

Przeżywalność *Listeria monocytogenes* w serze twarogowym termizowanym

BOŻENNA STAŃCZAK, JACEK SZCZAWIŃSKI, JANINA PĘCONEK

Katedra Higieny Żywności Wydziału Weterynaryjnego SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

Stańczak B., Szczawiński J., Pęczonek J.

Survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese

Summary

Samples of cottage cheese known on the Polish market as „Grani Quark” were artificially contaminated with *L. monocytogenes* (inoculum 10^3 cells/g). Samples were tested after 0, 2, 5, 7, 10 and 14 days of storage at 10°C and after 0, 2, 3, 4, 7 and 10 days of storage at 20°C . In each sample the pH-value, aerobic plate count and number of listeria were determined. It was found that in the samples stored at 10°C the numbers of *L. monocytogenes* remained at a similar level at the beginning of incubation and then decreased. After 14 days of storage *L. monocytogenes* was not detected. In the samples stored at 20°C , the number of *L. monocytogenes* systematically decreased during storage to an undetectable level found after 10 days. T-4D values (time required for reduction of listeria by 4 log units) were calculated from regression analysis and amounted to 26.9 days for the samples stored at 10°C and 13.3 days for the samples stored at 20°C . These results were compared to theoretical ones obtained from the Pathogen Modelling Program 4.0. This program enables to predict the behaviour of *L. monocytogenes* in culture media. It seems that the microflora of cottage cheese increases the rate of *L. monocytogenes* dying during storage, particularly at 20°C .

Keywords: cottage cheese, *Listeria monocytogenes*.

Listeria monocytogenes występuje stosunkowo często w surowcach i produktach spożywczych, zwłaszcza w mleku surowym i przetworach mlecznych (7, 8, 10, 14). Wydaje się, że środowisko serów miękkich maziowych i pleśniowych jest szczególnie korzystne dla *L. monocytogenes* (3, 4). Wyniki przeprowadzonych dotychczas badań nad przeżywalnością listerii w przetworach mlecznych wykazują znaczne różnice, w zależności od rodzaju badanego produktu, jego kwasowości, liczby wprowadzanych komórek bakteryjnych, temperatury przechowywania próbek, rodzaju stosowanych opakowań i innych czynników (1, 2, 4, 5, 9, 15, 16, 19). Na podstawie własnych badań (17) stwierdzono, że przeżycie przez *L. monocytogenes* przemysłowej pasteryzacji mleka jest bardzo mało prawdopodobne, a zatem obecność tych bakterii w przetworach wyprodukowanych z mleka pasteryzowanego jest przypuszczalnie wynikiem skażeń wtórnych występujących po obróbce termicznej, np. podczas napełniania opakowań serem twarogowym w zakładach, w których nie przestrzega się dostatecznie higieny produkcji (6, 20).

Wyniki wcześniejszych badań własnych (18) wskazują, że zachowanie się *L. monocytogenes* jest w ogromnej mierze uzależnione od charakteru mikroflory występującej w danym produkcie. Podczas przechowywania próbek kefiru i jogurtu naturalnego obser-

wowano stosunkowo szybkie wymieranie w nich listerii, spowodowane zapewne antagonistycznym oddziaływaniem mikroflory towarzyszącej. A zatem zakażenia wtórne kefiru i jogurtu *L. monocytogenes* wydają się nie stwarzać większego zagrożenia dla zdrowia konsumenta. Równocześnie jednak obserwowano długą przeżywalność listerii w przechowywanych w identycznych warunkach próbkach mleka surowego pozostawionego do naturalnego zakwaszenia (18).

W badaniach przetworów mlecznych przeprowadzonych w Polsce (14, 21, 22) nie stwierdzono obecności *L. monocytogenes* w dostępnych w sprzedaży detalicznej serach topionych, serkach homogenizowanych, śmietanie, lodach i jogurcie. Wydaje się, że sery miękkie, z których najczęściej izolowano *L. monocytogenes* w innych krajach, nie były do tej pory badane. W dostępnym piśmiennictwie brak jest również informacji na temat przeżywalności lub możliwości namnażania się *L. monocytogenes* w popularnych obecnie na polskim rynku serach twarogowych poddawanych w trakcie procesu technologicznego termizacji. Zabieg ten, poprzez inaktywację znacznej części mikroflory, może ograniczać antagonistyczne oddziaływanie bakterii kwasu mlekowego w stosunku do innych drobnoustrojów i stwarzać tym samym dogodniejsze warunki do rozwoju listerii, które mogą dostać się przypadkowo do produktu po zabiegu termizacji.

