



Rannsóknastofnun
fiskiðnaðarins

14. RIT

ÞOLNI *ESCHERICHIA COLI* OG *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Í SÖLTUÐU FISKHAKKI

BIRNA GUÐBJÖRNSDÓTTIR

HANNES MAGNÚSSON

OKTÓBER 1989

Rannsóknastofnun
fiskiðnaðarins
Pósthólf 1390
Skúlagötu 4
121 Reykjavík
s. 91-20240
Telex: Símtex ís 3000
Telefax: 91-623790
Nnr. 7264-8242

Rannsóknastofnun
fiskiðnaðarins
Pósthólf 814
602 Akureyri
s. 96-25725

Rannsóknastofnun
fiskiðnaðarins
Pósthólf 64
Suðurgötu 2
400 Ísafjörður
s. 94-3768

Rannsóknastofnun
fiskiðnaðarins
Pósthólf 151
740 Neskaupstaður
s. 97-7250

Rannsóknastofnun
fiskiðnaðarins
Pósthólf 130
902 Vestmannaeyjar
s. 98-11471

TITILL:	RIT NR.: 14
POLNI <u>ESCHERICHIA COLI</u> OG <u>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</u> Í SÖLTUÐU FISKHAKKI	DAGS.: OKT. 1989
	BLS. FJÖLDI: 10
HÖFUNDUR (-AR):	VERKNÚMÉR:
BIRNA GUÐBJÖRNSDÓTTIR HANNES MAGNÚSSON	87.501
VERKKAUPI/SAMSTARFSADILI:	<input checked="" type="checkbox"/> : OPIÐ <input type="checkbox"/> : LOKAÐ
	LOKAÐ Í:

ÁGRIP:

Markmið þessara rannsókna var að athuga þolni *Escherichia coli* og *Staphylococcus aureus* í söltuðu umhverfi. Þessum gerlum var sáð í mismunandi saltað fiskhakk (5,10,15 og 20%) í tveimur upphafsstyrkjum 10^3 og 10^6 /g). Mengað fiskhakk var geymt við 5°C og fylgst með fjölda þessara gerla í 62 (*S.aureus*) og 100 daga (*E. coli*). Í ljós kom að þessir gerlar gátu lifað í margar vikur í söltuðu hakki þó svo að þeir hafi ekki náð að fjölga sér. Þannig voru *E. coli* gerlar enn lifandi eftir 100 daga geymslu við 5°C í 20% söltu hakki. Lífslíkur þessara gerla virtust fara þverrandi eftir því sem minna salt var notað, líklega vegna samkeppni frá öðrum örverum. Eftir 62 daga geymslu við 5°C voru *S. aureus* sýklar enn lifandi í 3 tilraunahópum af 4. Reikna má með að við útvötnun á söltuðum fiski gætu skapast skilyrði fyrir vöxt þessara og skyldra gerla. Þessar niðurstöður sýna því að ástæða er til að gæta fyllsta hreinlætis við vinnslu og verkun á söltuðum fiski.

EÐLI RITSMÍÐAR:

: YFIRLITSGREIN
: EIGIN RANNSÓKN R.F.
: UMBEÐIN RANNSÓKN
: FRÆÐSLUGREIN/KENNSLUEFNI
: ANNAD

STIKKORÐ (3-5 ORÐ):	Polni
Saltfiskur	Gerlar
Sýklar	

EFNISYFIRLIT

	bls.
1. INNGANGUR	1
2. FRAMKVÆMD	1
2.1. Tilhögun tilraunar	1
2.1.1. Athugun á <i>Escherichia coli</i>	2
2.1.2. Athugun á <i>Staphylococcus aureus</i>	2
2.2. Örverutalningar	2
2.2.1. Ákvörðun á fjölda <i>E. coli</i> með MPN- aðferð	2
2.2.2. Ákvörðun á fjölda <i>S. aureus</i>	2
2.3. Aðrar mælingar	3
2.3.1. Vatnsinnihald	3
2.3.2. Saltinnihald	3
3. NIÐURSTÖÐUR	4
3.1. Saltinnihald	4
3.2. Þolni <i>E. coli</i> í missöltu fiskhakki	6
3.3. Þolni <i>S. aureus</i> í missöltu fiskhakki	6
3.4. Samanburður á þolni <i>E. coli</i> og <i>S. aureus</i>	6
4. UMRÆÐA	10
HEIMILDASKRÁ	10

1. INNGANGUR

Söltun er ævagömul geymsluaðferð og er ein hinna hefðbundnu rotvarnaaðferða á matvælum. Rotvörnin byggist á því að minnka nýtanlegt vatn fyrir örverur og draga þannig úr eða stöðva vöxt þeirra. Salt hefur mismikil áhrif á hinar ýmsu örverur. Þannig eru til örverur sem vaxa ekki í návist salts (ósaltkærar) og aðrar sem vaxa ekki nema salt sé til staðar (saltkærar). Sumar örverur þurfa allt að 10-15% salt til vaxtar. Hér má nefna sem dæmi gerla af ættkvísl *Halobacterium* en þeir valda roða á saltfiski. Fjölmargir gerlar m.a. allir sýklar geta ekki vaxið í blautverkuðum saltfiski en algengt er að slíkur fiskur innihaldi 17-20% salt. Hins vegar finnast ekki margar heimildir um þolni sýkla í söltuðum fiski.

Í tilraunum sem gerðar voru í Kanada í kringum 1940 kom fram að *Salmonella typhi* (áður nefnd *Eberthella typhosa*) var enn á lífi í saltfiski eftir 22 daga geymslu við 5-6°C og lifði á saltagar í allt að 94 daga. *Escherichia coli* fannst enn í saltfiski eftir 72 daga geymslu við 5-6°C og lifði á saltagar í allt að 91 dag. (1)

Bæði sýklar og aðrar óæskilegar örverur geta borist í saltaðan fisk með menguðu vinnsluvatni, frá starfsfólki og frá illa þrifnu vinnsluumhverfi. Ef óæskilegar örverur geta lifað um lengri eða skemmri tíma í söltuðum fiski, eru líkur á að þær nái að fjölga sér í fiskinum eftir útvötnun og mögulega valdið þannig skaða.

