

BOŻENNA J. STAŃCZAK, JACEK SZCZAWIŃSKI, JANINA PEĆCONEK

Przeżywalność *Listeria monocytogenes* w fermentowanych napojach mlecznych

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

Summary

Survival of *Listeria monocytogenes* in fermented milk products

Samples of fermented milk products on the Polish market called „natural yogurt” and „natural kefir” as well as raw milk were artificially contaminated with *L. monocytogenes* (inoculum 10^6 cells/ml). Yogurt and kefir were stored at 6°C for 35 days and at 20°C for 14 days. Samples of raw milk were incubated at 20°C for 7 days. In each sample the pH-value, aerobic plate count and number of listeria were determined. It was found that the number of *L. monocytogenes* decreased in all tested products during storage. From the regression analysis T-4D values (time required for reduction of listeria by 4 log units) were calculated. T-4D values amounted to: for kefir and yogurt stored at 6°C – 43.4 and 25.4 days respectively; for kefir and yogurt stored at 20°C – 9.5 and 4.8 days, for raw milk stored for natural fermentation at 20°C – 38.2 days. The obtained results were compared to theoretical results obtained from the Pathogen Modeling Program 4.0. This program makes it possible to predict the behavior of *L. monocytogenes* in culture media. It was found that microflora of fermented milk products increases the dying rate of *L. monocytogenes* during storage at 20°C. Lactic acid bacteria used for yogurt production seem to exert a particularly strong antagonistic effect on *L. monocytogenes*.

Występowanie *Listeria monocytogenes* w surowcach i produktach spożywczych, a zwłaszcza w mleku i przetworach mlecznych, stwierdza się stosunkowo często (6, 10, 14). Dotyczy to szczególnie mleka surowego oraz serów produkowanych z mleka nie poddawanego obróbce cieplnej. Pomimo tego, że *L. monocytogenes* jest bakterią o niskiej ciepłoporności i jej przeżycie w mleku poddanym przemysłowej pasteryzacji lub obróbce cieplnej w warunkach domowych jest mało prawdopodobne (17), stwierdzano również jej obecność w przetworach wyprodukowanych z mleka pasteryzowanego. Fakt ten związany jest z zanieczyszczeniami wtórnymi, do których może dochodzić już po obróbce termicznej mleka, np. podczas nieaseptycznego napełniania opakowań napojami mlecznymi fermentowanymi lub przy nieprzebraniu higieny podczas produkcji twarogów i serów. Przeprowadzone dotychczas badania nad zachowaniem się *L. monocytogenes* w fermentowanych przetworach mlecznych nie pozwa-

lają na jednoznaczną ocenę sytuacji (1–5, 7–9, 13, 16, 18). Wyniki uzyskane przez poszczególnych autorów wykazują znaczne różnice w zależności od rodzaju badanego produktu, jego kwasowości, liczby wprowadzanych komórek bakteryjnych, temperatury przechowywania i innych czynników.

Celem pracy było:

a) określenie przeżywalności *L. monocytogenes* w najbardziej popularnych w Polsce fermentowanych przetworach mlecznych – kefirze naturalnym i jogurcie naturalnym przechowywanych (zgodnie z zaleceniami producenta) w temperaturze 6°C,

b) ustalenie czy możliwe jest namnażanie się *L. monocytogenes* w kefirze i jogurcie naturalnym przechowywanych w warunkach obciążenia temperaturowego (20°C) oraz w mleku surowym pozostawionym do naturalnego zakwaszenia w temperaturze pokojowej (20°C).

Materiał i metody

Próbki kefiru i jogurtu naturalnego (firmy Danone) w opakowaniach jednostkowych pobierano natychmiast po zakończeniu produkcji. Poszczególne próbki skażano mieszaniną hodowli bulionowych trzech szczepów *L. monocytogenes*, w ilości zapewniającej koncentrację bakterii na poziomie 10^6 komórek na 1 ml produktu. Szczepy użyte do badań zostały wyizolowane z mleka surowego w Zakładzie Higieny Produktów Pochodzenia Zwierzęcego Państwowego Instytutu Weterynarii w Puławach. W doświadczeniach używano 24 godzinnych hodowli *L. monocytogenes* w bulionie BHI (Oxoid), inkubowanych w temp. 37°C.

