

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA
Katedra hygieny a bezpečnosti potravín

**Modelovanie vybraných parametrov prežívania *Listeria*
monocytogenes v potravinovom reťazci**

Autoreferát dizertačnej práce
na udelenie akademického titulu philosophiae doctor
v študijnom programe doktorandského štúdia Technológia potravín
v študijnom odbore 6.1.13
Spracovanie poľnohospodárskych produktov

Ing. Ján Čarnogurský

Nitra 2007

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre hygieny a bezpečnosti potravín Fakulty biotechnológie a potravinárstva Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorand: **Ing. Ján Čarnogurský**
Katedra hygieny a bezpečnosti potravín
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: **prof. MVDr. Jozef Sokol, DrSc.**
Katedra hygieny a bezpečnosti potravín
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Školiteľ – konzultant: **doc. Ing. Jozef Golian, Dr.**
Katedra hygieny a bezpečnosti potravín
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Oponenti: **prof. MVDr. Lenka Vorlová, PhD.**
Fakulta veterinárnej hygieny a ekológie
Sekcia hygieny a technológie potravín
Ústav hygieny a technológie mlieka
Veterinárna a farmaceutická univerzita Brno
prof. MVDr. Miloslav Ondrašovič, CSc.
Katedra životného prostredia
Ústav hygieny zvierat a životného prostredia
Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach
doc. Ing. Miroslava Kačániová, PhD.
Katedra mikrobiológie
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Autoreferát bol odoslaný dňa

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra hygieny a bezpečnosti potravín, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Obhajoba doktorandskej dizertácie sa koná dňa 28.9.2007 o 11⁰⁰ h pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác študijného programu doktorandského štúdia Technológia potravín v študijnom odbore 6.1.13 Spracovanie poľnohospodárskych produktov na Fakulte biotechnológie a potravinárstva, Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Miesto konania: Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Miestnosť: č.16

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte Fakulty biotechnológie a potravinárstva.

Predseda komisie pre obhajoby v študijnom programe doktorandského štúdia Technológia potravín v študijnom odbore 6.1.13 Spracovanie poľnohospodárskych produktov

.....
prof. Ing. Zdenka Muchová, CSc.
FBP SPU v Nitre

ABSTRAKT

Listeria monocytogenes je významným patogénom nachádzajúcim sa vo vysokej miere v prostredí, odkiaľ môže preniknúť do surovín a následne do potravín a takto ohroziť zdravie spotrebiteľa. Je pôvodcom závažného alimentárneho ochorenia nazývaného listerióza, ktoré postihuje zvieratá ako aj človeka. Simulácia správania sa listérií pri rôznych podmienkach vo rôznych potravinách prináša poznatky, ktoré môžu napomôcť k účinnejšej eliminácii a znižovaní rizika ich výskytu.

V tejto práci bol sledovaný rast *Listeria monocytogenes* v surovom kravskom mlieku, surovom ovčom mlieku a v syrovom korbáčiku pri rôznych teplotách (0 – 4 °C, 6 °C, 22 °C, 30 °C, 37 °C a 42 °C). Tieto substráty boli zvolené kvôli svojmu zloženiu, ktoré predstavuje ideálne podmienky pre rast a rozmnožovanie listérií ako aj pre spôsob spracovania, pri ktorom značne narastá riziko kontaminácie. Na infekciu bol použitý referenčný kmeň *Listeria monocytogenes* s označením CCM 4699/ATCC 19117, sérovar 4d z Katalógu českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne.

Infikované vzorky boli umiestnené pri termostatových teplotách (22 °C, 30 °C, 37 °C a 42 °C) počas 24 hodín; pri chladničkových (0 – 4 °C a 6 °C) počas 216 hodín. Kultivácia prebiehala podľa nasledovného časového harmonogramu: chladničkové teploty – odber po 24, 48, 120, 168 a 216 hodinách, celková dĺžka pozorovania 9 dní; termostatové teploty – odber po 1, 3, 6, 9, 12, 16, 20 a 24 hodinách, celková dĺžka pozorovania 1 deň. Počiatočná úroveň kontaminácie sa pohybovala na úrovni 10^5 KTJ v 1 ml. Zisťoval sa tiež počiatočný a konečný CPM.

