

Ocena wzrostu *Listeria monocytogenes* w mleku na podstawie programu PMP70 oraz badań własnych^{*)}

JAROSŁAW KOWALIK, STEFAN ZIAJKA

Instytut Rozwoju Mleczarstwa Wydziału Nauki o Żywności UWM, ul. Oczapowskiego 7, 10-718 Olsztyn

Kowalik J., Ziajka S.

Assessment of the growth of *Listeria monocytogenes* in milk on the basis of PMP70 program and individual research

Summary

The aim of the study was the qualification of *Listeria monocytogenes* 38 survivability in a model milk product (regenerated milk 10% (w/v)) stored within a 14-day-period in temperatures of: 3, 6, 9, 12, 15 and 20°C. The milk was contaminated by the *Listeria monocytogenes* 38 isolated from raw milk. The microbiological investigations were made by the application of the Microbial Impedimetric System Bactometer M64, with an impedimetric measurement of bacteria count. The results of the analyses were compared with data from a Pathogen Modeling 7.0 computer program. It was discovered that microbiological investigations that can be applied in predictive microbiology should be conducted on model food products, instead of a liquid microbiological medium (e.g. bouillon). The Microbial Impedimetric System allows for obtaining the microbiological results more quickly in comparison with the classic plate methods.

Keywords: predictive microbiology, *Listeria monocytogenes*

Jednym z najważniejszych wyzwań dzisiejszych czasów jest zapewnienie, że produkowana i dostarczona na rynek żywność jest bezpieczna. W ostatnich latach wzrosła świadomość istniejących i potencjalnych źródeł zanieczyszczeń, dlatego obecnie podejmuje się coraz więcej działań w celu zapewnienia, że żywność, którą spożywamy, jest pod ciągłym nadzorem i kontrolą (2, 7). Do znaczących niebezpieczeństw wynikających z produkcji surowców, produktów i obrotu żywności należy zaliczyć zatrucia pokarmowe spowodowane przez drobnoustroje.

Oprócz znanych bakterii chorobotwórczych: *Salmonella spp.*, *Staphylococcus spp.*, nowego znaczenia nabierają takie patogeny, jak: *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica* oraz enteropatogenne szczepy *Escherichia coli* O157:H7. Potrafią one przetrwać niekorzystne warunki środowiska i mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia, a nawet życia ludzi o osłabionym układzie immunologicznym (6, 9, 10).

Wytwarzanie żywności jest nieodłącznie związane z ponoszeniem przez producenta pełnej odpowiedzialności za wyrób, co oznacza, że musi on dostarczyć na rynek produkt o właściwej jakości zdrowotnej. W tym celu bardzo przydatne są systemy, takie jak: GMP i HACCP (2).

Do narzędzi służących do kontroli bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności należą także mikrobiologiczne modele prognostyczne. Mikrobiologia prognostyczna jako nowa subdyscyplina mikrobiologii żywności zaczęła rozwijać się około 20 lat temu (2, 5). W większości produktów żywnościowych występuje limitowana liczba czynników determinujących wzrost mikroorganizmów. Określenie reakcji mikroorganizmów na te czynniki umożliwia przewidywanie ich zachowania w żywności. Na podstawie zebranych w kontrolowanych warunkach danych formułowane są zależności matematyczne, określające wpływ i interakcje poszczególnych zmiennych, a opracowane modele matematyczne mogą być następnie wykorzystane do przewidywania zachowania mikroorganizmów w wielu produktach żywnościowych (2). Korzystnym zjawiskiem w zastosowaniu modeli matematycznych w produkcji żywności jest założenie powtarzalności zachowania się populacji mikroorganizmów pod wpływem czynników środowiskowych (12).

Do opracowywania modeli w mikrobiologii prognostycznej wykorzystywane jest zjawisko impedymetrii, zastępujące klasyczną metodę płytkową przy określaniu liczby bakterii w badanym produkcie. Metoda impedymetryczna polega na analizie zmian właściwości elektrycznych, jakie zachodzą w pożywkach hodowlanych pod wpływem rozwoju mikroorganizmów. Mikroorganizmy podczas wzrostu powodują zmiany przewodności elektrycznej układu (pożywka wraz z mikroorganizmami), przekształcając polisacharydy,

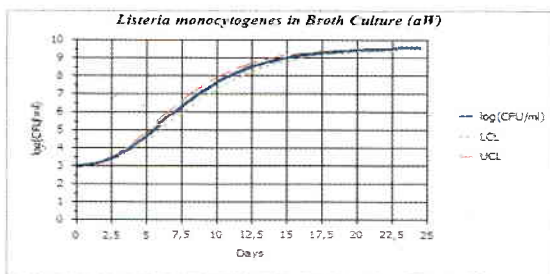
^{*)} Pracę wykonano przy wsparciu finansowym Komisji Europejskiej, w ramach programu tematycznego Jakość Życia i Zarządzanie Zasobami Ludzkimi, projektu QLK1-2002-30401 Warmińsko-Mazurskiego Centrum Doskonałości Mleczarstwa WAMADAIREC.