Tilgangur þessara rannsókna var að kanna þolni *Escherichia coli* og *Staphylococcus aureus* í missöltu fiskhakki við 5°C. Tegundin *E. coli* finnst í saur manna og dýra með heitt blóð en saur er einmitt ein aðalsmitleið sýkla. Þannig eru miklar líkur á að í matvælum sem innhalda *E. coli*, leynist einnig sýklar. Tegundin *S. aureus* lifir m.a. í nefi og á hörundi fólks og getur hún valdið matareitrun.

2. FRAMKVÆMD

2.1. Tilhögun tilraunar.

Í upphafi var athugaður fjöldi gerla í ml af seyði með þéttvaxinni hreinrækt af þeim stofnum sem átti að rannsaka þ.e. *E. coli* og *S. aureus*. Stofni úr ísskáp var sáð í Nutrient broth (Difco) og ræktaður við 35°C í 48 klst. Síðan var 0.1 ml af þessari rækt sáð í 50 ml Nutrient broth og ræktað í 72 klst. við 35°C. Fjöldinn var síðan ákvarðaður í þessari rækt.

Nýr þorskur (*Gadus morhua*) var fenginn úr fiskbúð. Fiskurinn var flakaður og hakkaður við mjög hreinlegar aðstæður. Þá var fiskhakkinu skipt í 8 200g skammta og salti og gerlum blandað saman við. Notaðir voru 4 mismunandi saltstyrkir 5, 10, 15 og 20% og tveir upphafsstyrkir af gerlum 10^3 og 10^6 /g. Þannig var

t.d. blandað saman 10g af salti og 190g af hakki til þess að fá 5% salt hakk. Fiskhakkið sem búið var að salta og menga var síðan geymt við 5°C.

2.1.1. Athugun á *Escherichia coli*.

Óblandað hakk var athugað með tilliti til upphafs fjölda gerla *E. coli* í hakkinu. Blandað hakk var síðan sett í *E. coli*-próf til að ákveða fjölda þeirra gerla sem sáð var í hakkið. Á 3. degi var gert *E. coli*-próf ásamt saltmælingu. Síðan voru sýni tekin með ákveðnu millibili meðan hakkið entist. Tilraunin stóð yfir í ca. 14 vikur (100 daga). Rúmur mánuður leið á milli næstsíðasta og síðasta sýnis.

2.1.2. Athugun á *Staphylococcus aureus*.

Þessi hluti tilraunarinnar var framkvæmdur á sama hátt og *E. coli* hlutinn nema að nú var hakkið mengað með *Staphylococcus aureus* og sýnið ræktað á *Staphylococcus medium 110* (Difco). Þessi athugun stóð yfir í ca. 9 vikur (62 daga). Nú var einnig mæld vatnsprósenta til að fá hugmynd um % salt í vatnsfasa.

2.2. Örverutalningar.

Við örverurannsóknir voru notaðar aðferðir Speck (1976) (2). Af hakki voru 11g vigtuð og blandað í 99 ml af Butterfield's buffer. Þannig fékkst 1/10 þynning sem síðan var sáð á skálar eða í glös eftir því hvað var verið að rannsaka.

2.2.1. Ákvörðun á fjölda *E. coli* með MPN-aðferð.

Notað var ætið Lauryl Sulfate Tryptose broth (LST) (Difco). Þriggja glasa röð var notuð fyrir hverja þynningu. Sáð var 10 ml af 1/10 þynningu (þ.e. 1 gramm eða 1/1 þynning) í 10 ml af LST í tvöföldum styrkleika og 1 ml af 1/10, 1/100 og 1/1000 þynningu í 10 ml af einföldu LST. Lesið var af glösum eftir 24 og 48 klst. ræktun við 35°C. Úr öllum jákvæðum LST-glösum (þ.e. ef myndast gas) var lykkjufylli sáð í *E. coli* broth (E.C. medium, Difco). Ræktun fór fram við 44.5°C ± 0.2°C í vatnsbaði og var lesið af glösum eftir 24 klst. Öll EC-glösin sem sýndu loftmyndun eftir 24 klst. við 44.5°C voru talin jákvæð. Engin nánari staðfestingarpróf voru gerð.

2.2.2. Ákvörðun á fjölda *S. aureus*.

Notað var ætið *Staphylococcus medium 110* (Difco) blandað eggjarauðum og Brain Heart infusion (BHI) (2 eggjarauður + 100 ml BHI sett í 900 ml af medium 110).

Yfirborðssáning á skálar var sú aðferð sem notuð var í þessu tilfalli. Ætinu var hellt á skálar og látið storkna. Síðan var sýninu valtað um yfirborð agarins með

dauðhreinsuðum glerstaut til þess að stuðla að jafnri dreifingu. Ræktað var við 35°C í 72 klst.

Að aflokinni ræktun var hluti af þeim kólóníum sem var einkennandi fyrir *S. aureus* rannsakaður með tilliti til coagulase-virkni.

Þetta próf var framkvæmt á eftirfarandi hátt:

1. Grunsamlegum kólóníum af medium 110 var sáð í lítil glös sem innihalda 0.3 ml af brain heart infusion æti.
2. Ræktað var í hitaskáp við 35°C í 24 klst.
3. 0.5 ml af coagulase plasma (með EDTA) var bætt í ræktina og glösin hrist vel. Ræktað var áfram við 35°C og lesið af glösunum eftir 2, 4 og 6 klst. og athugað hvort innihald hleypur. Ef innihaldið hleypur þá bendir það til þess að *S. aureus* hafi verið til staðar.