Pri chladničkových teplotách sa trvanie lag-fázy pohybovalo v rozmedzí 24 až 48 hodín. Po uplynutí tejto doby nastala fáza exponenciálneho rastu. Nárast počtu mikroorganizmov bol na úrovni dvoch rádov.

Pri termostatových teplotách uplynula lag-fáza spravidla do troch hodín. Nástup exponenciálnej fázy sa urýchl'oval spolu s narastajúcou teplotou. Počet mikroorganizmov sa zväčšil na maximálnu hranicu o tri resp. štyri rády v závislosti od teploty kultivácie.

Kľúčové slová: *Listeria monocytogenes*, listerióza, prediktívne modelovanie, rastová krivka

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is an important pathogene widespread in environment, from where it can get in to the raw material and also food and may damage consumer's health. This bacterium causes a serious alimentary disease called listeriosis, which can threaten both animals and humans. The simulation of listeria's behaviour in different conditions in various food brings knowledge that can help increase the effect of elimination and decrease the risk of its occurrence.

This work was aimed on observing growth of *Listeria monocytogenes* in raw cow milk, raw sheep milk and in cheese called „Korbáčik” within several temperatures (0 – 4 °C, 6 °C, 22 °C, 30 °C, 37 °C a 42 °C). These media were chosen because of their ingredients, which represents optimal conditions for growth and reproduction of *Listeria* and also due to processing technique where significantly grows the risk of contamination. The samples were infected by using the reference strain CCM 4699/ATCC 19117, serotype 4d from Catalogue of Czech collection of microorganisms of Masaryk's university in Brno.

The infected samples were placed within thermoregulated temperatures (22 °C, 30 °C, 37 °C and 42 °C) during 24 hours and within refrigerated temperatures (0 – 4 °C and 6 °C) during 216 hours. The cultivation was executed in this way: refrigerated temperatures – after 24, 48, 120, 168 and 216 hours, with total length of observation 9 days; thermoregulated temperatures – after 1, 3, 6, 9, 12, 16, 20 and 24 hours, with total length of observation 1 day. The initial level of contamination was 10^5 CFU per ml. The initial and final TBC was detected, too.

Lag-phase duration within refrigerated temperatures was between 24 and 48 hours long. After that time the phase of exponential growth had started. The increase of *Listeria* count was by two logarithmic units.

Lag-phase duration within thermoregulated temperatures finished generally up to 3 hours. The beginning of the exponential phase was faster along with increasing temperature. The *Listeria* count had maximally increased from three to four logarithmic units dependently on the temperature of cultivation.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, listeriosis, predictive modeling, growth curve

POUŽITÉ OZNAČENIE

ATCC	American Type Culture Collection
a_w	aktivita vody
CCM	Czech collection of microorganisms
CFU	colonies forming units
CNS	centrálny nervový systém
CPM	celkový počet mikroorganizmov
EC/EEC/ES/EÚ	European Community European Economic Community Európske spoločenstvo Európska únia
EFSA	European Food Safety Authority
E_h	Redox – potenciál
HD	hovädzí dobytok
HTC	hydroxytetracyklín
K	syrový korbáčik
KTJ	kolónie tvoriace jednotku
PCR	polymerase chain reaction
pH	pondus hydrogeni
PNC	penicilín
TBC	total bacteria count
SKM	surové kravské mlieko
SOM	surové ovčie mlieko
ŠVPÚ	Štátny veterinárny a potravinový ústav
WHO	World Health Organization

