

## Verifikace predikce růstu mikroorganismu *Listeria monocytogenes* v drůbežím mase\*

ALEŠ LANDFELD<sup>1</sup>, RENATA KARPÍŠKOVÁ<sup>2</sup>, MILAN HOUŠKA<sup>1</sup>, KAREL KÝHOS<sup>1</sup>, PAVLA NOVOTNÁ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Food Research Institute Prague, Prague; <sup>2</sup>National Institute for Public Health, Prague, Center of Food Chains Hygiene, Brno, Czech Republic

### Abstract

LANDFELD A., KARPÍŠKOVÁ R., HOUŠKA M., KÝHOS K., NOVOTNÁ P. (2000): **Verification of prediction of growth of *Listeria monocytogenes* micro-organism in chicken meat.** Czech J. Food Sci., 18: 183–186.

Raw chicken meat was comminuted and homogenized. There were measured water activity and pH ( $a_w = 1$  for temperature 25°C, pH = 5.8 for temperature 8°C). Input raw material was investigated for the presence of *Listeria monocytogenes* (negative) and the raw meat was inoculated by *Listeria monocytogenes* CCM 4699. Number of *Listeria monocytogenes*, total plate count and number of coliforms were determined in the range 0–7 days by bacteriological survey for the storage temperatures 4.9, 7 and 8.3°C. The increase of *Listeria monocytogenes* counts has been registered for temperature 4.9°C about log 1.5 CFU/g after 6 days, for temperatures 7 and 8.3°C about 2 logCFU/g (regarding to the starting counts). The prediction for listeria growth with the aid of Food MicroModel was also made. The best agreement between the experimentally analysed number of bacteria and prediction was received for the lowest incubation temperature 4.9°C.

**Key words:** micro-organism; *Listeria monocytogenes*; chicken meat; Food Micromodel verification

### Souhrn

LANDFELD A., KARPÍŠKOVÁ R., HOUŠKA M., KÝHOS K., NOVOTNÁ P.: **Verifikace predikce růstu mikroorganismu *Listeria monocytogenes* v drůbežím mase.** Czech J. Food Sci., 18: 183–186.

Syrové kuřecí maso bylo umleto, zhomogenizováno, změřena aktivita vody a pH ( $a_w = 1$  při teplotě 25 °C, pH = 5,8 při teplotě 8 °C). Vstupní surovina byla vyšetřena na průkaz bakterii rodu *Listeria* (negativní nález) a potom byla provedena inokulace kmenem *Listeria monocytogenes* CCM 4699. Mikrobiálním vyšetřením v rozmezí 0–7 dnů byl stanovován počet listerií, celkový počet mikroorganismů a koliformních bakterií při teplotách skladování 4,9; 7 a 8,3 °C. Při teplotě 4,9 °C došlo po šesti dnech ke zvýšení počtu bakterií *Listeria monocytogenes* v kuřecím mase o 1,5 řádu, při teplotách 7 a 8,3 °C o 2 řády (vzhledem k počátečnímu množství). Zároveň byla provedena predikce růstu *Listerií* sp. s použitím prediktivní databáze Food Micromodel. Nejlepší shody modelu s experimentálně analyzovanými počty bakterií bylo dosaženo při nejnižší teplotě inkubace (cca 4,9 °C).

**Klíčová slova:** mikroorganismus; *Listeria monocytogenes*; kuřecí maso; verifikace predikce Food Micromodelem

V ČR zaznamenáváme stále vyšší produkci chlazené drůbeže a drůbežích polotovarů. U těchto výrobků je doporučeno skladování při teplotě kolem 5 °C po dobu maximálně 5 dnů. Některé druhy bakterií se však mohou pomnožovat i při nízkých teplotách. Mezi ně patří také *L. monocytogenes*. Při nevhodné manipulaci s drůbežími výrobky během transportu od výrobce, uskladnění v obchodní síti a dále po zakoupení spotřebitelem může docházet k pomnožení listerií a popřípadě ke kontaminaci ostat-

ních potravin nebo prostředí v domácnostech (lednice, pracovní plochy, nástroje apod.). Proto jsme se zaměřili na chlazenou drůbež a na výrobky, ve kterých jsou listerie často prokazovány (LAWRENCE, GILMOUR 1994; SHINEMAN, HARRISON 1994).

