



Katedra Mikrobiologii i Technologii Żywności

Wydział Rolnictwa i Biotechnologii

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich w Bydgoszczy

mgr inż. Martyna Zielińska

KONCEPCJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Monitoring szczepów *Listeria monocytogenes* w surowcach, produktach i środowisku zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego

Opiekun naukowy:

dr hab. Anna Ligocka

Bydgoszcz, 2019

1. Wprowadzenie

Bakterie z rodzaju *Listeria* występują w przyrodzie powszechnie, a na człowieka przenoszą się za pośrednictwem gleby, wody, ścieków, odchodów zwierząt czy zanieczyszczonych roślin [2]. Spośród kilkunastu szczepów największe zagrożenie dla człowieka stanowią pałeczki *L. monocytogenes*. Wg raportu RASFF (Krajowy System Wczesnego Ostrzegania o Niebezpiecznej Żywności) z 2017 roku, gatunek ten był drugim pod względem częstotliwości występowania patogenem obecnym w żywności przetworzonej [16]. Obecność bakterii stwierdza się m.in. w mleku i produktach mlecznych, mięsie i produktach mięsnych oraz warzywnych. Ich spożycie wiąże się z ryzykiem wystąpienia listeriozy, zapalenia żołądka i jelit, zapalenia opon mózgowych, posocznicy, ronienia, posocznicy noworodków oraz wewnątrzmacicznymi infekcjami u ciężarnych kobiet [1]. Listerioza została uznana za najbardziej śmiertelną chorobę odżywnościową wywołaną przez patogeny jelitowe (śmiertelność 30%) [18].

Pałeczki z rodzaju *Listeria* do środowiska dostają się za pośrednictwem organizmów chorych lub nosicieli, gdzie przy sprzyjających warunkach przeżywają, namnażają się i stanowią zagrożenie infekcji. Zjawisko bezobjawowego nosicielstwa jest powszechne zarówno u zwierząt (m. in.: u owiec, kóz, bydła, świń, ptaków i ryb), jak i u ludzi obejmując 5-10% populacji. Bakterie izoluje się najczęściej z przewodu pokarmowego, skąd wraz z kałem przedostają się do środowiska. Skażenie produktów spożywczych pochodzenia roślinnego najczęściej zaczyna się na etapie uprawy i jest skutkiem kontaktu warzyw czy owoców z glebą, odchodami, powietrzem, pyłem, owadami i wodą służącą do nawadniania. Innym istotnym czynnikiem jest też stosowanie (głównie w uprawach organicznych) nawozów naturalnych, rodzaj zabiegów agrotechnicznych, stosowanie skażonych nasion i siewek czy jakość wody wykorzystywanej do nawadniania, itp. [17]. Surowcami szczególnie narażonymi na zanieczyszczenie *L. monocytogenes* są m. in. szpinak, brokuły, kapusta, kalafior, sałata oraz przygotowane z nich surówki i sałatki i inne dania typu „ready-to-eat” [3-5]. W warunkach produkcyjnych na ryzyko skażenia mikrobiologicznego przetwarzanej żywności wpływa sposób przygotowania, przechowywania i transportu żywności, ale również jakość użytych surowców, wody, opakowań, czystości sprzętu, aparatury, higiena pomieszczeń, personelu oraz wdrożonych w zakładach systemów czyszczenia i dezynfekcji [6].

Zdolność do wzrostu w szerokim zakresie temperatur (od -0,4 do 50°C) i pH (od 4,4 do 9,4), oporność na warunki środowiskowe, krótkotrwałą pasteryzację, mrożenie, podprogowe dawki konserwantów, środków myjących oraz zdolność rozwoju w warunkach tlenowych i beztlenowych sprawia, że niektóre rodzaje żywności są szczególnie często zanieczyszczone pałeczkami *L. monocytogenes* [7, 8]. Wśród nich należy wymienić m.in. wyroby garmażeryjne, niepasteryzowane mleko, sery, wędzone ryby, a także surowe warzywa i owoce. Kolejnym elementem sprzyjającym skażeniu żywności, zwłaszcza w zakładach przetwórczych, jest zdolność pałeczek *Listeria* spp. do przywierania i wzrostu na powierzchniach abiotycznych w postaci biofilmu. Struktury te są stałym źródłem ryzyka wtórnego zanieczyszczenia żywności w czasie procesów produkcyjnych. Mogą powodować zepsucie produktu, zagrożenie dla zdrowia konsumenta i spadek bezpieczeństwa produktów żywnościowych. Ponadto hamowanie procesów wymiany ciepła, blokowanie mechanicznie przepływu i biodegradacja składników powierzchni metalicznych i polimerowych powodują znaczne straty finansowe, liczące w skali ogólnoswiatowej miliony dolarów rocznie [9, 10].