białka i tłuszcze do dobrze dysocjujących związków, takich jak: kwasy organiczne, aminokwasy i kwasy tłuszczowe. W miarę gromadzenia produktów metabolizmu następuje obniżenie oporu w czasie przepływu prądu elektrycznego pomiędzy elektrodami zanurzonymi w hodowli mikroorganizmów. Rejestrowane jest to przez instrument pomiarowy, który po wykalibrowaniu (analiza regresji liniowej) w odniesieniu do metody płytkowej staje się narzędziem szybkich analiz mikrobiologicznych z wykorzystaniem elementów statystyki (1, 3, 4, 8).

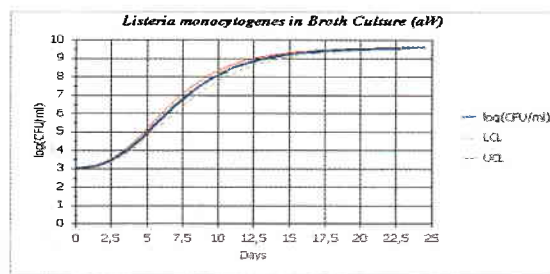
Celem badań było określenie przeżywalności *Listeria monocytogenes* w mleku sterylizowanym i przechowywanym w różnych temperaturach z wykorzystaniem impedymetrycznego systemu monitorującego Bactometer M64 firmy Biomerieux.

Material i metody

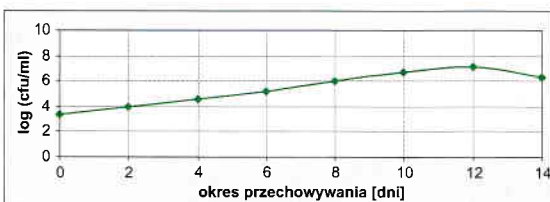
Do próbek regenerowanego mleka w proszku (odtłuszczonego o zawartości suchej masy 10%) wysterylizowanego w żaroodpornych butelkach dodano hodowlę



Ryc. 1a. Wzrost *L. monocytogenes* 38 w temp. 3°C wg PMP70



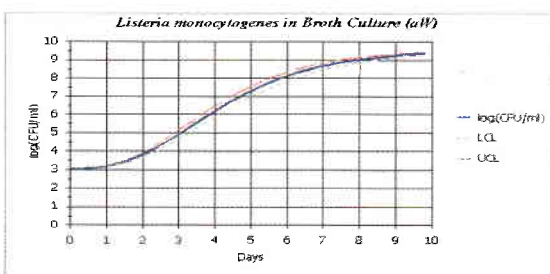
Ryc. 2a. Wzrost *L. monocytogenes* 38 w temp. 6°C wg PMP70



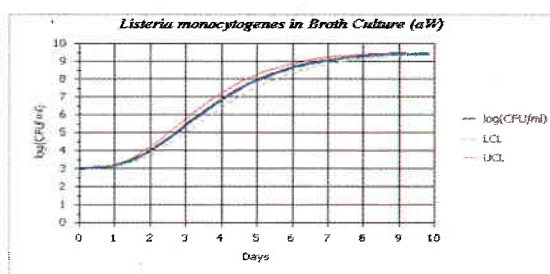
Ryc. 1b. Wzrost *L. monocytogenes* 38 w temp. 3°C w badanej próbce



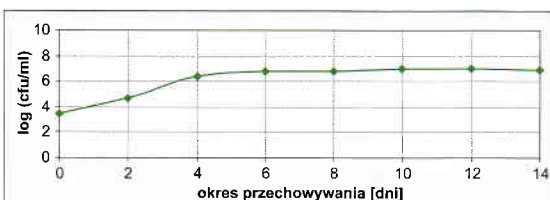
Ryc. 2b. Wzrost *L. monocytogenes* 38 w temp. 6°C w badanej próbce



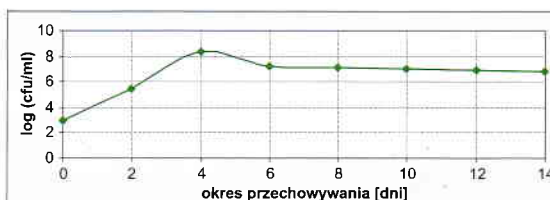
Ryc. 3a. Wzrost *L. monocytogenes* 38 w temp. 9°C wg PMP70