2.3. Aðrar mælingar.

2.3.1. Vatnsinnihald.

Af saltfiskhakkinu voru vigtuð ca 5g og þurrkað við 100°C í minnst 4 klst. Sýni voru látin kólna í 20 mín. í "desiccator" áður en lokabyngd var skráð.

2.3.2. Saltinnihald.

Af salthakkinu voru vigtuð 5g og blandað í 100 ml eimað vatn og var síðan mælt samkvæmt Volhard aðferð.

Þessar mælingar voru síðan notaðar til að fá fram % salt í vatnsfasa samkvæmt formúlunni:

$$\frac{\% \text{ salt} \times 100}{\% \text{ salt} + \% \text{ vatn}} = \% \text{ salt í vatni}$$

3. NIÐURSTÖÐUR

3.1. Saltinnihald.

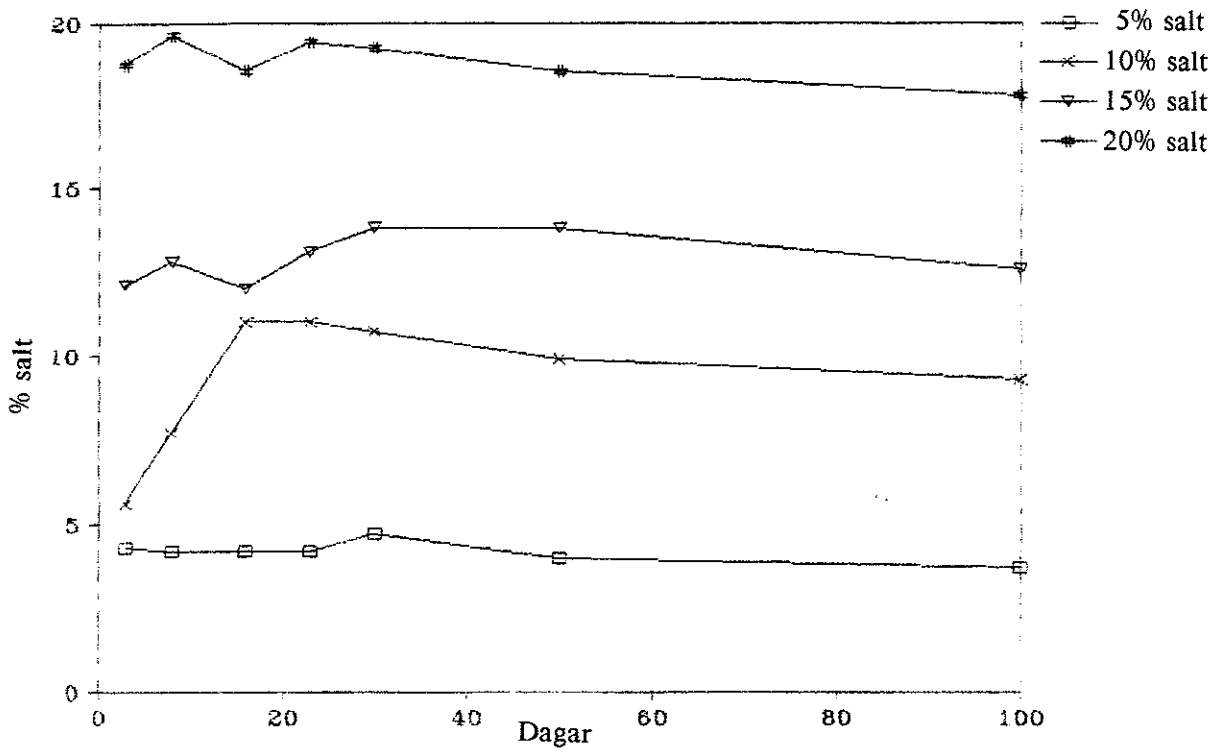
Í töflu 1 eru sýnd meðaltalsgildi saltmælinga yfir geymslutímann að undan-skyldum mælingum sem gerðar voru eftir 3 daga frá blöndun. Vatnsmælingar voru gerðar yfir geymslutímann í tilraun með *S. aureus* til þess að finna saltmagn í vatns-fasa hakksins. Þessar niðurstöður eru einnig sýndar í töflu 1.

Tafla 1. Meðalsaltinnihald yfir geymslutímann.