O B S A H

1	ÚVOD	6
2	CIEĽ PRÁCE	7
3	MATERIÁL A METÓDY	8
3.1	Charakteristika materiálu	8
3.2	Prístroje, pomôcky a príprava vzoriek	9
3.3	Použité metódy a pracovný postup	10
3.4	Štatistické ukazovatele	12
4	VÝSLEDKY	13
5	NÁVRH NA VYUŽITIE VÝSLEDKOV	16
6	ZÁVER	18
7	PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU	20

1 ÚVOD

Problematika bezpečnosti a zdravotnej neškodnosti potravín zohráva mimoriadnu úlohu v rámci priorít pri kontrole výroby a manipulácii s potravinami. Spolu s rozvíjaním možností a presnosti používaných detekčných techník vzrastá aj význam posudzovania kvality potravinárskych produktov a akosti ich jednotlivých zložiek z mikrobiologického hľadiska vo všetkých stupňoch výroby a spracovania. Ako hodnotiace kritérium preukazuje svoju dôležitosť spolu s technologickými, hygienickými a nutričnými parametrami. Otázky kvality a zdravotnej neškodnosti potravín, spoločne so zreteľom na ochranu životného prostredia, sa stávajú stále viac predmetom záujmu nielen odborníkov z rôznych profesií a vedných disciplín, ale aj laickej verejnosti.

V súčasnej dobe sa stále častejšie hovorí o ochoreniach, ktoré vznikajú v súvislosti s konzumáciou potravín. Kvôli eliminácii nepriaznivých dopadov alimentárnych ochorení na zdravie ľudí a situáciu v spoločnosti, je nevyhnutné dodržiavať predpísané hygienické podmienky počas celého spracovateľského procesu ako aj predaja potravín. Pri posudzovaní zdravotného rizika je dôležitým faktorom stupeň mikrobiálnej kontaminácie. Spolu so zvyšovaním celkového počtu a patogenity jednotlivých druhov rastie aj nebezpečenstvo vzniku a šírenia nákaz.

Listeria monocytogenes sa zaraďuje k patógeným mikroorganizmom, ktoré môžu vyvolať vznik alimentárneho ochorenia – listeriózy. Jej výskyt v potravinách je nežiadúci a podlieha prísnemu sledovaniu.

Popri dokazovaní prítomnosti *L. monocytogenes* štandardnými laboratórnymi metódami nadobúda význam aj vytváranie modelových simulácií pre jej rast a výskyt v prostredí a surovinách. Výhodou takéhoto modelovania je jeho okamžitá realizovateľnosť a bezprostredná dostupnosť údajov. Poznanie zákonitostí ovplyvňujúcich rast a charakterizujúcich jeho priebeh umožňuje tiež vysokú reprodukovateľnosť dosiahnutých výsledkov.

2 CIEĽ PRÁCE

Naplnenie cieľa zvolenej témy dizertačnej práce spočíva:

- v sledovaní hodnoty maximálnej rýchlosti rastu a dĺžky trvania lag-fázy baktérie *Listeria monocytogenes* vo vybraných substrátoch (surové kravské mlieko, surové ovčie mlieko, syrové korbáčiky), v závislosti od podmienok prostredia (teplota, pH, a_w),
- vo vytvorení matematických modelov pri známych hodnotách rastových parametrov vo zvolenom teplotnom rozmedzí,
- v spracovaní dosiahnutých výsledkov týchto veličín do grafov pomocou vytvorenia rastových kriviek,
- v charakteristike rozdielneho priebehu rastovej krivky medzi jednotlivými použitými substrátmi,
- v porovnaní teoreticky predpovedaných a prakticky stanovených hodnôt charakterizujúcich rast *Listeria monocytogenes*.

3 MATERIÁL A METÓDY

Téma predkladanej dizertačnej práce nadväzuje na výskumnú úlohu VEGA 1/3475/06 „Zvyšovanie bezpečnosti potravín prostredníctvom integrovaného prístupu analýzy rizika vo vzťahu ku zdraviu človeka”.