V naší předchozí práci (HOUŠKA *et al.* 1999) jsme se zabývali teplotní historií chlazených kuřat od porážky až po distribuci do domácnosti. S použitím prediktivní databáze Food Micromodel (FMM) jsme provedli teoretic-

\*Práce byla vypracována s podporou NAZV, grant č. EP 6260, a GA ČR, grant č. 101/99/1617.



kou kvantitativní analýzu rizika růstu nejrozšířenějších patogenních mikroorganismů pro zjištěnou teplotní historii kuřat. Bylo zjištěno zvýšené riziko pomnožení yersinií a listerií, kterým vyhovují k růstu teploty okolo 5 °C a vysoké hodnoty aktivity vody a hodnoty pH kuřecího masa. Jelikož použitá prediktivní databáze uvažuje růst samotného mikroorganismu v živném roztoku, je zpravidla predikovaný nárůst na straně bezpečnosti. Ve skutečném substrátu totiž existuje konkurence nepatogenní mikroflóry, která zpravidla nedovolí tak rychlý nárůst patogenů. BEAUFORT *et al.* (1999) porovnávali predikci a skutečný růst mikroorganismů v reálných systémech a upozorňují, že tomu tak nemusí být vždy.

Velmi nebezpečným patogenem (úmrtí až 30 %) zejména pro osoby se sníženou imunitou a těhotné ženy jsou mikroorganismy druhu *Listeria monocytogenes*, pro něž jsme predikovali možný značný nárůst. Abychom se přesvědčili, zda získaná predikce odpovídá reálným podmínkám kuřecího masa, provedli jsme ve spolupráci s Národní referenční laboratoří pro listerie tento pokus.

## MATERIÁL A METODY

**Příprava vzorků:** Čerstvé vychlazené kuřecí řízků byly odebrány v ranních hodinách přímo z výrobní linky. Po jejich umletí v masovém mlýnku byl z homogenátu odebrán vzorek na stanovení pH vpichovým pH-metrem Sentron 1001 (Nizozemsko) a ke stanovení aktivity vody na přístroji Rotronic typ AM3 se sondou AWVD (Švýcarsko).

**Mikrobiologický rozbor:** Zbylá homogenizovaná masná surovina byla umístěna do přepravního boxu spolu s chladicími vložkami a co nejrychleji převezena z VÚPP do Centra hygieny potravinových řetězců Brno. Zde byla surovina nejprve vyšetřena na průkaz bakterií rodu *Listeria*. Poté byla provedena inokulace kmenem *Listeria monocytogenes* CCM 4699 z předem namnožené lyofylizované kultury tak, aby výsledná denzita listerií v masě byla cca 800 CFU (kolonie tvořících jednotek) na gram masa. Každý vzorek byl po přidání inokula zhomogenizován ve stomacheru. Vlastní vyšetření počtu listerií bylo prováděno podle normy EN ISO 11290-1 (Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu bakterií *Listeria monocytogenes*) a 11290-2. K vyšetření bylo použito médium Rapid *Listeria monocytogenes* (Sanofi Diagnostics Pasteur, s. r. o., Praha). Kromě vyšetření na listerie bylo provedeno stanovení celkového počtu mikroorganismů a počtu koliformních bakterií standardními metodami podle příslušných ČSN ISO. Veškerá stanovení byla provedena třikrát a jako výsledek byl vzat aritmetický průměr.