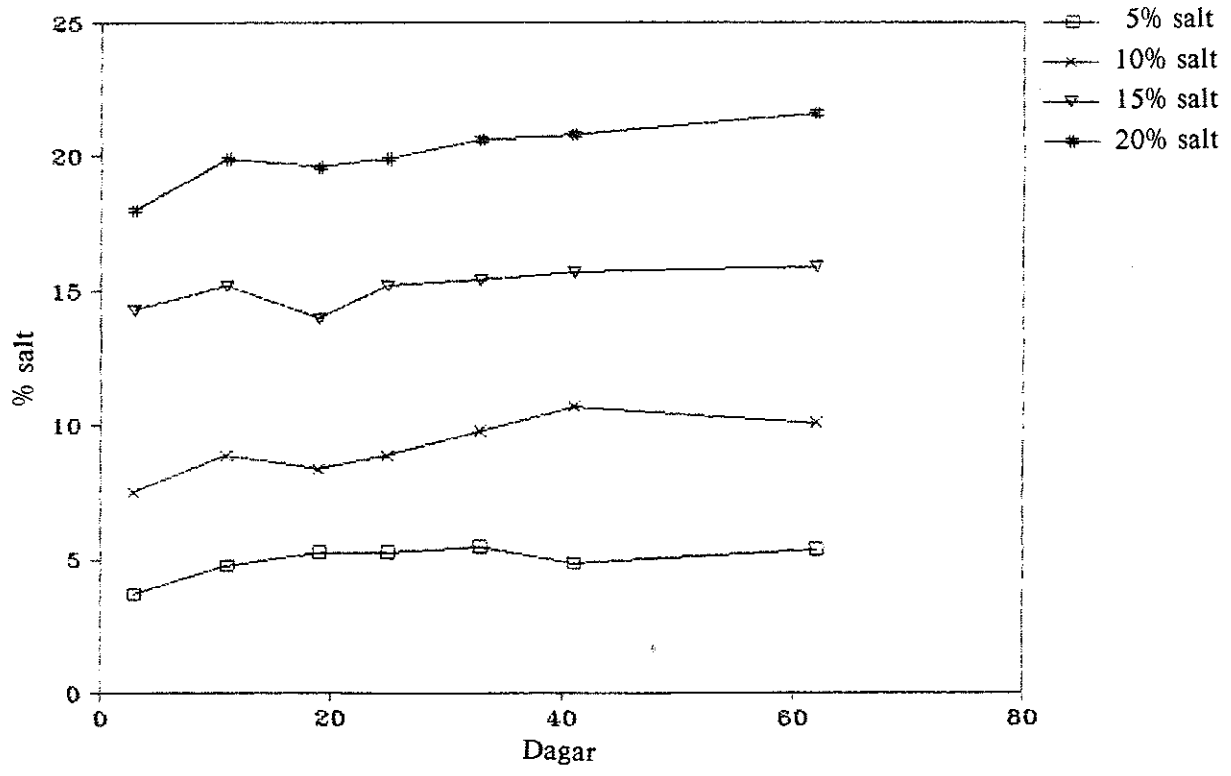
Áætlað saltmagn	Tegund	Upphafsfjöldi: $10^3/g$		Upphafsfjöldi: $10^6/g$	
		% salt (x)	% salt í vatnsfasa (x)	% salt (x)	% salt í vatnsfasa (x)
5% salt	<i>E. coli</i>	4,2	-	3,6	-
10% salt	<i>E. coli</i>	9,9	-	7,1	-
15% salt	<i>E. coli</i>	13,0	-	11,9	-
20% salt	<i>E. coli</i>	18,8	-	17,5	-
5% salt	<i>S. aureus</i>	5,0	6,5	5,1	6,3
10% salt	<i>S. aureus</i>	9,5	11,9	9,8	12,1
15% salt	<i>S. aureus</i>	15,2	18,7	15,1	18,5
20% salt	<i>S. aureus</i>	20,4	24,6	19,8	23,9

Á myndum 1 og 2 eru sýndar niðurstöður saltmælinga yfir geymslutímann þar sem upphafsfjöldi gerla var $10^3/g$. Almenn virtist sem saltinnihald væri komið í jafnvægi eftir 8-11 daga. Eftir þann tíma var saltmagnið stöðugt í flestum tilfellum. Ekki er ljóst hvers vegna saltmagn í hakki með *E. coli* var að meðaltali lægra þegar upphafsfjöldi var $10^6/g$ (sjá töflu 1).

Mikilvægt er að hafa ofangreindar salttölur í huga þegar niðurstöður eru skoðaðar en hér á eftir eru tilraunahóparnir nefndir með því saltmagni, sem reynt var að ná í upphafi, þ.e. 5, 10, 15 og 20% salt.



Mynd 1. Niðurstöður saltmælinga í tilraun með *E. coli* (upphafs fjöldi $10^3/g$).



Mynd 2. Niðurstöður saltmælinga í tilraun með *S. aureus* (upphafs fjöldi $10^3/g$).

3.2. Þolni *E. coli* í missöltu fiskhakki.

Niðurstöður talninga á *E. coli* eru sýndar á mynd 3a (upphafs fjöldi $10^6/g$) og 3b (upphafs fjöldi $10^3/g$). Á mynd 3a kemur fram að eftir 30 daga geymslu við $5^{\circ}C$ var *E. coli* enn lifandi í öllum tilraunahópum. Eftir 50 daga einangraðist *E. coli* úr 10, 15 og 20% söltu hakki og eftir 100 daga eingöngu úr 20% söltu hakki.

Á mynd 3b kemur fram að eftir 23 daga geymslu var *E. coli* enn lifandi í öllum tilraunahópum. Eftir 30 daga var nokkurt magn *E. coli* til staðar í 10 og 20% söltu hakki en örlítill vottur ($<1/g$) í 5 og 15%. Eftir 50 daga var *E. coli* enn allsprækur í 20% söltu hakki, en fjöldinn var mjög lítill ($<1/g$) í 10 og 15% söltu hakki. Í 5% hakki fannst *E. coli* ekki á þessum tíma. Eftir 100 daga fannst *E. coli* eingöngu í 20% söltu hakki en í mjög litlu magni ($<1/g$).

Almennt virtist, sem lifslíkur *E. coli* færu þverrandi eftir því sem minna salt var notað, líklega vegna samkeppni frá öðrum örverum. Einnig virtust lifslíkur *E. coli* meiri þegar upphafs fjöldi var mikill ($10^6/g$). Þó skal haft í huga að meðal-saltinnihald var að öllu jöfnu nokkru lægra í þessum tilraunahópi.