Celem badań było określenie przeżywalności oraz możliwości rozwoju *L. monocytogenes* w próbkach sera twarogowego termizowanego, przechowywanych w temperaturze panującej w sklepowych ladach chłodniczych (10°C) oraz w temperaturze pokojowej (20°C).

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na serze twarogowym termizowanym, o nazwie handlowej Grani Quark, zakupionym w sklepie detalicznym. Próbkę sera o masie 10 g zakażano mieszaniną hodowli bulionowych trzech szczepów *L. monocytogenes* w ilości zapewniającej koncentrację bakterii na poziomie 10^3 komórek w 1 g sera. Szczepy użyte w badaniach zostały wyizolowane z mleka surowego w Zakładzie Higieny Produktów Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynarii w Puławach. *Inoculum* przygotowywano z 24 godzinnych hodowli w bulionie BHI (Oxoid), inkubowanych w temp. 37°C.

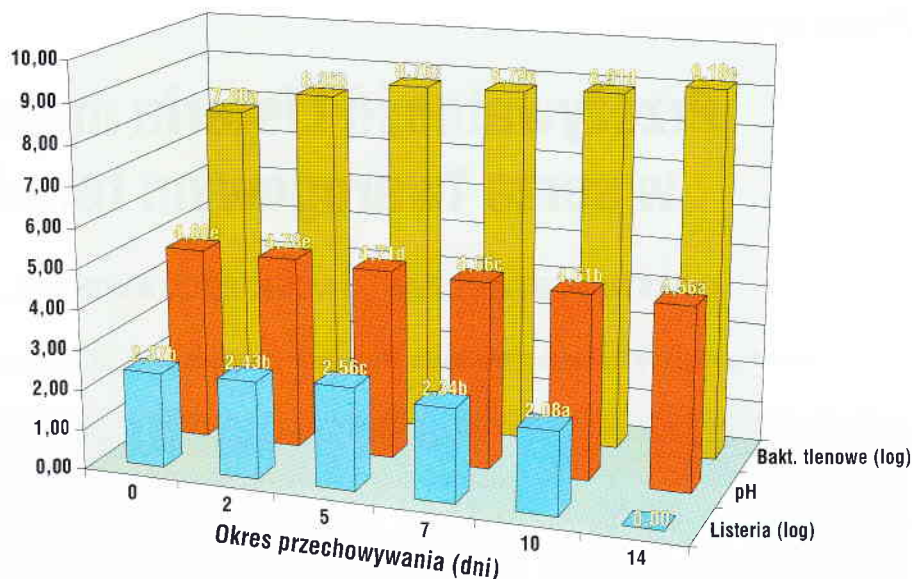
Próbki sera poddawano badaniom bezpośrednio po zakażeniu *L. monocytogenes*, a następnie po 2, 5, 7, 10 i 14 dniach przechowywania w temp. 10°C oraz po 2, 3, 4, 7 i 10 dniach przechowywania w temp. 20°C.

Oznaczano wartość pH, ogólną liczbę bakterii tlenowych oraz liczbę *L. monocytogenes*.

Wartość pH określano przy użyciu pehametru Jenway 3030. Ogólną liczbę bakterii tlenowych oznaczano zgodnie z Polskimi Normami (11, 12), wykonując posiewy na podłożu agarowym z mlekiem odtłuszczonym. Liczbę *L. monocytogenes* określano zgodnie z Instrukcją Państwowego Instytutu Weterynarii w Puławach (13), stosując selektywne podłoże agarowe Oxford (Oxoid). Posiewy inkubowano w temp. 30°C przez 72 godziny.

