały zdolność wzrostu na dodatkowych podłożach Slanetza i Bartley oraz E.S.T.Y. w warunkach tlenowych, były katalazo-ujemne, nie

produkowały acetoiny i redukowały azotany (V) do (III) (tab. 2). Pozostałe drobnoustroje to katalazo-dodatnie ziarniaki *Staphylococcus* sp. (57,3 %), katalazo-ujemne, nieredukujące azotanów, niejednorodne pod względem morfologicznym *Weissella* sp. (3,1 %), katalazo-dodatnie i redukujące azotany pałeczki *Serratia* sp. (2,1 %), katalazo-dodatnie, nieredukujące azotanów pałeczki *Acinetobacter* sp. (2,2 %) oraz katalazo-dodatnie i redukujące azotany ziarniaki *Kocuria* sp. (2,1 %).

Tabela 2. Ocena izolatów pod względem zdolności proteolitycznych, redukcji azotanów (V) do (III) oraz aktywności katalazy

Table 2. Evaluation of isolates in terms of their proteolytic capacity, reduction of nitrates (V) to (III) and catalase activity

Identyfikacja / Identification	Udział reakcji dodatnich Percent amount of positive reactions [%]			
	IND	CCA	NO ₃ /NO ₂	KAT
<i>Staphylococcus equorum</i>	100	0	100	100
<i>Staphylococcus xylosus</i>	35,71	64,29	71,43	100
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0	28,57	7,14	100
<i>Staphylococcus warneri</i>	33,33	0	33,33	100
<i>Staphylococcus simulans</i>	100	0	100	100
<i>Staph. hominis</i> ssp. <i>novobiosepticus</i>	0	0	0	100
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	0	0	0	100
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	25	0	100	100
<i>Enterococcus faecium</i>	0	16,67	91,67	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	66,67	66,67	66,67	0
<i>Aerococcus viridans</i>	0	50	100	0
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0	0	0
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0	0	0	100
<i>Acinetobacter pittii</i>	0	0	0	100
<i>Serratia liquefaciens</i> grupa	0	0	100	100
<i>Kocuria kristinae</i>	0	0	0	0
<i>Bacillus</i> sp.	100	0	100	100
<i>Weissella viridescens</i>	0	0	0	0
Wynik niewiarygodny / False result	33,33	0	0	33,33

Objaśnienia / Explanatory notes:

IND – test na obecność indolu w reakcji rozkładania tryptofanu / test for presence of indole as the tryptophan decomposition; CCA – reakcja rozkładania kazeiny / casein decomposition reaction; NO₃/NO₂ – redukcja azotanów (V) do (III) / reduction of nitrates (V) to (III); KAT – test na obecność katalazy / test for presence of catalase.

Część szczepów *Staphylococcus*, głównie *S. xylosus*, *S. vitulinus* i *S. gallinarum* redukowała azotany, a 100 % szczepów *S. equorum* i *S. simulans* rozkładało tryptofan