Próbki mleka surowego, pobierane w gospodarstwie SGGW, rozlewano do sterylnych kolb po 200 ml, a następnie skażano *L. monocytogenes* identycznie jak próbki kefiru i jogurtu.

Próbki kefiru i jogurtu naturalnego poddawano badaniom bezpośrednio po skażeniu *L. monocytogenes* oraz po 3, 7, 14, 28 i 35 dniach przechowywania w temp. 6°C oraz po 2, 3, 4, 7, 10 i 14 dniach przechowywania w temp. 20°C. Próbki mleka surowego badano po 0, 1, 2, 3 i 7 dniach przechowywania w temperaturze 20°C.

W każdym z wymienionych okresów badań w poszczególnych próbkach oznaczano wartość pH, ogólną liczbę bakterii tlenowych oraz liczbę komórek *L. monocytogenes*.

Wartość pH oznaczano za pomocą pehametru Jenway 3030. Ogólną liczbę drobnoustrojów tlenowych określano

zgodnie z Polskimi Normami (11, 12). Liczbę komórek *L. monocytogenes* oznaczano zgodnie z Instrukcją Państwowego Instytutu Weterynarii w Puławach (15), wykonując szeregi dziesięciokrotnych rozcieńczeń i posiewy na selektywnym podłożu agarowym Oxford (Oxoid). Wszystkie posiewy inkubowano w temp. 30°C przez 72 godziny.

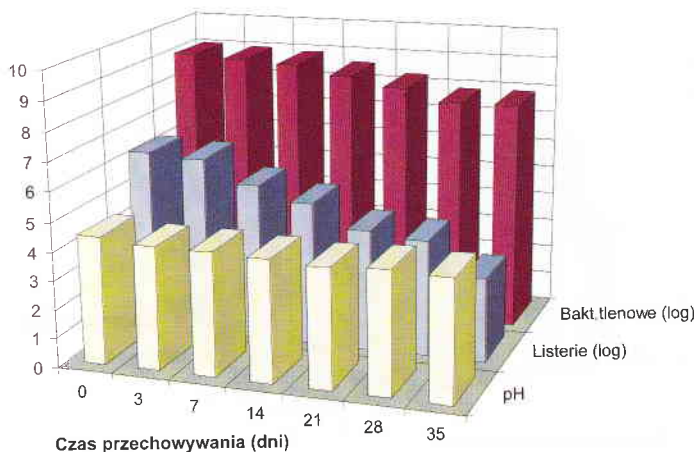
Doświadczenie wykonano w czterech powtórzeniach. Uzyskane wyniki poddano transformacji logarytmicznej i opracowaniu statystycznemu z zastosowaniem wieloczynnikowej analizy wariancji oraz regresji prostoliniowej, wykorzystując program statystyczno-graficzny „Statgraphics”. Za pomocą programu komputerowego Pathogen Modeling Program 4.0 (uzyskanego z USDA ARS NAA Eastern Regional Research Center, Philadelphia, USA) ustalano przewidywane teoretycznie zachowanie się *L. monocytogenes* w porównywalnych warunkach, tzn. przy podobnym poziomie *inoculum*, temperaturze, aktywności wody, stężeniu soli i atmosferze przechowywania próbek. Omawiany program opracowano na podstawie wyników uzyskanych na podłożach bakteriologicznych. W przypadku *L. monocytogenes* było to podłoże BHI, w którym inkubowano jedynie listerie, bez obecności innych mikroorganizmów. Wyniki badań własnych porównano z wynikami przewidywanymi teoretycznie.