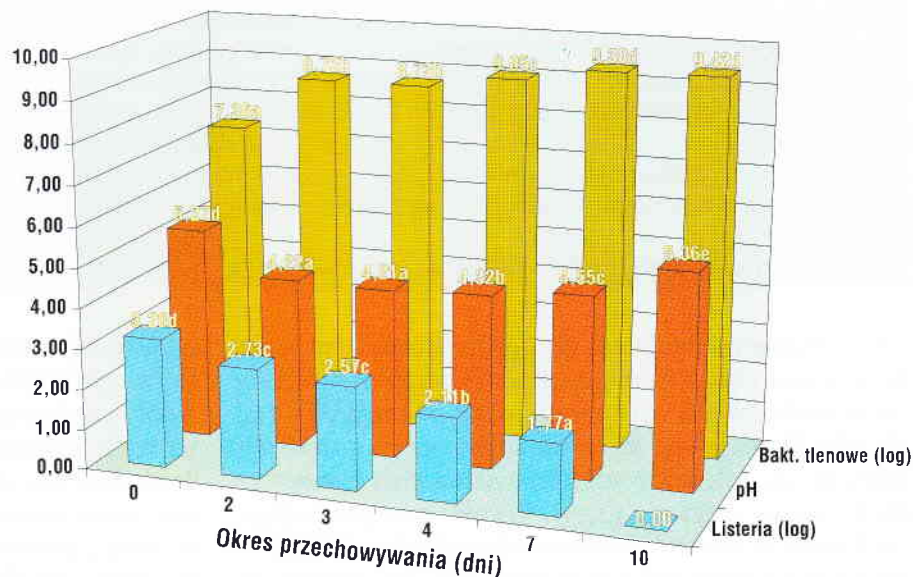
Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach. Wyniki badań dotyczące ogólnej liczby bakterii oraz liczby *L. monocytogenes* poddano transformacji logarytmicznej przed wykonaniem obliczeń statystycznych. Przeprowadzono analizę wariancji jednokierunkowej. Wartości średnie porównano testem Tukey'a. Do opracowania matematyczno-statystycznego wyników badań wykorzystano program komputerowy SPSS for Windows, a do ich prezentacji graficznej program Microsoft® Excel 97.

Za pomocą programu komputerowego Pathogen Modeling Program 4.0 (uzyskanego z USDA ARS NAA Eastern Regional Research Center, Philadelphia, USA) ustalono przewidywane teoretycznie zachowanie się *L. monocytogenes* w warunkach zbliżonych do panujących w przepro-



Ryc. 1. Zmiany ogólnej liczby bakterii tlenowych, liczby listerii i pH podczas przechowywania sera twarogowego w temp. 10°C

Objaśnienie: średnie oznaczone różnymi literami różnią się przy $P < 0,05$



Ryc. 2. Zmiany ogólnej liczby bakterii tlenowych, liczby listerii i pH podczas przechowywania sera twarogowego w temp. 20°C

Objaśnienie: jak w ryc. 1.

wadzonym eksperymencie, tzn. przy podobnym poziomie *inoculum*, temperaturze przechowywania, aktywności wody, stężeniu soli kuchennej i atmosferze przechowywania próbek. Modele matematyczne wykorzystane w omawianym programie opracowano na podstawie wyników dotyczących zachowania się listerii podczas inkubacji w podłożach bakteriologicznych (BHI), bez obecności innych drobnoustrojów. Wyniki badań własnych porównano z wynikami przewidywanymi teoretycznie.

Wyniki i omówienie

Na podstawie analizy wariancji stwierdzono, że na wszystkie uzyskane wyniki statystycznie istotny wpływ ($P < 0,01$) wywierał czas przechowywania próbek.

W próbkach sera przechowywanych w temperaturze 10°C (ryc. 1) nieznacznie, ale systematycznie wzra-

Tab. 1. Wartości T-4D dla *L. monocytogenes* (czas, po upływie którego dochodzi do redukcji liczby bakterii o 4 jednostki logarytmiczne)

Produkt	Temperatura przechowywania	Wartość T-4D (dni)			
		obliczona na podstawie badań własnych		przewidywana na podstawie programu komputerowego Pathogen Modeling Program	
		średnia	przedział ufności dla średniej (95%)	średnia	przedział ufności dla średniej (95%)
Ser twarogowy	10°C	26,9	21,9-35,4	76,3	37,4-155,8
Ser twarogowy	20°C	13,3	12,2-14,5	79,4	25,1-250,9
Kefir*	6°C	43,4	38,8-49,4	41,4	21,2-80,7
Kefir*	20°C	9,5	9,0-10,1	36,5	18,8-70,8
Jogurt*	6°C	25,4	23,4-27,6	34,3	18,1-65,0
Jogurt*	20°C	4,8	4,5-5,3	38,7	19,7-76,1

Objaśnienie: *wyniki wcześniejszych badań (18)

stała ogólna liczba bakterii tlenowych przy równoczesnym nieznacznym obniżaniu się wartości pH. Liczba *L. monocytogenes* pozostawała na zbliżonym poziomie w początkowym okresie przechowywania, a następnie, zaczęła się obniżać. Szczególnie wyraźną redukcję liczby listerii (o ponad 2 cykle logarytmiczne) obserwowano pomiędzy 10 i 14 dniem przechowywania próbek. Po 14 dniach obserwacji nie stwierdzano obecności *L. monocytogenes* w badanym serze (ryc. 1).