Experimentálna časť dizertačnej práce bola realizovaná na Štátnom veterinárnom a potravinovom ústave v Dolnom Kubíne v Národnom referenčnom laboratóriu pre *Listeria monocytogenes*, ktoré je akreditovaným zariadením pre takýto druh činnosti. Pokusy boli vykonané v období marec 2006 až máj 2007. Celkovo bolo vyšetrených 96 vzoriek.

3.1 Charakteristika materiálu

Pre realizáciu experimentu spojenú so sledovaním rastových parametrov boli zvolené nasledovné substráty:

- surové kravské mlieko,
- surové ovčie mlieko,
- syrové korbáčiky (vyrobené z kravského mlieka).

Ich výber bol ovplyvnený skutočnosťou, že obidve suroviny spolu s hotovým výrobkom svojim zložením a konzistenciou, ako aj pôvodom a spôsobom získavania predstavujú ideálne médium pre rast a rozmnožovanie *Listeria monocytogenes*. Pravdepodobnosť jej výskytu vzrastá so zhoršujúcimi sa hygienickými podmienkami pri nedodržaní predpísaných technologických postupov. Z tohto hľadiska môžeme mlieko a mliečne výrobky zaradiť medzi potraviny vysokorizikové. Rozhodnutie sledovať rast listérií práve v týchto substrátoch bolo tiež ovplyvnené aj faktom, že väčšina nájdených zdrojov sa zaoberala rastom *L. monocytogenes* v rybacích alebo mäsových výrobkoch.

Vzorky pochádzali zo salašov, mliekarní a spracovateľských prevádzok z rôznych miest na území Slovenskej republiky. Odber vzoriek sa uskutočňoval v rámci stanovení, ktoré pravidelne vykonávajú na ŠVPÚ v Dolnom Kubíne za účelom povinného vyšetrenia predpísaných mikrobiologických ukazovateľov. Vzorky boli uchovávané v chlade pri teplote 2 – 6 °C a boli spracované do 24 hodín po vykonaní odberu.

3.2 Prístroje, pomôcky a príprava vzoriek

Pred začatím experimentu boli pre každý substrát stanovené hodnoty pH (pomocou pH metra) a a_w (prístrojom Novasina AW SPRINT TH-500). Pre obidva ukazovatele sa urobilo päť nasledujúcich meraní z ktorých sa vypočítala priemerná hodnota. Pri posudzovaní zloženia sa vychádzalo z všeobecne udávaných hodnôt, nevykonan sa žiadne dodatočný rozbor. Zaznamenané hodnoty slúžili ako podklady pre charakteristiku prostredia v ktorom bol sledovaný rast mikroorganizmu.

Pred použitím každého substrátu bolo pomocou naočkovania na Petriho miskú s použitím média ALOA agar preukázané, že žiadna zo vzoriek nie je prvotne kontaminovaná *Listeria monocytogenes*, čo by mohlo negatívne ovplyvniť rast referenčného kmeňa a skresliť výsledok.

Na infikovanie vzoriek bol použitý referenčný kmeň *Listeria monocytogenes* s označením CCM 4699/ATCC 19117, sérovar 4d z Katalógu českej zbierky mikroorganizmov Masarykovej univerzity v Brne. Dodáva sa vo forme želatínových diskov, ktoré je potrebné regenerovať. Vzniknutý roztok sa upravil na suspenziu so zákalom 0,1 McFarlanda, z čoho sa pripravil počiatočný inokulát s množstvom 10^5 KTJ v 1 ml. Počiatočná úroveň reprezentovaná daným množstvom bola zvolená z ohľadom na skutočnosť, že listérie a mikroflóra prirodzene vyskytujúca sa v surovom mlieku sú antagonistickým vzťahom. Kvôli tomu bolo nevyhnutné zabezpečiť aby mohli prevládať nami sledované listérie.