Wykrywanie i oznaczanie liczebności bakterii *Listeria* spp. odbywa się obecnie najczęściej z zastosowaniem klasycznych metod mikrobiologicznych w oparciu o normę PN-EN ISO 11290-1:1999 oraz PN-EN ISO 11290-2:2000 [11, 12]. Klasyczne metody, opierające się na hodowli komórek i klasycznych testach mikrobiologicznych, są jednak czasochłonne oraz nie dają wystarczającej pewności wyników, zwłaszcza podczas identyfikacji termicznie zniszczonych bakterii lub mikroorganizmów poddanych różnego rodzaju procesom przemysłowym, uszkadzającym strukturę

komórki [13]. Nowoczesne metody molekularne oraz serologiczne są szybsze, bardziej czułe i specyficzne w wykrywaniu bakterii chorobotwórczych w przetworzonej żywności. Losowa amplifikacja polimorficznego DNA (RAPD), losowych fragmentów swoistych gatunkowo, pozwala na identyfikację rodzajów oraz gatunków mikroorganizmów, poprzez różnicowanie i ocenę stopnia podobieństwa szczepów [14, 15].

Przedmiotem badań jest charakterystyka izolatów *L. monocytogenes* pochodzących ze środowiska, surowców i produktów wybranych zakładów przetwórstwa owocowo-warzywnego na podstawie molekularnych metod mikrobiologicznych.

2. Cele badań

Celem głównym badań jest próba wyizolowania pałeczek *Listeria monocytogenes* z próbek środowiskowych (gleba), surowca, linii technologicznych i gotowego produktu w wybranych zakładach przetwórstwa owocowo-warzywnego, co może pośrednio wpłynąć na poprawę stanu środowiska i obniżenie ryzyka zachorowania pracowników zakładu i konsumentów.

Cele szczegółowe:

- określenie przynależności gatunkowej izolatów *Listeria* spp. na podstawie badań molekularnych,
- określenie możliwej drogi transmisji w obrębie zakładu na podstawie ustalenia stopnia wzajemnego podobieństwa izolatów *L. monocytogenes*,
- ocena wrażliwości drobnoustrojów na wybrane antybiotyki, bakteriocyny i środki dezynfekcyjne.

3. Hipotezy badawcze

Weryfikacji poddano następujące hipotezy badawcze:

1. Zarówno gleba, surowiec, jak i wybrane miejsca zakładu przetwórstwa owocowo-warzywnego stwarzają dobre warunki do występowania pałeczek *Listeria monocytogenes*.
2. Prowadzenie badań monitorujących obecność *L. monocytogenes* w zakładzie pozwoli na ustalenie miejsc najbardziej narażonych na występowanie tego patogenu.
3. Wybrane środki dezynfekcyjne wykażą silne działanie inhibicyjne wobec pałeczek *L. monocytogenes*, co pozwoli na opracowanie skuteczniejszej strategii dezynfekcji zakładu.
4. *L. monocytogenes* wykaże wrażliwość na bakteriocyny oraz lizozym dopuszczone do kontaktu z żywnością, co może zwiększyć bezpieczeństwo konsumenta.
5. Izolaty *L. monocytogenes* są wrażliwe na antybiotyki stosowane w terapii listeriozy.

4. Materiały i metody

Materiał do badań stanowią próbki środowiskowe pochodzące z wymazów dokonanych z elementów linii technologicznej oraz przechowalni, próby surowca, półproduktu i produktu gotowego pobrane w zakładzie przetwórstwa owocowo-warzywnego. Pobieranie wymazów dokonywane jest w odstępach kilkutygodniowych, przez kilkanaście miesięcy, zarówno w trakcie produkcji, jak i po umyciu linii technologicznej. Każdorazowo pobieranych jest od 30 do 60 wymazów.

5.1. Izolacja i identyfikacja pałeczek *Listeria monocytogenes*

Próbki środowiskowe pobierane są z ustalonych powierzchni sterylnym wacikiem i bezpośrednio po tym umieszczane w bulionie pół-Fraser'a. Próbki surowca lub produktu są rozdrabniane i umieszczane w pożywce płynnej. Materiał transportowany jest w temp. +4°C, a dalsza procedura izolacji bakterii jest zgodna z normą PN-EN ISO 11290-1:1999/A 1:2005. Próbki, w których stwierdzono obecność *Listeria monocytogenes* poddawane będą identyfikacji przy wykorzystaniu reakcji PCR, a stopień ich pokrewieństwa - z zastosowaniem techniki RAPD.

5.2. Ocena lekooporności izolatów *L. monocytogenes*

Ocena ta przeprowadzona zostanie metodą krążkowo-dyfuzyjną przy użyciu bibułowych krążków nasączonych antybiotykami rekomendowanymi przez EUCAST w leczeniu listeriozy: penicyliny, ampicyliny, meropenu, erytromycyny oraz sulfametoksazolu z trimetoprimem. Na podstawie stref zahamowania wzrostu izolatów określona zostanie wrażliwość bakterii na działanie poszczególnych antybiotyków.