W próbkach sera przechowywanych w temperaturze 20°C (ryc. 2) obserwowano wyraźny wzrost ogólnej liczby bakterii, szczególnie intensywny w ciągu pierwszych 2 dni inkubacji. Równocześnie w miarę upływu czasu wyraźnie i systematycznie zmniejszała się populacja *L. monocytogenes*. Po 10 dniach przechowywania nie stwierdzano już obecności listerii w próbkach. Wartości pH obniżały się w początkowym okresie przechowywania, a następnie wzrastały, osiągając przy końcu obserwacji poziom zbliżony do wyjściowego (ryc. 2).

Na podstawie porównania wyników przedstawionych na ryc. 1 i 2 można stwierdzić, że w próbkach sera twarogowego przetrzymywanego w temp. 20°C dochodzi do wyraźnie szybszego obumierania *L. monocytogenes*, niż w próbkach przechowywanych temp. 10°C. Podobne prawidłowości stwierdzono we wcześniejszych badaniach własnych, przy porównywaniu przeżywalności *L. monocytogenes* w próbkach kefiru i jogurtu przechowywanych w temp. 6°C oraz 20°C (18). Jest to szczególnie widoczne przy porównaniu wartości T-4D zamieszonych w tab. 1. Wydaje się, że wzrost temperatury zwiększa aktywność bakterii stanowiących mikroflorę przetworów mlecznych, jak również aktywność wytwarzanych przez te bakterie enzymów i innych substancji mogących ujemnie wpływać na funkcjonowanie komórek *L. monocytogenes*.

O ujemnym wpływie mikroflory występującej w serze twarogowym termizowanym na *L. monocytogenes* wydaje się świadczyć fakt, że listerie inkubowane w temp. 20°C w pożywce bakteriologicznej bez obecności innych drobnoustrojów (wyniki przewidywane na podstawie programu komputerowego – tab. 1) ulegały redukcji o 4 rzędy wielkości dopiero po 79,4 dnia, natomiast w badanych próbkach sera analogiczną redukcję stwierdzono już po 13,3 dnia przechowywania. Występowania tak wyraźnej różnicy w przeżywalności *L. monocytogenes* w podłożu bakteriologicznym oraz serze twarogowym nie można wytłumaczyć wpływem pH, którego wartości zmieniały się podczas przechowywania próbek stosunkowo nieznacznie, a w dodatku w próbkach sera przechowywanych w temperaturze 20°C do największej redukcji liczby listerii doszło pomiędzy 7 i 10 dniem przechowywania, kiedy to wartość pH wzrosła z 4,55 do 5,26, a zatem kwasowość środowiska zmieniła się na bardziej korzystną dla *L. monocytogenes*.

Wnioski

1. W próbkach sera twarogowego termizowanego, sztucznie zakażonych *L. monocytogenes* i przechowywanych w temperaturze 10°C oraz 20°C następuje wymieranie bakterii testowych, przebiegające bardziej intensywnie w wyższej temperaturze.

2. Wydaje się, że przy wystąpieniu zakażeń wtórnych *L. monocytogenes*, osiągnięcie przez te bakterie w serach twarogowych termizowanych gęstości populacji zagrażającej zdrowiu przeciętnego konsumenta (10^5 - 10^8 w 1 g) jest mało prawdopodobne z powodu niskiego pH tych produktów oraz obecności licznej mikroflory antagonistycznej. Ponieważ jednak dla osób o osłabionej odporności immunologicznej oraz innych osób należących do grupy podwyższonego ryzyka,

dawka infekcyjna *L. monocytogenes* jest wielokrotnie niższa, zarówno producenci żywności, jak i przedstawiciele służb odpowiedzialnych za nadzór higieniczny powinni dokładać wszelkich starań, aby ograniczyć możliwość występowania tego drobnoustroju w środkach spożywczych, zwłaszcza w tych, które zalicza się do tzw. żywności wygodnej i które nie są poddawane obróbce termicznej bezpośrednio przed spożyciem.