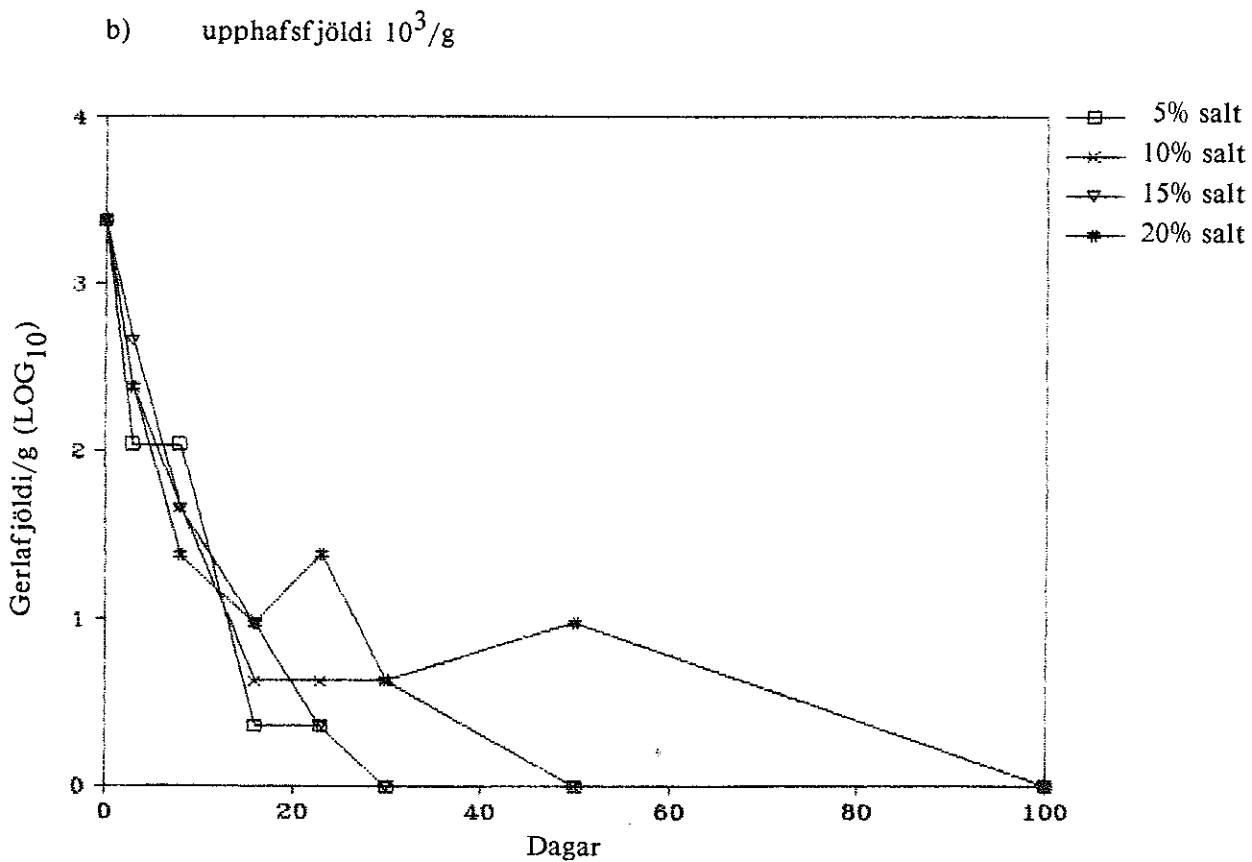
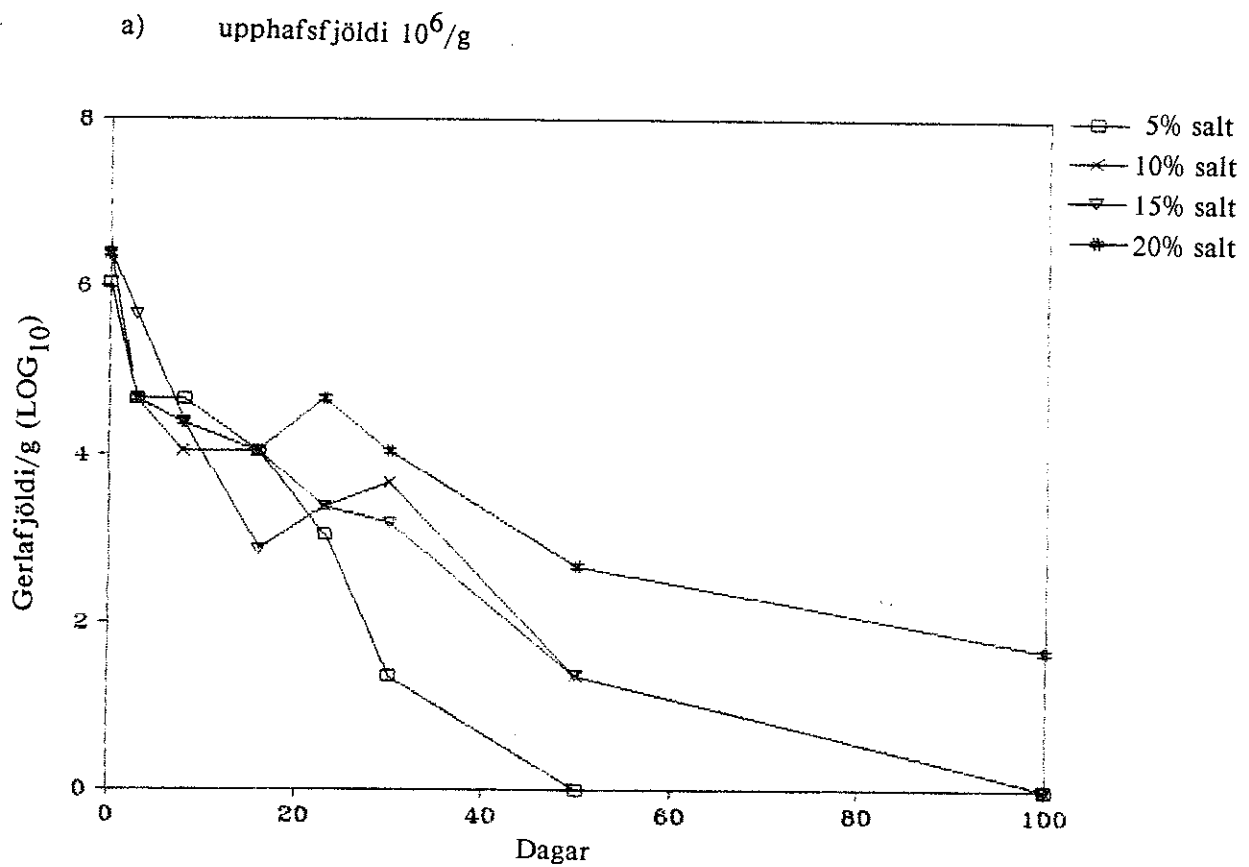
3.3. Þolni *S. aureus* í missöltu fiskhakki.