Mikrobiální vyšetření počtu listerií bylo prováděno v první, druhý, třetí, čtvrtý a sedmý den po inokulaci. Vyšetření počtu koliformních bakterií bylo provedeno v nultý, druhý, čtvrtý a sedmý den. Kromě růstu listerií v masném homogenátu byl sledován také jejich růst v ředícím fyziologickém roztoku s 1 % peptonu při inkubaci za stejných teplot jako masná surovina. Denzita

u tohoto stanovení byla vyjádřena ve stupních McFarlanda, tj. 0,5 se rovná cca  $10^8$  bakterií.

**Snímání teploty:** Jednotlivé odděleně inokulované a balené vzorky byly skladovány ve třech chladicích skříních s rozdílnou teplotou. Ke vzorkům byly uloženy paměťové teploměry typ Tinytalk (Gemini, Velká Británie), které zaznamenávaly s minutovým intervalem průběh teploty vzorků po celou dobu inkubace. Na základě těchto záznamů byly stanoveny průměrné teploty masa použité k dalším výpočtům.

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Na základě vyhodnocení záznamů paměťových čidel byly vypočteny průměrné teploty skladování inokulovaných vzorků – 4,9; 7 a 8,3 °C. Hodnota aktivity vody masa při průměrné teplotě okolí 25 °C byla rovna jedné, proto nebylo nutné měřit aktivitu vody při nižších teplotách (je stále rovna jedné). Hodnota pH kuřecího masa o teplotě 8 °C byla rovna 5,8.

Vyšetření homogenizovaného kuřecího masa na přítomnost listerií bylo negativní. Výsledky analýzy vzorků nejsou v modelových pokusech zkresleny přítomností dalších druhů listerií v samotném vzorku.

Výsledky vyšetření počtu listerií v průběhu inkubace (tab. 1) byly časově posunuty zpět o jeden den, neboť výchozí koncentrace 800 CFU/g nebyla stanovena mikrobiální analýzou vzorků, ale dopočtem z koncentrace inokula po ředění a z hmotnosti vzorku masa. Tento dopočet byl pravděpodobně zatížen chybou, takže jsme vzali za výchozí počet pro modelování a porovnání s predikcí FMM výsledek mikrobiologického stanovení za 24 hod po inokulaci. Při uvažování výchozího počtu 800 CFU/g by totiž za první den inkubace došlo k velmi rychlému nárůstu populace (o více než jeden řád), což je značně nepravděpodobné, neboť bakterie jsou po inokulaci v lag fázi (v tab. 1 chování mezi nultým a prvním dnem i po posunutí odpovídá ještě tomuto stavu).

V tab. 2 jsou uvedeny výsledky vyšetření celkového počtu mikroorganismů a koliformních bakterií. Den nula (0) reprezentuje původní vzorek mletého masa bez přidá-

Tab. 1. Stanovení počtu CFU *Listeria monocytogenes* v kuřecím masě po transformaci počátku o 1 den – Experimental results of CFU of *Listeria monocytogenes* in chicken meat after transformation of start on one day

| Den <sup>1</sup> | 4,9 °C            | 7 °C              | 8,3 °C            |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 0                | $1,0 \times 10^4$ | $1,5 \times 10^4$ | $2,5 \times 10^4$ |
| 1                | $1,3 \times 10^4$ | $1,3 \times 10^4$ | $3,5 \times 10^4$ |
| 2                | $2,0 \times 10^4$ | $2,0 \times 10^4$ | $2,0 \times 10^5$ |
| 3                | $2,5 \times 10^4$ | $3,0 \times 10^4$ | $6,5 \times 10^5$ |
| 6                | $1,5 \times 10^5$ | $1,3 \times 10^6$ | $2,5 \times 10^6$ |