Wyniki i omówienie

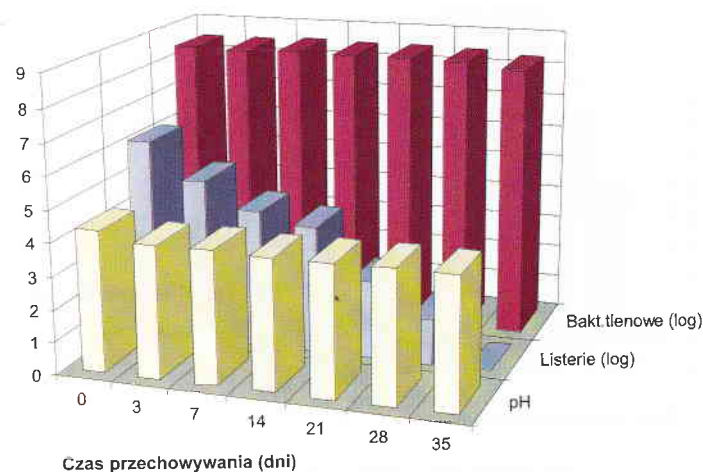
Wyniki przedstawione na ryc. 1 i 2 wskazują, że zarówno w kefirze naturalnym, jak i w jogurcie naturalnym, podczas przechowywania w temp. 6°C, liczba żywych komórek *L. monocytogenes* zmniejszała się w miarę wydłużania okresu przechowywania. W próbkach jogurtu tempo wymierania listerii było wyraźnie szybsze niż w próbkach kefiru. Wyliczona na podstawie analizy regresji wartość T-4D (czas, po upływie którego liczba listerii obniża się o 4 jednostki logarytmiczne) wynosi 43,4 dnia dla kefiru i 25,4 dnia dla jogurtu (tab. 1). Wartości te są zbliżone do wartości T-4D przewidywanych na podstawie programu komputerowego Pathogen Modeling Program 4.0 (tab. 1). Wartości pH oraz wyniki dotyczące ogólnej liczby bakterii tlenowych ulegały jedynie nieznacznym zmianom podczas

Tab. 1. Wartości T-4D (czas, po upływie którego dochodzi do redukcji liczby bakterii o 4 jednostki logarytmiczne) dla *L. monocytogenes* określone na podstawie badań własnych oraz przewidywane na podstawie programu komputerowego Pathogen Modeling Program 4.0

Produkt	Temperatura przechowywania	Wartości T-4D (dni)		
		obliczone na podstawie badań własnych	przewidywane na podstawie programu komputerowego	
			średnia	przedział ufności (95%)
Kefir	6°C	43,4	41,4	21,2–80,7
Jogurt	6°C	25,4	34,3	18,1–65,0
Kefir	20°C	9,5	36,5	18,8–70,8
Jogurt	20°C	4,8	38,7	19,7–76,1
Mleko surowe pH (6,6)	20°C	38,2	> 92,0	
Mleko surowe pH (5,1)	20°C	38,2	72,2	26,0–200,7



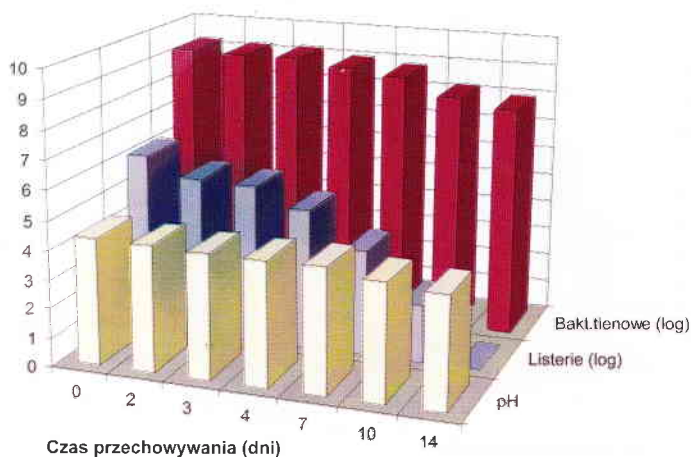
Ryc. 1. Zmiany ogólnej liczby bakterii tlenowych, liczby listerii i pH podczas przechowywania kefiru w temp. 6°C