Niðurstöður talninga á *S. aureus* eru sýndar á mynd 4a (upphafs fjöldi $10^6/g$) og 4b (upphafs fjöldi $10^3/g$). Á mynd 4a kemur fram að eftir 41 dags geymslu við $5^{\circ}C$ var *S. aureus* enn lifandi í öllum tilraunahópunum. Í lok geymslutímans (62 dagar) fannst *S. aureus* enn í 3 tilraunahópum af 4 (5, 15 og 20% salt).

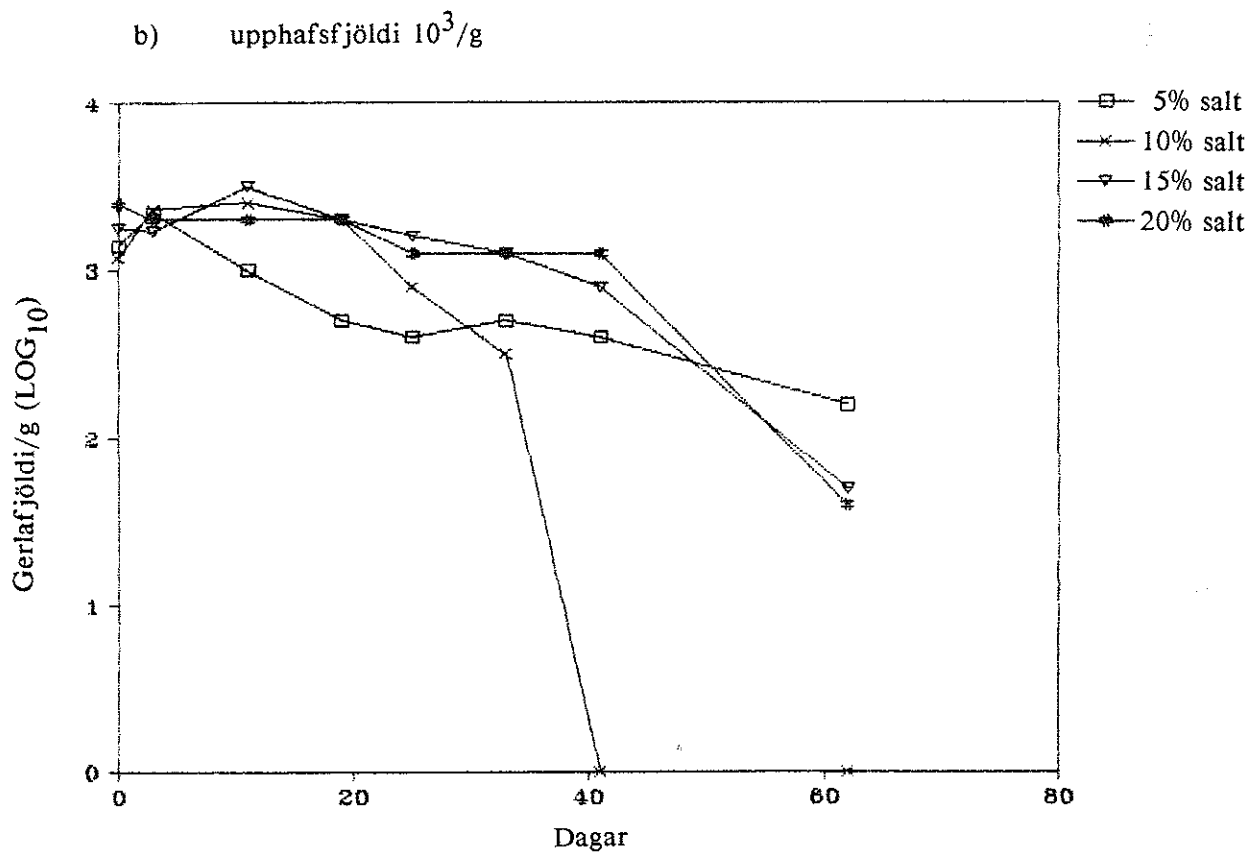
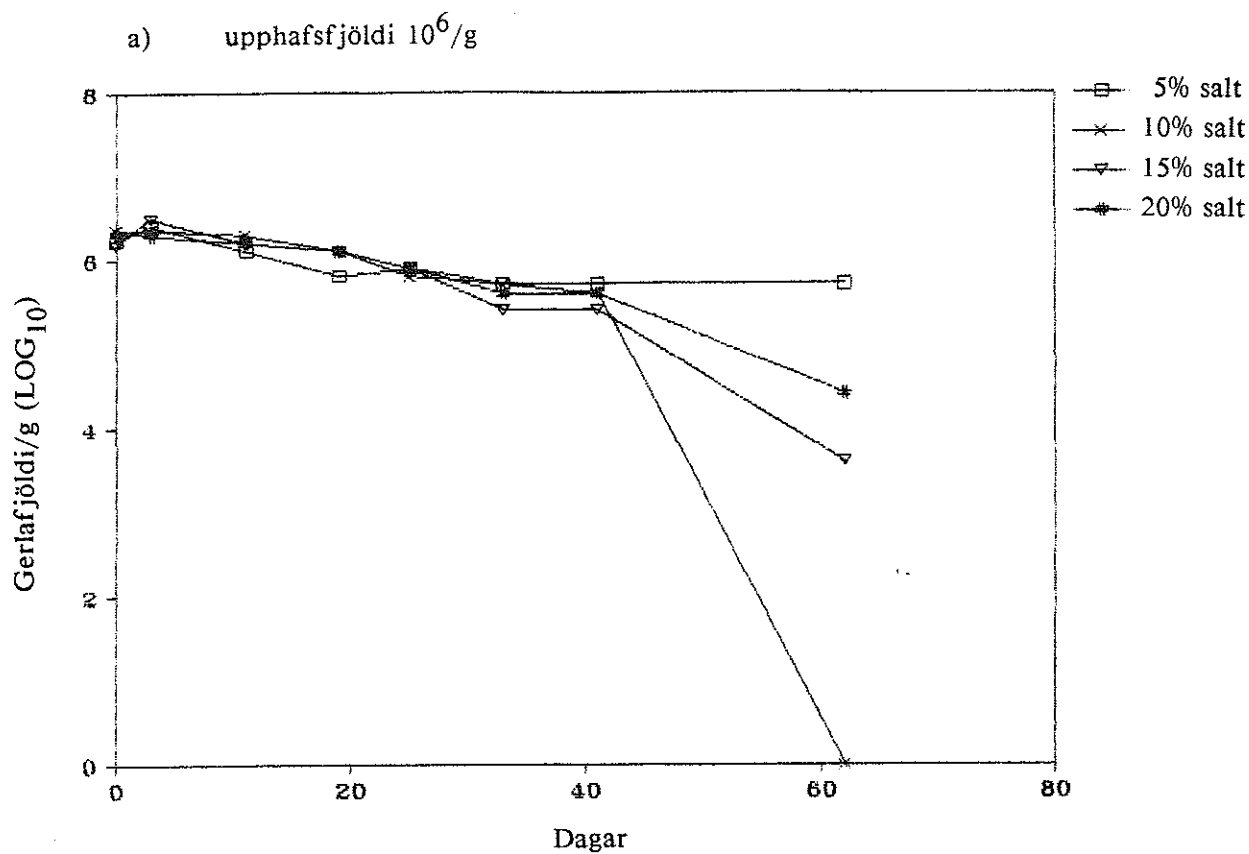
Á mynd 4b kemur fram að eftir 41 og 62 daga geymslu fannst *S. aureus* í öllum tilraunahópum nema í hakki með 10% salti. Ekki liggur ljóst fyrir hvers vegna *S. aureus* virtist eiga erfiðar uppdráttar í 10% söltu hakki en í öðrum hópum. Mikill yfirvöxtur annara örvera var mjög ríkjandi í þessum saltstyrk og líklegt er að þessi flóra hafi annað hvort leynt kólóníum *S. aureus* eða hindrað vöxt hans.