<sup>1</sup>day



Tab. 2. Stanovení celkového počtu mikroorganismů (CPM) a koliformních bakterií v mase – Experimental data of total microbiological counts (CPM) and coliform bacteria

| Den <sup>1</sup> | CPM (CFU/ml)      |                   |                   | Koliformní bakterie <sup>2</sup> (CFU/ml) |                   |                   |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---|-------------------|-------------------|
|                  | 4,9 °C            | 7 °C              | 8,3 °C            | 4,9 °C                                    | 7 °C              | 8,3 °C            |
| 0                | $1,5 \times 10^4$ | $1,6 \times 10^3$ |                   |   |                   |                   |
| 1                | –                 | –                 |                   |   |                   |                   |
| 2                | $2,5 \times 10^4$ | $7,0 \times 10^4$ | $4,0 \times 10^5$ | $3,0 \times 10^3$                         | $9,0 \times 10^3$ | $4,5 \times 10^4$ |
| 3                | –                 | –                 |                   |   |                   |                   |
| 4                | $7,0 \times 10^4$ | $5,6 \times 10^5$ | $3,0 \times 10^7$ | $5,0 \times 10^3$                         | $1,0 \times 10^4$ | $5,0 \times 10^5$ |
| 7                | $2,0 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^7$ | $1,0 \times 10^8$ | $6,5 \times 10^4$                         | $2,0 \times 10^6$ | $1,0 \times 10^7$ |

<sup>1</sup>day; <sup>2</sup>coliform bacteria

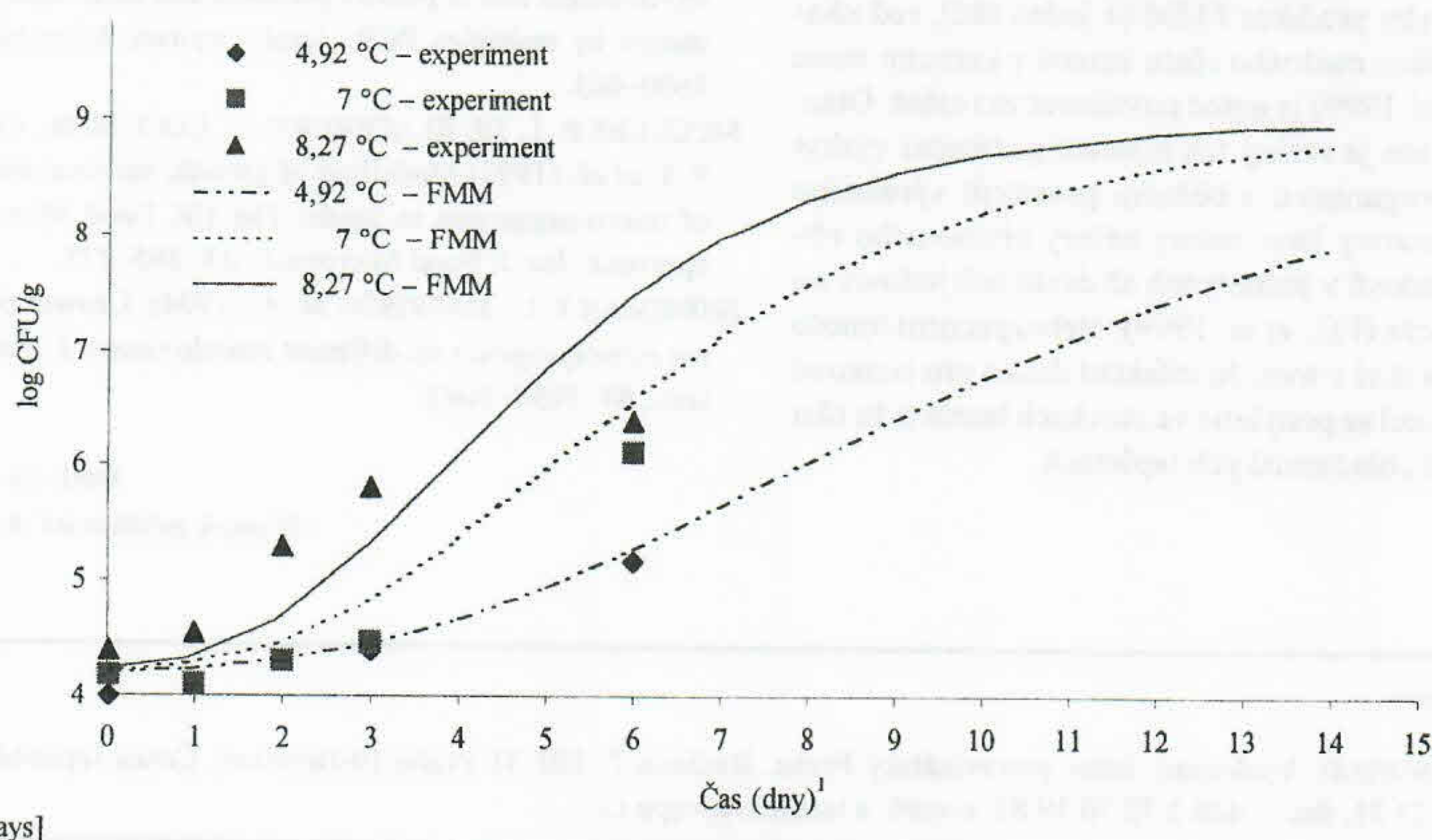
ni inokula s listeriemi. Zde nebyla data časově posouvána, neboť stanovení počtů bylo provedeno vždy mikrobiologickými metodami. Je patrné, že docházelo k poměrně značnému nárůstu koliformních bakterií i celkového počtu mikroorganismů.