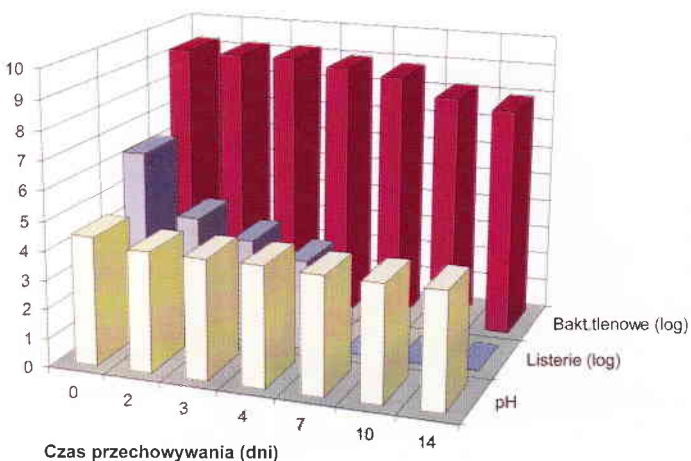
Ryc. 2. Zmiany ogólnej liczby bakterii tlenowych, liczby listerii i pH podczas przechowywania jogurtu w temp. 6°C

przechowywania próbek kefiru i jogurtu w temp. 6°C (ryc. 1 i 2).

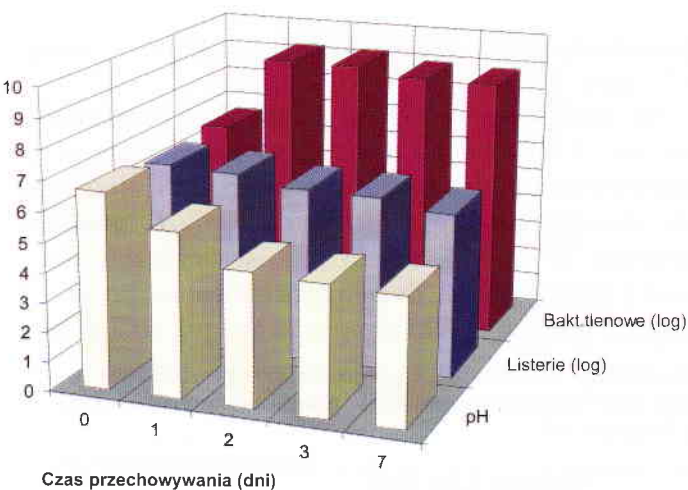
Na podstawie wyników badań przedstawionych na ryc. 3 i 4 można stwierdzić, że podczas przechowywania kefiru i jogurtu w temp. 20°C dochodzi do stosunkowo szybkiego wymierania *L. monocytogenes*. W próbkach kefiru nie stwierdzano obecności listerii po 14 dniach, natomiast w próbkach jogurtu podobny efekt obserwowano już po 7 dniach



Ryc. 3. Zmiany ogólnej liczby bakterii tlenowych, liczby listerii i pH podczas przechowywania kefiru w temp. 20°C



Ryc. 4. Zmiany ogólnej liczby bakterii tlenowych, liczby listerii i pH podczas przechowywania jogurtu w temp. 20°C



Ryc. 5. Zmiany ogólnej liczby bakterii tlenowych, liczby listerii i pH podczas przechowywania mleka surowego w temp. 20°C

W mleku surowym przechowywanym w temp. 20°C (ryc. 5) ogólna liczba bakterii tlenowych gwałtownie wzrosła po 1 dniu obserwacji, osiągając poziom 10^9 komórek na ml, czego efektem był wyraźny spadek pH oraz ścięcie się mleka. W okresie 7-dniowych obserwacji liczba *L. monocytogenes* ulegała stosunkowo nieznacznej redukcji. Wartość T-4D obliczona dla mleka surowego przechowywanego w temp. 20°C wynosiła aż 38,2 dnia (tab. 1).