Pomôcky:

- Petriho misky
- automatická pipeta (s kalibráciou objemu 1000 μ l)
- umelohmotné špičky (1 ml)
- sklenené pipety (1 ml)
- sklenené hokejky
- skúmavky (20 ml)
- hliníkové zátky
- stojan na skúmavky
- strička
- zberná nádoba na použité sklo
- sáčky do homogenizátora

Prístroje:

- autokláv
- sušiareň
- termostat (pre každú sledovanú teplotu)
- chladnička/chladiaci box
- homogenizátor

Chemikálie:

- fyziologický roztok
- PALCAM agar
- GTK agar
- destilovaná voda

3.3 Použité metódy a pracovný postup

Spracovanie a kultivácia vzoriek ako aj pracovný postup vychádzal z normy STN EN ISO 11290-2:1998/AM1:2004 „Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda na dôkaz a stanovenie počtu baktérií *Listeria monocytogenes*. Časť 2: Metóda stanovenia počtu. Zmena A1“ a z normy STN EN ISO 4833:2003 „Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda na stanovenie počtu mikroorganizmov“. Metóda počítania kolónií kultivovaných pri 30 °C.“ Pracovný postup ako aj voľba kultivačných médií však bola mierne modifikovaná.

Infikované vzorky boli umiestnené v skúmavkách, ktoré boli udržiavané pri konštantnej teplote počas celej doby sledovania. Použilo sa množstvo vzorky s objemom 1 ml v 9 ml fyziologického roztoku s prídavkom 0,2 ml suspenzie referenčného kmeňa. Vzorky syrového korbáčika boli pred použitím podrobené homogenizácii.

Sledovanie rastovej rýchlosti bolo uskutočnené zisťovaním KTJ v 1 ml substrátu v daných časových intervaloch pri rôznych teplotách prostredia. Pre každý variant bolo vykonaných päť paralelných odberov. Sledoval sa počiatočný a konečný CPM a počet *Listeria monocytogenes* vo vymedzených časových intervaloch. Ako živné pôdy boli použité GTK agar (pre CPM) a PALCAM agar (pre *L. monocytogenes*).

Pre sledovanie bolo zvolených týchto 6 teplôt:

- 0 – 4 °C (chladnička, odchýlka v rámci udávaného rozsahu),

- 6 °C (termostat, odchýlka $\pm 0,2$ °C),
- 22 °C (termostat, odchýlka $\pm 1,0$ °C),
- 30 °C (termostat, odchýlka $\pm 1,0$ °C),
- 37 °C (termobox, odchýlka $\pm 1,0$ °C),
- 42 °C (termostat, odchýlka $\pm 1,0$ °C).

Kultivačné médiá boli umiestnené v jednorázových Petriho miskách. Misky obsahujúce PALCAM agar boli pred použitím predsušené v sušiarňi (50 °C, v trvaní 5 min), misky s GTK agarom boli zalievané médiom v tekutom stave. Za účelom spočítania vyrastených listérií sa vzorky v priebehu inokulácie riedili na štvrté až piate riedenie, v prípade záverečných sledovacích intervalov na šieste až siedme. Pri spočítavaní CPM sa muselo použiť najviac jedenáste riedenie.

Každá použitá vzorka substrátového materiálu bola podrobená vyšetreniu na prítomnosť *Listeria monocytogenes*, aby sa vylúčila jej prítomnosť a tým aj možnosť ovplyvnenia rastu použitého referenčného kmeňa.

Do pripravených skúmaviek zoradených v stojane na skúmavky sa napipetovalo množstvo vzorky (z prvého riedenia) s objemom 1 ml. Pri každej ďalšej skúmavke sa zopakoval rovnaký postup až do dosiahnutia požadovaného riedenia (väčšinou štvrtého a piateho). Z konečného riedenia sa do pripravených Petriho misiek s kultivačným médiom PALCAM napipetoval objem 0,2 ml pre sledovanie *Listeria monocytogenes* a 1 ml do misiek ktoré boli zaliate médiom GTK. Inokulát na médiu PALCAM bol rovnomerne roztrýpaný po celom objeme misky sterilnou hokejkou. Inokulát v tekutom médiu bol rovnomerne rozptýlený miernymi kolísavými pohybmi. Po stuhnutí tekutého média boli misky s obidvoma druhmi pôd umiestnené do termostatov s teplotou určenou na ich kultiváciu.