3.4. Samanburður á þolni *E. coli* og *S. aureus*.

Á mynd 5 er sýndur samanburður á þolni *E. coli* og *S. aureus* í 5% (a) og 20% (b) söltu fiskhakki. Vitað er að *S. aureus* er saltþolinn og geta flestir stofnar vaxið við 10% NaCl séu önnur vaxtarskilyrði hagstæð (3). Í þessari tilraun var hakkið geymt við $5^{\circ}C$ en *S. aureus* vex ekki við það hitastig. Samkvæmt þessum niðurstöðum var saltþolni *S. aureus* mun meiri en *E. coli*.

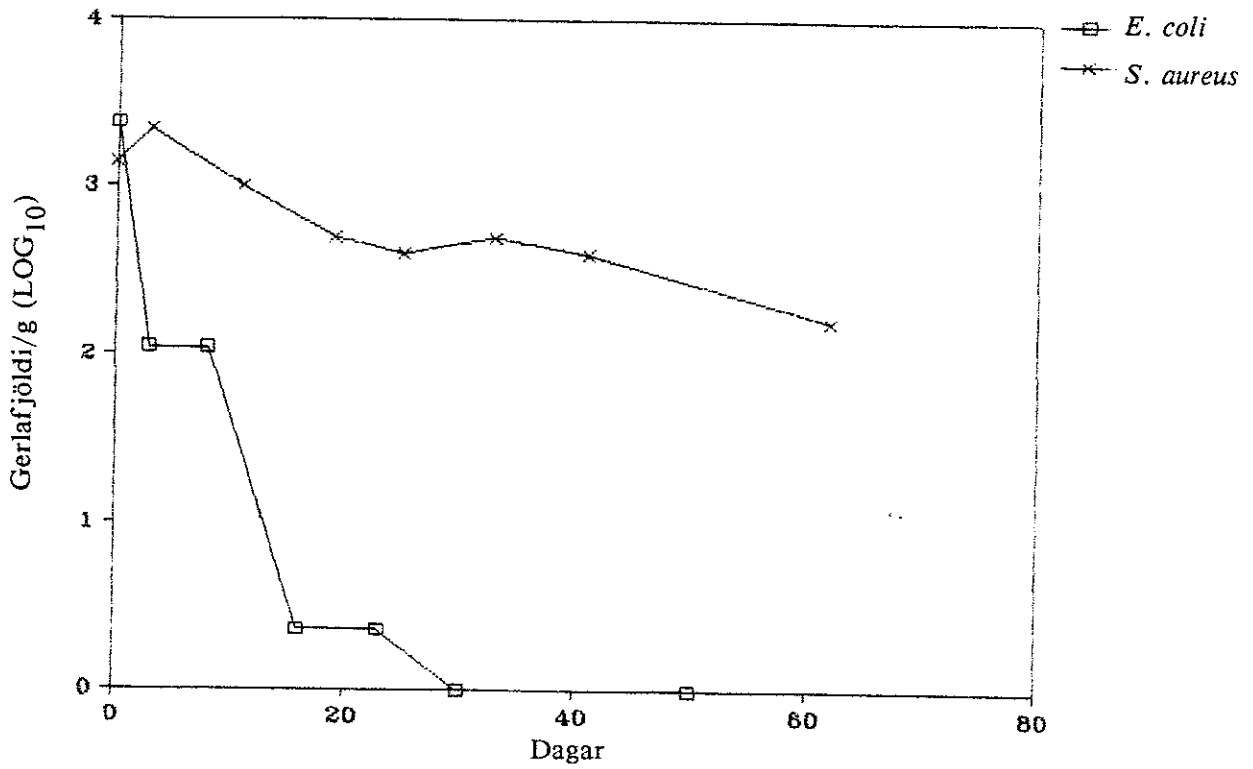


Mynd 3. Þolni *E. coli* í missöltu fiskhækki.