Ogólnie biorąc uzyskane wyniki są zgodne z danymi piśmiennictwa. W wielu pracach obserwowano redukcję liczby listerii w fermentowanych napojach mlecznych oraz związek między szybkością obumierania *L. monocytogenes*, a wartością pH badanego produktu i temperaturą jego przechowywania (4, 5, 13, 16, 18).

Wyniki niniejszej pracy wskazują, że tempo wymierania *L. monocytogenes* w fermentowanych napojach mlecznych jest w ogromnej mierze uzależnione od charakteru mikroflory danego produktu. Jest to szczególnie wyraźnie widoczne przy porównaniu wartości T-4D dla poszczególnych wariantów doświadczenia (tab. 1).

Listerie inkubowane w temp. 20°C w pożywce bakteriologicznej bez obecności innych drobnoustrojów (wyniki przewidywane na podstawie programu komputerowego) ulegają redukcji o 4 rzędy wielkości dopiero po 36,5 lub 38,7 dniach, natomiast w badanych próbkach kefiru i jogurtu analogiczną redukcję stwierdzono już po 9,5 oraz 4,8 dniach przechowywania. Występowania tak wyraźnej różnicy w przeżywalności *L. monocytogenes* w podłożu bakteriologicznym oraz kefirze i jogurcie nie można wytłumaczyć wpływem pH, którego wartości we wszystkich rodzajach próbek były zbliżone. Wydaje się zatem, że mikroflora występująca w fermentowanych przetworach mlecznych wyraźnie przyspiesza tempo wymierania listerii, przy czym bakterie kwasu mlekowego wykorzystywane do produkcji jogurtu naturalnego wykazują szczególnie silne działanie antagonistyczne w stosunku do *L. monocytogenes*.

Ponieważ w praktyce poszczególne partie mleka surowego wykazują ogromne zróżnicowanie pod względem liczebności i charakteru mikroflory, jej oddziaływanie na listerie może być różnorodne i trudno je dokładnie przewidzieć. Uzyskane wyniki dotyczące mleka surowego świadczą jednak o tym, że dosyć powszechny w polskich gospodarstwach domowych zwyczaj pozostawiania w temperaturze pokojowej mleka nie poddanego obróbce termicznej do naturalnego zakwaszenia jest niebezpieczny z higienicznego punktu widzenia. Listerie mogą często występować w surowym mleku (14) i chociaż w przeprowadzonych badaniach nie stwierdzono ich namnażania się, to jednak obserwowano, że z łatwością przeżywają one proces naturalnego kwaszenia się mleka i długo zachowują żywotność podczas prze-

przechowywania. Redukcja liczby listerii w obu badanych produktach była znacznie szybsza od przewidywanej na podstawie programu komputerowego (tab. 1). W obu badanych produktach ogólna liczba bakterii tlenowych ulegała nieznacznemu obniżaniu się w okresie przechowywania próbek, a wartości pH pozostawały na zbliżonym poziomie.

chowowania zakwaszonego mleka w temperaturze pokojowej (ryc. 5, tab. 1).