Udržiavanie predpísaných teplôt bolo nepretržite monitorované digitálnymi laboratórnymi teplomermi. Všetky použité zariadenia boli kalibrované a prešli akreditáciou.

Vzorky pre kultiváciu boli odoberané podľa nasledovného harmonogramu:

- teploty 0 – 4 °C a 6 °C – odber po 24, 48, 120, 168, 216 hodinách; celková dĺžka pozorovania 9 dní,
- teploty 22 °C, 30 °C, 37 °C, 42 °C – odber po 1, 3, 6, 9, 12, 16, 20 a 24 hodinách; celková dĺžka pozorovania 1 deň.

Frekvencia sledovania vo zvolených intervaloch umožnila zachytiť lag-fázu ako aj fázu exponenciálneho rastu prechádzajúcu do stacionárnej fázy, prípadne do fázy odumierania pre všetky zvolené teploty.

Inkubácia vzoriek prebiehala pre stanovenie počtu *L. monocytogenes* pri 37 °C počas 48 hodín a pre stanovenie CPM pri 30 °C počas 48 hodín. Následne došlo k spočítaniu narastených kolónií. Pri zaznamenaní extrémnej odchýlky v počte mikroorganizmov nasledovala opakovaná kultivácia. Zistené hodnoty pre každé riedenie boli zaznamenané do tabuliek, aby mohol byť výsledok prepočítaný na reálny počet v 1 ml použitého substrátu.

3.4 Štatistické ukazovatele

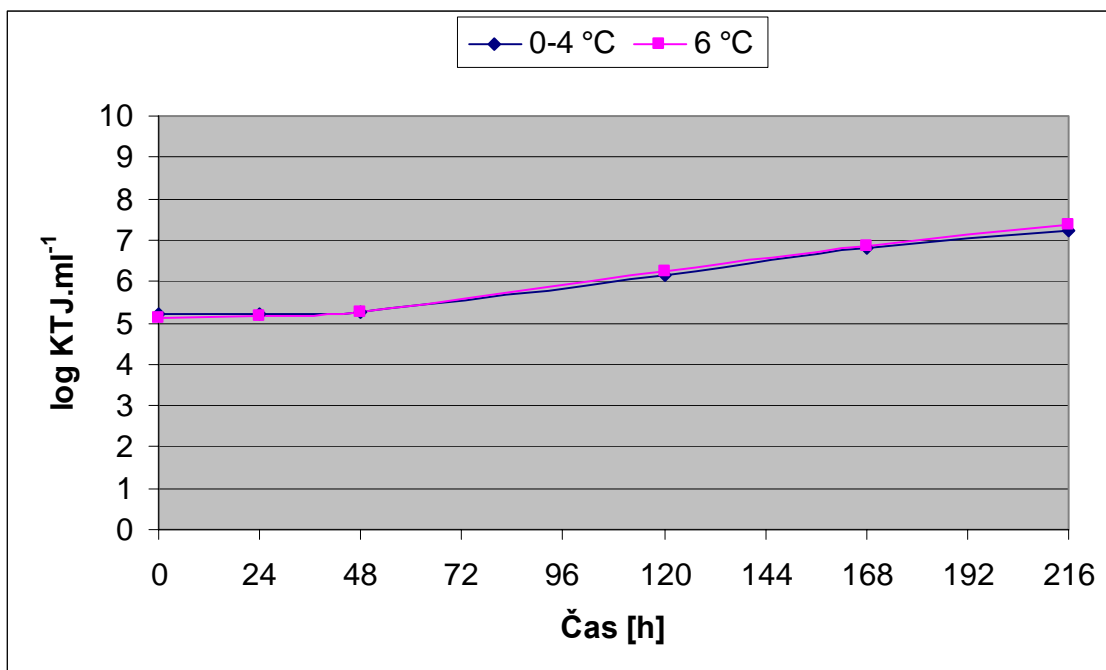
Vychádzajúc z povahy experimentu ako aj z dosiahnutých výsledkov sa získané údaje štatisticky nevyhodnocovali. Dôvodom bola nízka variabilita výstupných číselných údajov ako aj nehomogénnosť jednotlivých súborov. Experiment bol zameraný na popisné zhodnotenie správania sa v daných podmienkach, nie na overenie testovania hypotéz.