z wytworzeniem indolu. Blisko 98 % oznaczonych szczepów nie wykazało właściwości chorobotwórczych – w żadnym przypadku nie stwierdzono obecności czynnika CF i bakteryjnej oksydazy cytochromowej. Zdolności hemolityczne stwierdzono wyłącznie w przypadku jednego szczepu *Bacillus* sp. Po analizie wyników testów GP i GN wykazano, że szczepy rodzaju *Staphylococcus* rozkładały 17,6 ÷ 52,9 % sacharydów i związków pochodnych. Najbardziej aktywnym gatunkiem był *S. xylosus*, który wykorzystywał 51,9 % dostępnych źródeł węgla. W grupie sacharydów i glikozydów nierozkładanych przez gronkowce były: D-rafinioza, cyklodekstryna, pullulan oraz D-amigdalina. Około 46 % szczepów *Staphylococcus* sp. wykazało aktywność β -galaktozydazy, 15 % – β -glukuronidazy, a 96,9 % – dihydrolazy argininy. Szczepy *Enterococcus* sp. wykorzystywały 58,8 ÷ 82,3 % proponowanych źródeł węgla. Związkami nierozkładanymi przez paciorkowce były D-ksyloza i pullulan, natomiast D-sorbitol wykorzystywany był jedynie przez *E. faecalis*. Wszystkie szczepy rodzaju *Enterococcus* wykazały aktywność hydrolazy i dihydrolazy argininy, ale wykazały różną aktywność arylamidaz: tyrozyny (45 %), L-asparagianu (27,3 %), L-pirolidyny (18,2 %) i alaniny (9,1 % szczepów). *Kocuria kristine* wykorzystywała sacharozę, D-maltozę i D-rybozę. Jej aktywność enzymatyczna ograniczona była do α -glukozydazy, arylamidazy tyrozyny, leucyny i dihydrolazy argininy 1. Żaden z oznaczonych szczepów rodzaju *Staphylococcus*, *Enterococcus* oraz *Kocuria* nie rozkładał fosfolipidów ani nie prowadził defosforylacji estrów fosforanowych. Gronkowce wykazały zdolność rozkładania mocznika (76,9 %), alkalizowania środowiska (61,5 %) oraz wzrostu przy podwyższonym do 6,5 % stężeniu soli w podłożu (100 %). Paciorkowce nie rozkładały mocznika, nie alkalizowały środowiska i potrafiły rosnąć w podłożu o 6,5 % stężeniu soli. Niewrażliwa na podwyższone stężenie soli *Kocuria kristine* alkalizowała środowisko zakwaszone kwasem mlekowym i była wrażliwa na obecność polimyksyny, bacytracyny i wibriostatycznego czynnika 0/129 w środowisku (tab. 3). Wszystkie szczepy rodzaju *Staphylococcus* były wrażliwe na działanie polimyksyny B, a odporne na działanie nowobiocyny (100 %), optochiny (100 %) i wibriostatycznego czynnika 0/129 (100 % szczepów). Szczepy rodzaju *Enterococcus* wykazały oporność na wszystkie proponowane antybiotyki.

Oba zaliczone do grupy *Serratia liquefaciens* szczepy, pomimo różnego pochodzenia, charakteryzowały się prawie identycznym profilem biochemicznym. Fermentowały 52,6 % zaproponowanych źródeł węgla, wykazywały aktywność α -, β -galaktozydazy, β -amylazy i trzech arylamidaz: tyrozyny, proliny i L-pirolidyny. Bakterie prowadziły dekarboksylację ornityny oraz lizyny, alkalizowały kwas mlekowy i bursztynowy oraz były odporne na działanie wibriostatycznego czynnika 0/129. *Acinetobacter lwoffii* przejawiał zdolność wykorzystania kwasu kumarowego, wykazywał aktywność arylamidazy tyrozynowej i glutamyłowej oraz był wrażliwy na działanie czynnika 0/129. Nie prowadził dekarboksylacji aminokwasów, nie alkalizował kwa-

sów, a podobnie jak *Serratia* sp., nie rozkładał lipidów i mocznika ani nie prowadził defosforylacji estrów fosforanowych. Szczep klasyfikowany jako *Bacillus* sp., podobnie jak szczepy rodzaju *Enterococcus*, potrafił wykorzystać jako źródła węgla sacharozę, D-trehalozę, D-maltozę, D-mannozę i D-mannitol oraz potrafił rozkładać mocznik. Różniła go umiejętność rozkładania sorbitolu, aktywność β -glukuronidazy i aryamidazy tyrozyny oraz prowadzenie reakcji zaproponowanych w teście GN, z udziałem L-arabitolu, kwasu kumarowego, β -alaniny i L-histydyny. *Bacillus* sp. dekarboksylował ornitynę i lizynę, alkalizował kwas bursztynowy i był odporny na działanie wibriostatycznego czynnika 0/129.

Tabela 3. Ocena izolatów pod względem wrażliwości na zastosowane substancje wstrzymujące wzrost drobnoustrojów

Table 3. Evaluation of isolates in terms of their sensitivity to substances used to inhibit growth of microorganisms

Identyfikacja / Identification	Udział szczepów wrażliwych Share of susceptible strains [%]				
	POLYB	BACI	NOVO	OPTO	0129R
<i>Staphylococcus equorum</i>	100	100	6,25	6,26	75
<i>Staphylococcus xylosus</i>	100	57,1	0	0	21,4
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	100	14,3	0	0	14,3
<i>Staphylococcus warneri</i>	100	83,3	100	0	16,7
<i>Staphylococcus simulans</i>	100	0	0	0	0
<i>Staph. hominis ssp. novobiosepticus</i>	100	100	0	0	0
<i>Staphylococcus gallinarum</i>	100	100	0	0	0
<i>Staphylococcus vitulinus</i>	100	100	0	0	0
<i>Enterococcus faecium</i>	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	25	25	0	0	25
<i>Aerococcus viridans</i>	100	100	0	0	0
<i>Micrococcus luteus</i>	100	100	100	100	100
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	100	100	100	100	100
<i>Acinetobacter pittii</i>	-	-	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i> grupa	-	-	-	-	0
<i>Kocuria kristinae</i>	100	100	0	0	100
<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	0
<i>Weissella viridescens</i>	-	-	-	-	-
Wynik niewiarygodny / False result	-	-	-	-	-