Piśmiennictwo

1. Ashenafi M.: J. Dairy Sci. 77, 696, 1994.
2. Cole M. B., Jones M. V., Holyoak C.: J. appl. Bact. 69, 63, 1990.
3. El Gazzar F. E., Bohner H. F., Marth E. H.: J. Dairy Sci. 75, 43, 1992.
4. Farber J. M.: J. Ass. Analyt. Chem. 74, 701, 1991.
5. Gohil V. S., Ahmed M. A., Davies R., Robinson R. K.: Fd Microb. 13, 159, 1996.
6. Greenwood M. H., Roberts D., Burden P.: Int. J. Fd Microbiol. 12, 197, 1991.
7. Griffith M., Deibel K. E.: J. Fd Safety. 10, 219, 1990.
8. Lukasova J.: Prumysl Potravin 44, 158, 1993.
9. Massa S., Trovatelli L. D., Canganella F.: Letters. Appl. Microbiol. 13, 112, 1991.
10. Ng-Dlk., Seah-HL.: Food-Control 6, 171, 1995.
11. Polska Norma: PN-93A-86034/03. Mleko i przetwory mleczarskie. Badanie mikrobiologiczne. Przygotowanie próbek i rozcieńczeń.
12. Polska Norma: PN-93A-86034/04. Mleko i przetwory mleczarskie. Badanie mikrobiologiczne. Ogólna liczba drobnoustrojów – oznaczanie metodą płytkową w temp. 30°C.
13. Ribeiro S. H. S., Carminati D.: Sci. Aliments 16, 175, 1996.
14. Rola J., Kwiatek K., Wojtoń B., Michalski.: Medycyna Wet. 50, 323, 1994.
15. Rola J., Kwiatek K., Wojtoń B.: Wykrywanie *L. monocytogenes* w mleku i przetworach mleczarskich. Instrukcja Instytutu Wet., Puławy 1993.
16. Slavchev G., Milashki S., Stefanov I., Stoyanova S.: Khranitelna-Promishlenost 43, 28, 1994.
17. Stańczak B. J., Szczawiński J.: Ciepłoporność *Listeria monocytogenes* w mleku i śmietance o różnej zawartości tłuszczu. Medycyna Wet. 52, 389, 1996.
18. Zuniga Estrada A., Lopez Merino A., Mota de la Garza L.: Rev. Latinoam. Microbiol. 37, 257, 1995.

Adres autora: dr Bożenna J. Stańczak, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

Stan zaraźliwych chorób zwierzęcych w Polsce, według zgłoszenia Departamentu Weterynarii Ministerstwa Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej do Międzynarodowego Biura Epizootii, OIE za okres 1–31 lipca 1997 r.

- 1) **Wścieklizna psów i kotów** – wystąpiła w 5 województwach (w nawiasach podano liczby chorych zwierząt) a mianowicie: krakowskim (1), elbląskim (1), kieleckim (1), łomżyńskim (1), przemyskim (2). Wściekliznę stwierdzono u 2 psów i 5 kotów.
- 2) **Wścieklizna zwierząt gospodarskich** – wystąpiła w 4 województwach: elbląskim (2), olsztyńskim (4), suwalskim (2), toruńskim (1).
- 3) **Wścieklizna zwierząt dzikich** – wystąpiła w 19 województwach: warszawskim (2), krakowskim (8), białostockim (4), ciechanowskim (5), częstochowskim (2), elbląskim (2), kaliskim (1), kieleckim (7), łomżyńskim (2), olsztyńskim (9), ostrołęckim (9), piotrkowskim (2), poznańskim (11), radomskim (1), siedleckim (5), suwalskim (13), tarnobrzeskim (5), tarnowskim (2), toruńskim (4).
- 4) **Świerzb koni** – stwierdzono w województwie łomżyńskim (1).
- 5) **Otręt koni i bydła** – wystąpił w województwie białkopodlaskim (1) i radomskim (2).
- 6) **Myksomatoza** – w 5 województwach: kieleckim (1), olsztyńskim (1), poznańskim (2), szczecińskim (2), tarnobrzeskim (1).
- 7) **Pomór królików** – wystąpił w 10 województwach w: bydgoskim (1), gorzowskim (6), kieleckim (1), olsztyńskim (1), pilskim (1), radomskim (1), szczecińskim (1), tarnobrzeskim (1), zamojskim (1), zielonogórskim (1).
- 8) **Zgnilec złośliwy pszczoł** – wystąpił w : białostockim (1), gdańskim (5), katowickim (1), krośnieńskim (1), lubelskim (1), nowosądeckim (1), olsztyńskim (5), płockim (1), słupeckim (1), suwalskim (1), wrocławskim (1).
- 9) **Zgnilec łagodny pszczoł** – stwierdzono w województwie suwalskim.
- 10) **Cholera drobiu** – wystąpiła w 2 województwach: kieleckim (1) i radomskim (1).
- 11) **Posocznica karpi** – wystąpiła w województwie bydgoskim (1) i opolskim (1).