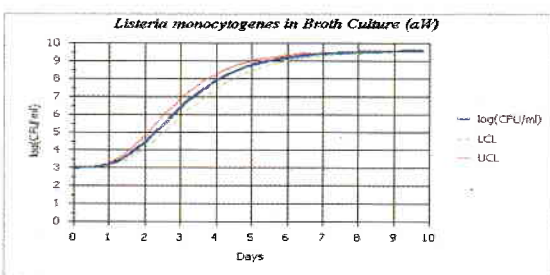
Ryc. 4a. Wzrost *L. monocytogenes* 38 w temp. 12°C wg PMP70



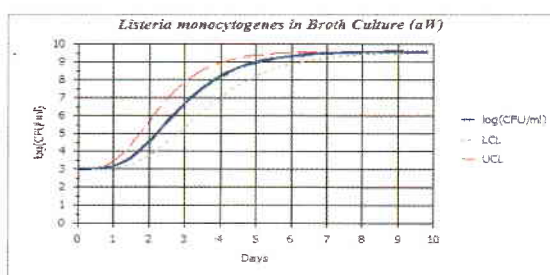
Ryc. 3b. Wzrost *L. monocytogenes* 38 w temp. 9°C w badanej próbce



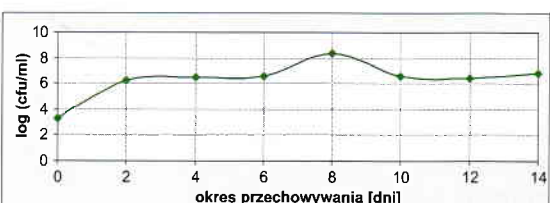
Ryc. 4b. Wzrost *L. monocytogenes* 38 w temp. 12°C w badanej próbce



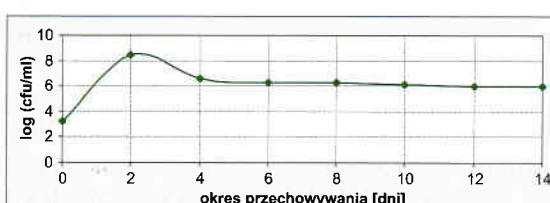
Ryc. 5a. Wzrost *L. monocytogenes* 38 w temp. 15°C wg PMP70



Ryc. 6a. Wzrost *L. monocytogenes* 38 w temp. 20°C wg PMP70



Ryc. 5b. Wzrost *L. monocytogenes* 38 w temp. 15°C w badanej próbce



Ryc. 6b. Wzrost *L. monocytogenes* 38 w temp. 20°C w badanej próbce

szczepu *Listeria monocytogenes* 38 otrzymanego z Zakładu Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności UWM w Olsztynie w liczbie zapewniającej koncentrację na poziomie 10^3 komórek w 1 ml mleka. W badaniach używano 20-godzinnej hodowli *L. monocytogenes* 38 w bulionie odżywczym wzbogaconym LEB (Merck), którą inkubowano w temp. 37°C. Badanie próbek mleka w kierunku liczby komórek przeprowadzono w dniu wykonania doświadczenia oraz po 2, 4, 6, 8, 10, 12 i 14 dniach przechowywania w temp. 3, 6, 9, 12, 15 i 20°C. W poszczególnych okresach przechowywania oznaczono liczbę komórek *L. monocytogenes* w wykalibrowanym baktometrze (Bactometer M64-Biomerieux). Do analizy wzrostu bakterii w baktometrze wykorzystano pożywkę BHI (Biomerieux). Analizowane próbki inkubowano w komorze baktometru w temp. 37°C.

Uzyskane wyniki w baktometrze po przekształceniu logarytmicznym porównano z wynikami uzyskanymi za pomocą programu komputerowego Pathogen Modeling Program 7.0 (PMP70), (US Department of Agriculture-Agricultural Research Service USDA-ARS, Eastern Regional Research Center (ERRC), Wyndmoor, Pennsylvania, USA). Program został opracowany na podstawie analiz wzrostu *L. monocytogenes* uzyskanych na podłożach mikrobiologicznych. W programie ustalono porównywalne warunki (inoculum, temperatura przechowywania, aktywność wody) do panujących w założonych badaniach (<http://www.arserrc.gov/mfs/PATHOGEN.HTM>).

Wyniki i omówienie

Na rycinach (ryc. 1a-6b) przedstawiono średnie wartości liczby bakterii w poszczególnych temperaturach przechowywania. Porównany został wzrost *L. monocytogenes* w symulowanych warunkach określonych w programie komputerowym PMP70 z badaniami, w których do określenia liczby *Listeria monocytogenes* 38 wykorzystano urządzenie Bactometer M64.