Objaśnienia / Explanatory notes:

POLYB – polimyksyna B / polymyxin B, BACI – bacytracyna / bacitracin, NOVO – nowobiocyna / novobiocin, OPTO – optochina / optochin, 0129R – czynnik wibriostatyczny / vibrio static agent 0129.

Mikroflora denitryfikująca wędlin dojrzewających przynależy do rodziny *Micrococcaceae*. Należą do niej trzy rodzaje: *Micrococcus*, *Staphylococcus* oraz *Enterococcus*, bytujące na powierzchni skóry oraz błon śluzowych zwierząt stałocieplnych oraz w środowisku ich chowu (gleba, powietrze, woda). *S. equorum* ma zdolność tworzenia pochodnych mioglobiny, m.in. oksy- i deoksymioglobiny [4, 18]. *S. xylosus* przekształca metmioglobinę w nitrozylomioglobinę [16]. Produkowana przez wymienione gatunki katalaza zapobiega przebarwieniom powodowanym przez nadtlarki wytwarzane przez szczepy bakterii kwasu mlekowego [11]. Najpowszechniej występującymi gatunkami gronkowców we włoskich wędlinach dojrzewających o wielowiekowej tradycji są *S. equorum*, *S. saprophyticus* i *S. xylosus*. *S. equorum* jest gatunkiem najliczniejszym, oznaczanym zarówno w surowcach, jak i w wyrobach gotowych [14]. *S. xylosus* jest izolowany przede wszystkim w wyrobach gotowych. *S. saprophyticus* jest bakterią pochodzącą ze środowiska produkcji. Innymi gatunkami gronkowców, identyfikowanymi w wędlinach fermentowanych są: *S. succinus*, *S. warneri*, *S. vitulinus*, *S. pasteurii*, *S. epidermidis*, *S. lentus* i *S. haemolyticus* [15]. Mikroflora wędlin hiszpańskich o niskim pH jest zdominowana przez *S. xylosus*, *S. carnosus* i *S. epidermidis* [15]. Obok gronkowców izolowane są również często bakterie słabo kwaszące oraz aromatodwórcze, takie jak *E. faecium* i *E. faecalis*, które w wędlinach o wyższym pH znajdują odpowiednie warunki do wzrostu [19]. Gram-dodatnie ziarniaki greckich wędlin fermentowanych to przede wszystkim *S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. equorum*, *S. vitulinus* i *S. succinus* [12]. Przeprowadzone w niniejszej pracy badania umożliwiły lepsze poznanie środowiska bytowania i możliwości biochemiczne drobnoustrojów o cechach denitryfikujących, aromatyzujących i kwaszących, to jest bakterii kwasu mlekowego oraz Gram-dodatnich, koagulazo-ujemnych ziarniaków.

Wnioski

1. W surowych wędlinach dojrzewających, poza gronkowcami, które stanowią 56,3 % oznaczonych Gram-dodatnich ziarniaków, stwierdza się wzrost enterokoków, a udział wynosi ponad 26 %. Wszystkie wyizolowane z wędlin szczepy rodzaju *Staphylococcus* są katalazo-ujemne.
2. Umiejętności rozkładania tryptofanu nie wykazuje część szczepów gronkowców i 100 % szczepów *Enterococcus faecium*, *Aerococcus viridans*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter pittii*, *Serratia liquefaciens*, *Kocuria kristinae* i *Weisella viridescens*. Spośród wszystkich oznaczonych szczepów tylko część rozkłada kazeinę (*S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *E. faecium* i *E. faecalis*).
3. Za wyjątkiem jednego szczepu *Bacillus* sp. oznaczone drobnoustroje nie wykazują cech chorobotwórczości. Szczepy *Staphylococcus* sp. wykazują wrażliwość na działanie polimyksyny B, bacytracyny (za wyjątkiem *S. simulans*), nowobiocyny (tylko *S. equorum* i *S. warneri*) i wibriostatycznego czynnika 0/129 (tylko *S. equo-*