Piśmiennictwo

1. *Chen J. H., Hotchkiss J. H.*: Growth of *Listeria monocytogenes* and *C. sporogenes* in cottage cheese in modified atmosphere packaging. *J. Dairy Sci.* 1993, 76, 972-977.
2. *Ferreira M. A. S. S., Lund B. M.*: The effect of nisin on *L. monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. *Letters Appl. Microbiol.* 1966, 22, 433-438.
3. *Furowicz A.*: Nowe spojrzenie na etiopatogenezę listeriozy. Aspekty epidemiologiczne. *Medycyna Wet.* 1992, 48, 309-311.
4. *Genigeorgis C., Carniciu M., Dutulescu D., Farver T. B.*: Growth and survival of *L. monocytogenes* in market cheese stored at 4 to 30 degree. *J. Fd Prot.* 1991, 54, 662-668.
5. *Hicks S. J., Lund B. M.*: The survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *J. appl. Bact.* 1991, 70, 308-314.
6. *Kozak J., Belmer T., Byrne R., Fisher K.*: Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: incidence in dairy products. *Fd. Control.* 1996, 7, 215-221.
7. *Michalski M. M., Rola J. G., Kwiatek K.*: Oporność cieplna szczepów *L. monocytogenes* wyizolowanych z mleka. *Medycyna Wet.* 1994, 50, 254-256.
8. *Molska I.*: *Listeria monocytogenes* w mleku surowym i przetworach mlecznych. *Przem. spoż.* 1999, 53, 10-12.
9. *Piccinin D. M., Shelef L. A.*: Survival *L. monocytogenes* in cottage cheese. *J. Fd Prot.* 1995, 58, 128-131.
10. *Pini P. N., Gilbert R. J.*: The occurrence in the UK of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. *Int. J. Fd Microbiol.* 1988, 6, 317-326.
11. Polska Norma: PN-93 A-86034/03. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Przygotowanie próbek i rozcieńczeń.
12. Polska Norma: PN-93 A-86034/04. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Ogólna liczba drobnoustrojów – oznaczanie metodą płytkową w temp. 30°C.
13. *Rola J., Kwiatek K., Wojtoń B.*: Wykrywanie *L. monocytogenes* w mleku i przetworach mleczarskich. Instrukcja Instytutu Wet., Puławy 1993.
14. *Rola J., Kwiatek K., Wojtoń B., Michalski M.*: Występowanie *L. monocytogenes* w mleku surowym i produktach mlecznych. *Medycyna Wet.* 1994, 50, 323-325.
15. *Ryser E. T., Marth E. H., Doyle M. P.*: Survival of *L. monocytogenes* during the manufacture and storage of cottage cheese. *J. Fd Prot.* 1985, 48, 746-753.
16. *Slavčev G., Mlaški S., Stefanov I., Stojanova S.*: Survival of *L. monocytogenes* in milk and dairy products. *Khren. – Promis.* 1994, 43, 28-30.
17. *Stańczak B. J., Szczawiński J.*: Ciepłooporność *Listeria monocytogenes* w mleku i śmietance o różnej zawartości tłuszczu. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 389-391.
18. *Stańczak B. J., Szczawiński J., Pęcunek J.*: Przeżywalność *L. monocytogenes* w fermentowanych napojach mlecznych. *Medycyna Wet.* 1997, 53, 592-595.
19. *Szczawiński J., Szczawińska M. E., Stańczak B.*: Radioresistance of *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Acta Alimentaria.* 1996, 25, 397-401.
20. *Terplan G.*: Vorkommen von *Listerien* in Milch wirtschaftlichen betrieben sowie Milch Produkten. *Dt. Milchwirt.* 1989, 40, 268-275.
21. *Waliszewska D., Maciak T., Kubiński T.*: Ocena mikrobiologiczna mleka spożywczego pasteryzowanego oraz sterylizowanego UHT w świetle badań WZHW w Warszawie. *Prz. mlecz.* 1996, nr 12, 376-378.
22. *Waliszewska D., Sawicka-Wrzosek K., Maciak T.*: Ocena mikrobiologiczna przetworów mleczarskich w świetle badań ZHW w Warszawie. *Prz. mlecz.* 1997, nr 12, 393-394.

Adres autora: dr Bożenna Stańczak, ul. Zamiany 6 m. 32, 02-786 Warszawa

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego

informuje, że w dniach 6-7 czerwca 2000 roku w Puławach odbędzie się Konferencja dla lekarzy praktyków zajmujących się chorobami trzody chlewnej z udziałem wykładowców zagranicznych i krajowych, na temat:

Optymalne wykorzystanie potencjału rozrodczego świń podstawą opłacalności produkcji

Osoby zainteresowane uczestnictwem w Konferencji proszone są o kontakt telefoniczny lub listowny: mgr inż. Anna Mokrzycka, Zakład Chorób Świń, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, tel. (081) 886-30-51 w. 253, e-mail: anmok@piwet.pulawy.pl