Růst populace listerií v ředicím roztoku byl poměrně nízký, což mohlo být způsobeno poměrně vysokou původní denzitou buněk a dále po stránce živin poměrně chudým médiem (brzy byla dosažena stacionární fáze růstu). Toto stanovení bylo provedeno bez přítomnosti konkurenční mikroflóry.

Predikce růstu listerií pro model *Listeria monocytogenes* (Lactic) (přípona znamená, že pH bylo při tvorbě modelu ovlivněno kyselinou mléčnou) byla provedena pro průměrný výchozí počet mikroorganismů pro všechny vzorky 4,2 CFU/g pro pH = 5,8 a aktivitu vody 1,0 a pro teploty skladování masa zjištěné při inkubaci. Při predikci byl vzat model včetně lag fáze.

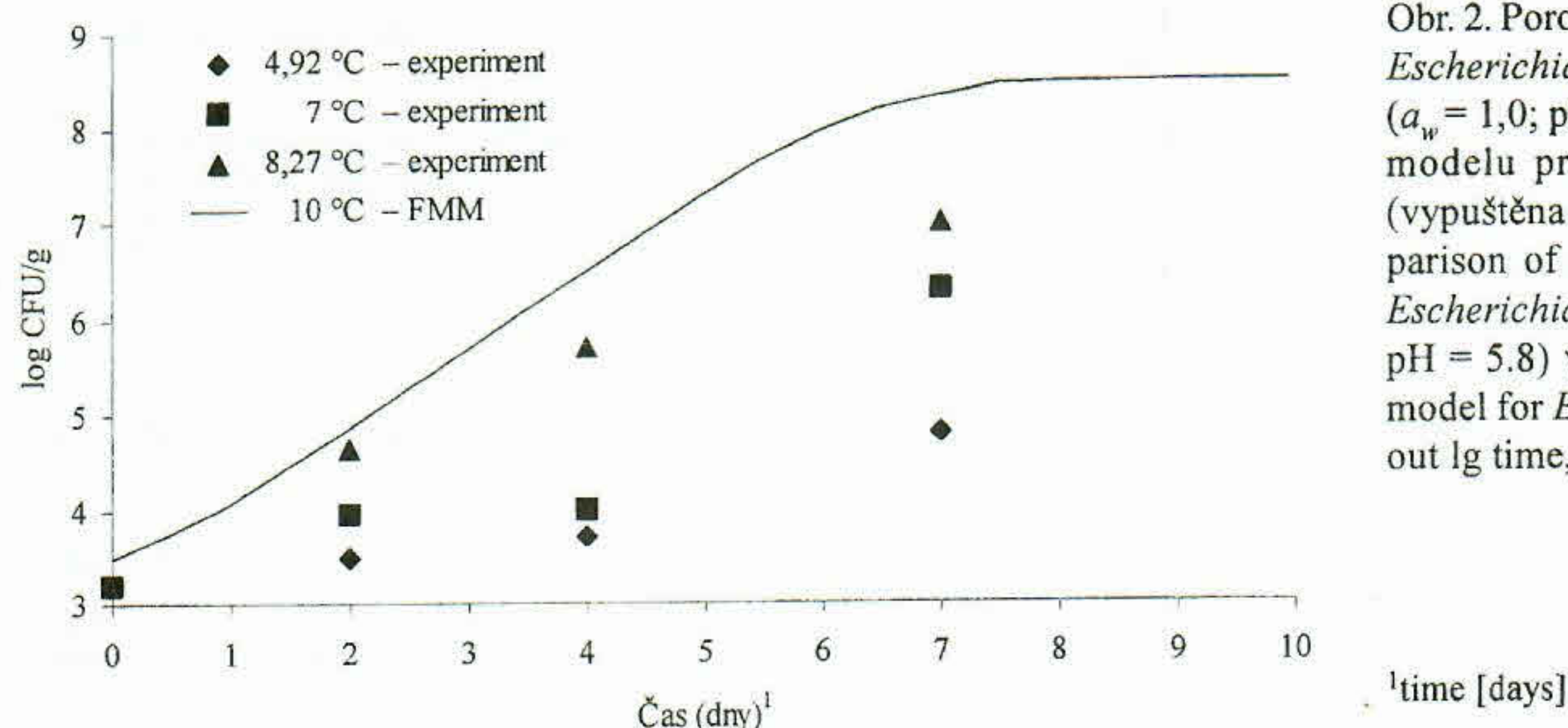
Výsledky predikcí jsou uvedeny na obr. 1 jako souvislé čáry. Z obrázku je patrné, že při nejvyšší teplotě inkubace probíhá skutečný růst mikroorganismů poněkud rychleji než je predikováno do doby 3 dnů. Poté se skutečný růst značně zbrzdil. Pro inkubační teplotu 7 °C je predikovaný růst nad naměřenými koncentracemi po celou sledovanou dobu. Nejlepší shody modelu s naměřenými počty mikroorganismů bylo dosaženo při nejnižší teplotě inkubace cca 5 °C. V tomto případě naměřená data prakticky sledují predikovaný průběh.

Pro velmi hrubé porovnání růstu koliformních bakterií jsme zvolili z FMM jediného zástupce, kterým je patogenní *Escherichia coli* O157:H7. Model však platí až od teploty 10 °C a proto jsme predikci provedli pro tuto teplotu, přestože vzorky byly skladovány při teplotách mnohem nižších. Při predikci jsme vyloučili lag fázi, neboť mikroorganismy nebyly do masa inokulovány, ale mikroorganismy byly na jeho prostředí plně adaptovány. Po-

<sup>1</sup>time [days]

Obr. 1. Porovnání experimentálních dat růstu *L. monocytogenes* CCM 4699 v kuřecím mase ( $a_w = 1,0$ ; pH = 5,8) při různých teplotách s predikcí Food Micromodelu (*Listeria monocytogenes* [Lactic]), počáteční log CFU/g = 4,2 – Comparison of experimental values of growth *L. monocytogenes* CCM 4699 at chicken meat ( $a_w = 1,0$ ; pH = 5,8) during different temperatures with prediction Food Micromodel (*Listeria monocytogenes* [Lactic]), initial log CFU/g = 4.2