rum, *S. xylosum*, *S. saprophyticum* i *S. warneri*). Ponad 93 % szczepów *S. equorum* jest odpornych na obecność optochiny w podłożu. Rodzaje *Aerococcus* sp. oraz *Micrococcus* sp. są wrażliwe na działanie polimyksyny B oraz bacytracyny. *Micrococcus luteus* wykazuje dodatkowo wrażliwość na nowobiocynę, optochinę oraz wibriostatyczny czynnik 0/129.

Praca badawcza finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu nr N N312305740 oraz dotacji przyznanej przez MNiSzW na działalność statutową DS-3705/1/KPPZ/2018.

Literatura

- [1] Babic I., Markov K., Kovacevic D., Trontel A., Slavica A., Dugum J., Cvek D., Svetec I., Posavec I., Frece J.: Identification and characterization of potential autochthonous starter cultures from a Croatian "brand" product "Slovonski kulen". *Meat Sci.*, 2011, 88 (3), 517-524.
- [2] Bagdatli A., Kundakci A.: Optimization of compositional and structural properties in probiotic sausage production. *J. Food Sci. Technol.*, 2016, 53 (3), 1679-1689.
- [3] Bedia M., Mendez L., Banon S.: Evaluation of different starter cultures (Staphylococci plus Lactic Acid Bacteria) in semi-ripened salami stuffed in swine gut. *Meat Sci.*, 2011, 87 (4), 381-386.
- [4] Bonomo M., Ricciardi A., Zotta T., Sico M., Salzano G.: Technological and safety characterization of coagulase-negative staphylococci from traditionally fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy). *Meat Sci.*, 2009, 83 (1), 15-23.
- [5] Bourdichon F., Casaregola S., Farrokh C., Frisvad J.C., Gerds M.L., Hammes W.P., Harnett J., Huys G., Laulund S., Ouwehand A., Powell I.B., Prajapati J.B., Seto Y., Ter Schure E., Van Boven A., Vankerckhoven V., Zgoda A., Tuijelaars S., Hansen E.B.: Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, 154 (3), 87-97.
- [6] Casquete R., Benito M., Martin A., Ruiz-Moyano S., Hernandez A., Cordoba M.: Effect of autochthonous starter cultures in the production of "salchichon", a traditional Iberian dry-fermented sausage, with different ripening processes. *LWT- Food Sci. Technol.*, 2011, 44 (7), 1562-1571.
- [7] Duskova M., Kamenik J., Karpiškova R.: *Weissella viridescens* in meat products – a review. *Acta Vet. Brno*, 2013, 82 (3), 237-241.
- [8] Fonseca S., Cachaldora A., Gómez M., Franco I., Carballo J.: Effect of different autochthonous starter cultures on the volatile compounds profile and sensory properties of Galician chorizo, a traditional Spanish dry fermented sausage. *Food Control*, 2013, 33 (1), 6-14.
- [9] Fonseca S., Cachaldora A., Gomez M., Franco I., Carballo J.: Monitoring the bacterial population dynamics during the ripening of Galician chorizo, a traditional dry fermented Spanish sausage. *Food Microbiol.*, 2013, 33 (1), 77-84.
- [10] Franz C., Huch M., Abriouel H., Holzapfel W., Galvez A.: Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, 151 (2), 125-140.
- [11] Iacumin L., Manzano M., Comi G.: Catalase-positive cocci in fermented sausage: Variability due to different pork breeds, breeding systems and sausage production technology. *Food Microbiol.*, 2012, 29 (2), 178-186.
- [12] Janssens M., Myter N., de Vuyst L., Leroy F.: Species diversity and metabolic impact of the microbiota are low in spontaneously acidified Belgian sausages with an added starter culture of *Staphylococcus carnosus*. *Food Microbiol.*, 2012, 29 (2), 167-177.