Uzyskane wyniki badań nie osiągnęły w żadnym przypadku w końcowych dniach przechowywania liczby komórek odczytanych w programie komputerowym. Potwierdza to fakt, że wzrost bakterii na wyselekcjonowanych podłożach mikrobiologicznych (wykorzystanych do stworzenia PMP70) różni się od wzrostu tych samych bakterii na podłożu, jakim jest sam produkt żywnościowy (mleko). Najbardziej intensywny wzrost *L. monocytogenes* 38 w przechowywanym mleku obserwowano w temperaturach 12 i 20°C (ryc. 4b i 6b), i ich krzywe wzrostu były bardzo zbliżone do uzyskanych w PMP70 (ryc. 4a i 6a). Zaobserwowane w temp. 12, 15 i 20°C (ryc. 4b, 5b, 6b) zahamowanie wzrostu bakterii potwierdza jej psychrotrofowość, co stwierdzono w temp. 3, 6 i 9°C, w których krzywe wzrostu do czasu zakończenia przechowywania utrzymywały stały poziom (ryc. 1b, 2b, 3b).

Wiele czynników związanych z żywnością, takich jak dostępność składników pokarmowych, czynniki anty-mikrobiologiczne, wpływ mikroflory towarzyszącej nie jest uwzględnianych w modelach konstruowanych na podstawie doświadczeń wykonanych na podłożach mikrobiologicznych (7).

Zatrucie pokarmowe lub niekorzystny wpływ na organizm człowieka w wyniku spożycia *Listeria monocytogenes* w żywności zachodzi wówczas, gdy jej liczba wynosi około $\log 4$ (jtk./g) (5). Zdolność tego patogenu do wzrostu i przeżywalności w różnych temperaturach w mleku wskazuje na jego niebezpieczny charakter i możliwość długiego przetrwania w czasie przechowywania (11).

Omawiane wyniki badań wskazują na konieczność prowadzenia analiz na produktach żywnościowych, a nie na płynnych pożywkach mikrobiologicznych. Mogą one posłużyć do tworzenia modeli w mikrobiologii prognostycznej, która staje się narzędziem rozwoju produktów żywnościowych. Wykorzystując opracowane modele w przemyśle spożywczym można szybko zmodyfikować istniejące receptury, zanim zostaną przeprowadzone kosztowne badania laboratoryjne lub uruchomiona zostanie produkcja nowego produktu.

Piśmiennictwo

1. Borch E., Wallentin C.: Conductance measurements for data generation in predictive modeling, J. Ind. Microbiol. 1993, 12, 3-5, 286-290.
2. Brown M., Stringen M.: Microbiological risk assessment in food processing. Woodhead Publishing Limited, Cambridge 2002.
3. Czajkowska D., Witkowska-Gwiazdowska A.: Metoda impedymetryczna w wykrywaniu drożdży bakterii fermentacji mlekowej w sokach z owoców cytrusowych. Przemysł Spoż. 1998, 12, 14-18.
4. Czajkowska D., Witkowska-Gwiazdowska A.: Postęp w analizach mikrobiologicznych żywności II. Zastosowanie metod instrumentalnych. Przemysł Spoż. 1997, 4, 39-42.
5. Jalońska-Pienkowska M., Kolożyn-Krajewska D., Szczawińska M., Goryl A.: Prognozowanie wzrostu bakterii chorobotwórczych w produktach mięsnych gotowych do spożycia. Żywność, Nauka, Technol. 1999, 4 (21), 73-95.
6. Kłosowska A., Malinowski E.: Drobnoustroje patogeniczne dla człowieka w mleku zbiorczym. Medycyna Wet. 2001, 57, 28-31.
7. Kolożyn-Krajewska D., Jalońska-Pienkowska M.: Prognozowanie mikrobiologiczne jako narzędzie kształtowania bezpieczeństwa żywności. Przemysł Spoż. 2003, 2, 32-34, 48.
8. Kunicka A.: Wykorzystanie metody impedymetrycznej w analizie mikrobiologicznej. Laboratoria Aparatura Badania 2000, 5, 18-21.
9. Lechowicz R. V.: Microbiological challengers of refrigerated foods. Food Technology, 1998, 42, 84-86.
10. Robins-Browne R. M.: [w:] Doyle M. P., Beuchat L. R., Montville T. J.: Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, ASM Press, Washington 1997.
11. Stańczak B. J., Szczawiński J.: Ciepłoporność *Listeria monocytogenes* w mleku i śmietance o różnej zawartości tłuszczu. Medycyna Wet. 1996, 52, 389-391.
12. Whiting R. C., Buchanan R. L.: Microbial modeling. Food Technol. 1994, 48, 113-119.

Adres autora: mgr inż. Jarosław Kowalik, ul. Oczapowskiego 7, 10-718 Olsztyn; e-mail: j.kowalik@uwm.edu.pl