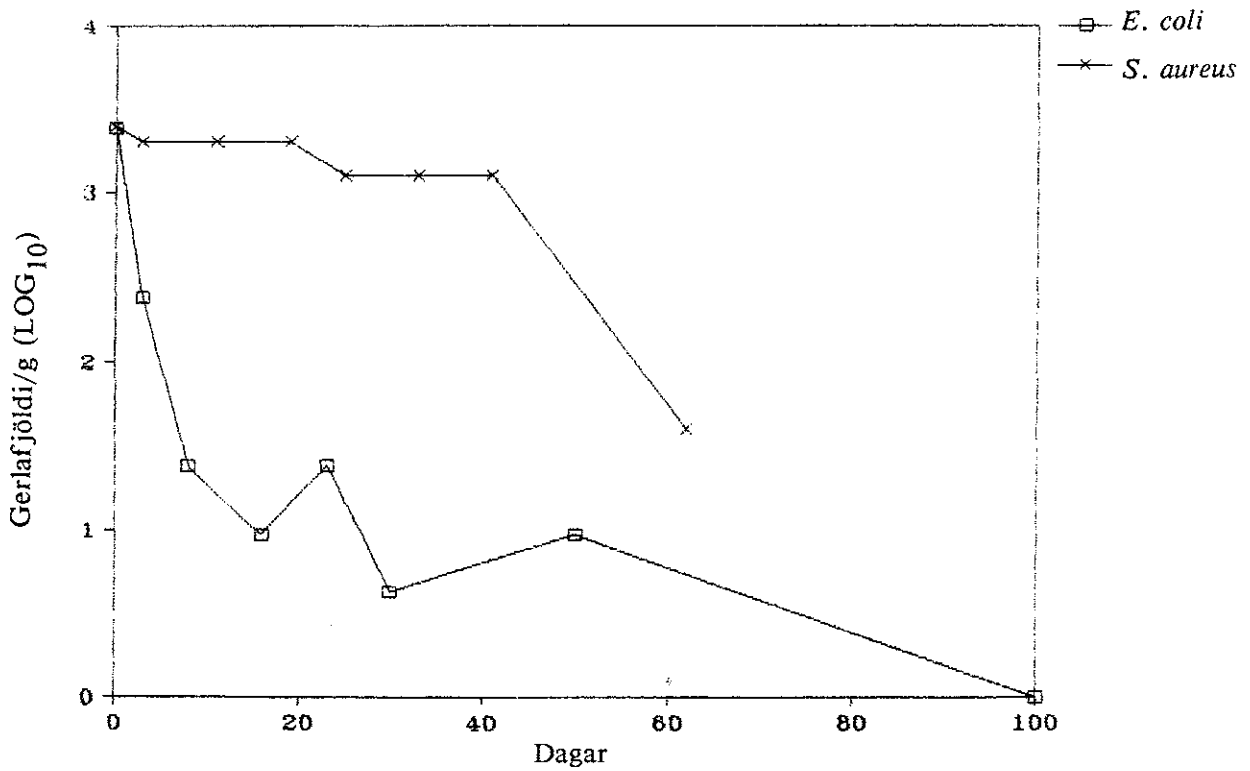


Mynd 4. Þolni *S. aureus* í missöltu fiskhakki.

a) 5% salt hakk



b) 20% salt hakk



Mynd 5. Vöxtur *E. coli* og *S. aureus* í 5 og 20% söltu fiskhækki (upphafs fjöldi 10^3 /g).

4. UMRÆÐA OG ÁLYKTANIR

Í heild sýna niðurstöður þessarar rannsóknar að *Staphylococcus aureus* og *Escherichia coli* geti lifað í söltu fiskhakki svo vikum skiptir.

S. aureus lifir á hörundi, í nefi manna og einnig í sárum sem ígerð hefur komist í svo og í graftarbólum. Þessi sýkill á því greiðan aðgang að matvælum sé ekki vel að gætt.

E. coli finnst í saur manna og dýra með heitt blóð. Í saur geta einnig leynst hættulegir sýklar. Finnist *E. coli* í matvælum er fullvíst að þau hafi komist í snertingu við saur, beint eða óbeint og þannig er líklegt að saurmenguð matvæli innihaldi einnig sýkla. *E. coli* getur borist í matvæli frá menguðu vinnsluvatni og eins beint frá starfsfólki ef ekki er gætt fyllsta hreinlætis eftir salernisferðir. Einnig geta þeir borist með mávum og rottum í vinnsluumhverfi. Sóðalegt umhverfi t.d. rotnandi fiskúrgangur laðar að sér þessi dýr og eykur líkurnar á því að sýklar geti borist inn í vinnsluhúsið t.d. með lyfturum og skófatnaði.

Ljóst er að söltun sem geymsluáferð er engin trygging fyrir því að sýklar drepist. Gera má ráð fyrir að við útvötnun á söltuðum fiski eins og saltfiski og saltsild geti sýklar náð að vaxa og mögulega sýkt neytendur.

Full ástæða er því til að gæta fyllsta hreinlætis við vinnslu og verkun á söltuðum sjávarafurðum.

HEIMILDASKRÁ

- (1) Frank, M. & Hess, E. (1940). Survival of *Eberthella typhosa* and *Escherichia coli* on Salt Fish. J. Fish. Res. Bd. Can., 5 (3), bls. 249-252.
- (2) Speck, M.L. (ED.) (1976). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington, D.C.: American Public Health Association.
- (3) Sneath, P.H.A., ritstjóri (1986). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.



Rannsóknastofnun
fiskiðnaðarins