Obr. 2. Porovnání experimentálních dat růstu *Escherichia coli* na vzorku kuřecího masa ( $a_w = 1,0$ ; pH = 5,8) s predikcí Food Micro-modelu pro *Escherichia coli* O157:H7 (vypuštěna lag fáze, teplota 10 °C) – Comparison of experimental values of growth *Escherichia coli* at chicken meat ( $a_w = 1,0$ ; pH = 5,8) with prediction of Food Micro-model for *Escherichia coli* O157:H7 (without lg time, temperature 10 °C)

rovnání predikce pro teplotu 10 °C s naměřenými daty (tab. 2) je provedeno v obr. 2. Je patrné, že trend predikované závislosti sleduje velmi zhruba data získaná pro průměrnou teplotu inkubace 8,3 °C do cca 4 dnů sledování. Z bakterií uvedených v programu Food Micromodel jsou uvedeny jen nejvýznamnější zástupci bakterií. Z čeledi Enterobacteriaceae jsou to bakterie rodu *Salmonella*, *Yersinia* a *E. coli* O157. Proto byl pro orientační stanovení predikce růstu koliformních bakterií použit serotyp *E. coli* O157 i když se v některých znacích od ostatních *E. coli* liší.

### Závěr

Porovnání predikovaných průběhů s experimentálními výsledky inkubace *Listeria monocytogenes* v kuřecím masu ukazuje na dobrou shodu modelu FMM s realitou. Odchytky jsou v rozsahu chyb experimentálního stanovení, resp. chyby predikce FMM ( $\pm$  jeden řád), což ukazuje, že predikce možného růstu listerií v kuřecím masu (HOUŠKA *et al.* 1999) je nutné považovat za reálné. Otázkou zůstává, zda je reálný tak masivní počáteční výskyt tohoto mikroorganismu v běžném prostředí výrobního závodu. Z literatury jsou známy nálezy přirozeného obsahu listerií řádově v jednotkách až desítkách jedinců na povrchu drůbeže (FEU *et al.* 1999). Nebezpečnost tohoto patogena však tkví v tom, že infekční dávka pro rizikové skupiny obyvatel se pohybuje ve stovkách buněk a že růst je možný i při chladírenských teplotách.

### Literatura

- BEAUFORT A., RUDELLE S., BERGIS H. (1999): Growth of pathogens in food: comparison between experimental results and data of Food Micromodel. Paper 170. In: 20<sup>th</sup> Int. Congr. Refrigeration, IIR/IIF, Sydney.
- FEU M. R., RODRIGUEZ J. J., QUINTO E. J., ROIG A. X., HERNANDEZ M. M., MORA M. T. (1999): Growth of *Listeria* on packaged and non-packaged poultry carcasses at 24 and 48 hours refrigerated storage. Paper 718. In: 20<sup>th</sup> Int. Congr. Refrigeration, IIR/IIF, Sydney.
- HOUŠKA M., LANDFELD A., STROHALM J., KÝHOS K., NESVADBA P. (1999): Teplotní historie chlazeného kuřete v průběhu zpracování a dopravy včetně analýzy nebezpečí růstu vybraných mikroorganismů. Czech J. Food Sci., 17: 188–195.
- LAWRENCE L. M., GILMOUR L. (1994). Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. Appl. Environ. Microbiol., 60: 4600–603.
- MCCLURE P. J., DE BLACKBURN C., COLE M. B., CURTISS P. S. *et al.* (1994) Modelling of growth, survival and death of micro-organisms in foods: The UK Food Micromodel approach. Int. J. Food Microbiol., 23: 265–275.
- SHINEMAN T. L., HARRISON M. A. (1994): Growth of *Listeria monocytogenes* on different muscle tissue. J. Food Protect., 57: 1057–1062.

Došlo 30. 3. 2000

Přijato k publikování 8. 9. 2000

### Kontaktní adresa:

Ing. ALEŠ LANDFELD, Výzkumný ústav potravinářský Praha, Radiová 7, 102 31 Praha 10-Hostivař, Česká republika, tel.: + 420 2 72 70 23 21, fax: + 420 2 72 70 19 83, e-mail: a.landfeld@vuppp.cz