- [13] Kurta S., Zorbab O.: The effects of ripening period, nitrite level and heat treatment on biogenic amine formation of “sucuk” – A Turkish dry fermented sausage. *Meat Sci.*, 2016, 82 (2), 179-184.
- [14] Leroy S., Lebert I., Chacornac J.P., Chavantb P., Bernardib T., Talon R.: Genetic diversity and biofilm formation of *Staphylococcus equorum* isolated from naturally fermented sausages and their manufacturing environment. *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, 134 (1-2), 46-51.
- [15] Leroy S., Giammarinaro P., Chacornac J.P., Lebert I., Talon R.: Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small-scale processing units. *Food Microbiol.*, 2010, 27 (2), 294-301.
- [16] Li P., Kong B., Chen Q., Zheng D., Liu N.: Formation and identification of nitrosylmyoglobin by *Staphylococcus xylosum* in raw meat batters: A potential solution for nitrite substitution in meat products. *Meat Sci.*, 2013, 93 (1), 67-72.
- [17] Lucke F.K.: Quality improvement and fermentation control in meat products. In: *Advances in Fermented Foods and Beverages. Improving Quality, Technologies and Health Benefits*. Ed W.H. Holzapfel. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge 2015, pp. 357-376.
- [18] Marty E., Bodenmann C., Buchs J., Hadorn R., Eugster-Meier E., Lacroix C.: Prevalence of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci from spontaneously fermented meat products and safety assessment for new starters. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, 159 (2), 74-83.
- [19] Talon R., Leroy S.: Diversity and safety hazards of bacteria involved in meat fermentations. *Meat Sci.*, 2011, 89 (3), 303-309.
- [20] Tamang J.P., Watanabe K., Holzapfel W.H.: Review: Diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front. Microbiol.*, 2016, 7 (377), 1-28.
- [21] Węsierska E., Korzekwa K., Foks S., Mickowska B.: Influence of microflora composition on safety and colour parameters of “kumpia wieprzowa” during ripening. *Pol. J. Veter. Sci.*, 2013, 16 (2), 299-305.
- [22] Węsierska E., Szoltyś M., Rak L.: Physico-chemical, biochemical and microbiological properties of traditional Polish pork fermented products during ripening. *Food Bioproc. Technol.*, 2013, 6, 2986-2995.
- [23] Węsierska E.: Wyroby dojrzewające w słońcu Podlasia. *Przem. Spoż.*, 2014, 68 (11), 38-39.
- [24] PN-EN ISO 7218:2008. Mikrobiologia żywności i pasz. Wymagania ogólne i zasady badań mikrobiologicznych.
- [25] PN-EN ISO 6887-2:2017-05. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Przygotowanie próbek do badań, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Część 2: Specyficzne zasady przygotowania mięsa i przetworów mięsnych.

EVALUATION OF QUANTITATIVE AND QUALITATIVE COMPOSITION OF MICROFLORA OF RAW RIPENED MEATS WITH MODERN DIAGNOSTIC METHODS

S u m m a r y

The objective of the study was to identify the acidifying and denitrifying microflora of raw ripened meats in the Podlasie region. On the basis of morphological differences of the colonies, representative strains were isolated and identified using selective-differentiating media and microbiological tests including MALDI TOF MS Biotyper and Vitek® 2 systems. The most strongly represented group were Gram-positive cocci, which constituted 88.5 % of all the identified bacteria. The percent amount of individual types in this group was as follows: 56,3 % – *Staphylococcus* sp., 26 % – *Enterococcus* sp., 3,1 % – *Weissella* sp., 14,6 % – other. In the pool of the staphylococci marked, the individual species amounted to, respectively: 18,7 % – *S. equorum*, 11,5 % – *S. saprophyticus*, 16,7 % – *S. xylosum*, 6,2 % – *S. warneri*, 1,1 % –

S. vitulinus, 1,1 % – *S. gallinarum* and 1 % – *S. simulans* and *S. hominis* ssp. *novobiosepticus*. Two species were identified within the genus *Enterococcus*: *E. faecium* (22.9 %) and *E. faecalis* (3.1 %). Almost 98 % of the tested strains did not show pathogenicity – there were found no haemolytic abilities, no presence of CF factor, and no bacterial cytochrome oxidase. *Staphylococcus* spp. strains were sensitive to polymyxin B (100 %) and bacitracin (> 60 %). The strains of *Enterococcus* sp. identified by a Vitek® 2 system showed resistance to all the suggested antibiotics. The marked bacteria were a physiological microflora in humans and animals; raw materials for the production of sausages were obtained from them or they were associated with the breeding environment.

Key words: raw ripened meats, microflora, identification, resistance to antibiotics ☒