5.3. Ocena wrażliwości izolatów *L. monocytogenes* na bakteriocyny i lizozym

Ocena oporności na bakteriocyny i lizozym dokonana zostanie na podstawie określenia podatności wyizolowanych szczepów *L. monocytogenes* na różne stężenia wybranych substancji antagonistycznych. Hodowle bakteryjne będą poddane ekspozycji na wzrastające stężenia bakteriocyn i lizozymu, po czym zostanie oznaczone ich minimalne stężenie hamujące.

5.4. Ocena minimalnego stężenia hamującego (MIC) środków dezynfekcyjnych wobec *L. monocytogenes*

Sporządzone zostaną rozcieńczenia wybranych środków dezynfekcyjnych, po czym na płytce titracyjnej naniesiona zostanie zawiesina bakteryjna i dezynfektant. Po odpowiednim czasie działania reakcja zostaje przerwana poprzez dodanie roztworu neutralizującego. Oceniona zostanie przeżywalność bakterii po posiewie punktowym na pożywkę. Za graniczne (MIC), przyjmuje się najniższe stężenie środka powodujące zahamowanie wzrostu *L. monocytogenes*.

5. Stan zaawansowania pracy

Wykonano badania wstępne, które potwierdziły występowanie szczepów z rodzaju *Listeria* w zakładzie przetwórstwa owocowo-warzywnego. Dokonano analizy piśmiennictwa oraz wstępnie opracowano część literaturową pracy. Pozycje literaturowe są uzupełniane równoległe z prowadzonymi badaniami. Część teoretyczna i eksperymentalna pracy wykonana została w 20%. Część eksperymentalna pracy zostanie ukończona do końca 2019 roku, natomiast obrona planowana jest w 2021 roku.

6. Piśmiennictwo

- [1] Molenda J.: Listerioza - patogeneza, perspektywy bezpieczeństwa żywności, *Med. Wet.* 2009, 65 (3).
- [2] Wróblewska S., Misiewicz A.: Wykrywanie i identyfikacja *Listeria monocytogenes* w żywności, *Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego* 2006 t. 61.
- [3] Cianciara J., Juszczak J.: Choroby zakaźne i pasożytnicze, Lublin: Czelej; 2007.

- [4] European Food Safety Authority. Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007. *Listeria*, 2009:135–159.
- [5] Nowicka P. Wojdyło A, Oszmiański J.: Zagrożenia powstające w żywności minimalnie przetworzonej i skuteczne metody ich eliminacji, *Żywność. Nauka. Technologie. Jakość* 2014; 2(93): 5–18.
- [6] Kołakowska A, Madajczak G.: Pałeczki *Listeria monocytogenes* w zakażeniach ludzi, *Przegląd Epidemiolog.* 200; 65: 57–62.
- [7] Murray M, Richard J. A.: Comparative study of the antilisterial activity of nizin A and pediocin AcH in fresh ground pork stored aerobically at 5°C, *J Food Protect.* 1997; 60(12): 1534–1540.
- [8] Budzińska K, Wroński G, Szejniuk B.: Survival time of Bacteria *Listeria monocytogenes* in Water Environment and Sewage, *Pol J Environ Stud.* 2012; 21(1): 31–32.
- [9] Berthold A.: Biofilmy w przemyśle spożywczym, *Post. Tech. Przetw. Spoż.* 1/2007.
- [10] Mosteller T. M., Bishop J. R.: Sanitizer efficacy against attached bacteria in milk biofilm, *J. Food Prot.*, 1993, 53, 34-41.
- [11] Norma PN-EN ISO 11290-1:1999.
- [12] Norma PN-EN ISO 11290-1:2000.
- [13] Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P. i in. (2001): *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants, *Clinical Microbiol. Rev.* 14 (3)584-640.
- [14] Rahman M. T., Uddin M. S., Sultana R., Moue A., Setu M.: *AKMMC J*, 4, 30, 2013.
- [15] Wróblewska S., Misiewicz A.: Wykrywanie i identyfikacja *Listeria monocytogenes* w żywności. *Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego* 2006 t. 61
- [16] RASFF The Rapid Alert System for Food and Feed 2017 Annual Report
- [17] Micelli A., Settani L.: Influence of agronomic practices and pre-harvest conditions on the attachment and development of *Listeria monocytogenes* in vegetables, *Annals of Microbiol.* (2019) 69:185–199.
- [18] Sołtysiuk M. M., Sztejn J., Wiszniewska-Łaszczych A.: Bakterie z rodzaju *Listeria* zagrożeniem dla zdrowia ludzi i zwierząt, DOI: [dx.doi.org/10.21521/mw.6141](https://doi.org/10.21521/mw.6141).