Na výpočet exponenciálnej rastovej rýchlosti ako aj dĺžky trvania lag-fázy boli použité vzťahy vyplývajúce Gompertzovej 4-parametrovej dvojexponenciálnej funkcie. Jednotlivé ukazovatele boli dosadené z nameraných hodnôt a vytvorených rastových kriviek. Pri použití výsledkov pochádzajúcich z viacerých meraní bol ako stredná hodnota použitý aritmetický priemer. Konverzia hodnôt narastených počtov mikroorganizmov vyjadrených v KTJ.ml^{-1} sa vykovala použitím dekadického logaritmu.

4 VÝSLEDKY

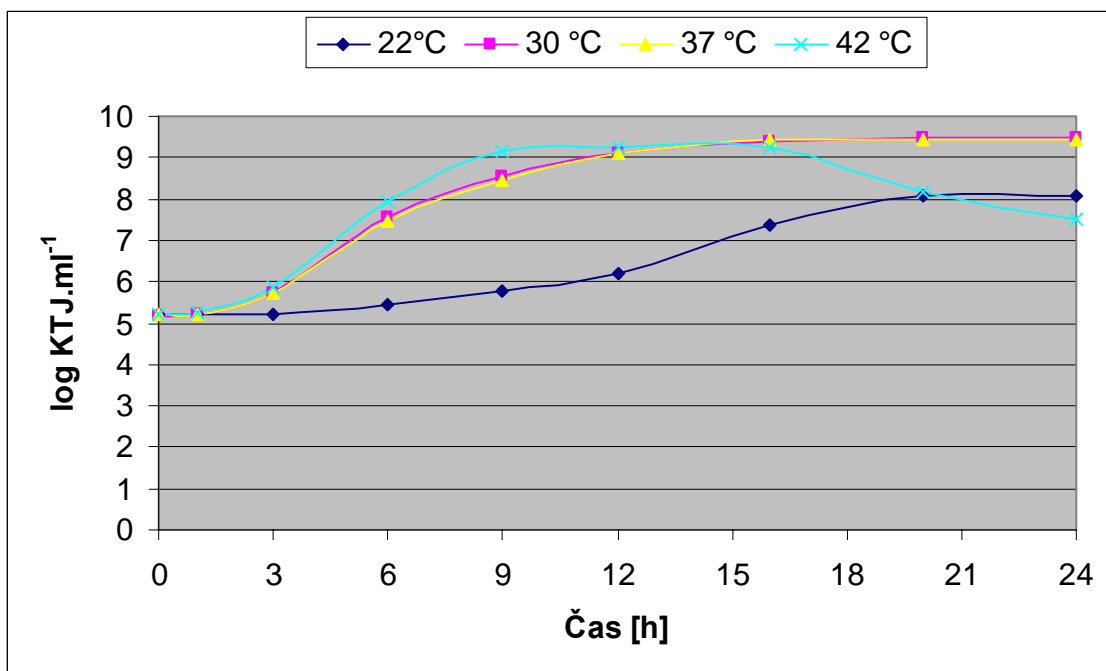
Rastová krivka *L.monocytogenes* v SKM pri chladničkových teplotách

Obrázok 1



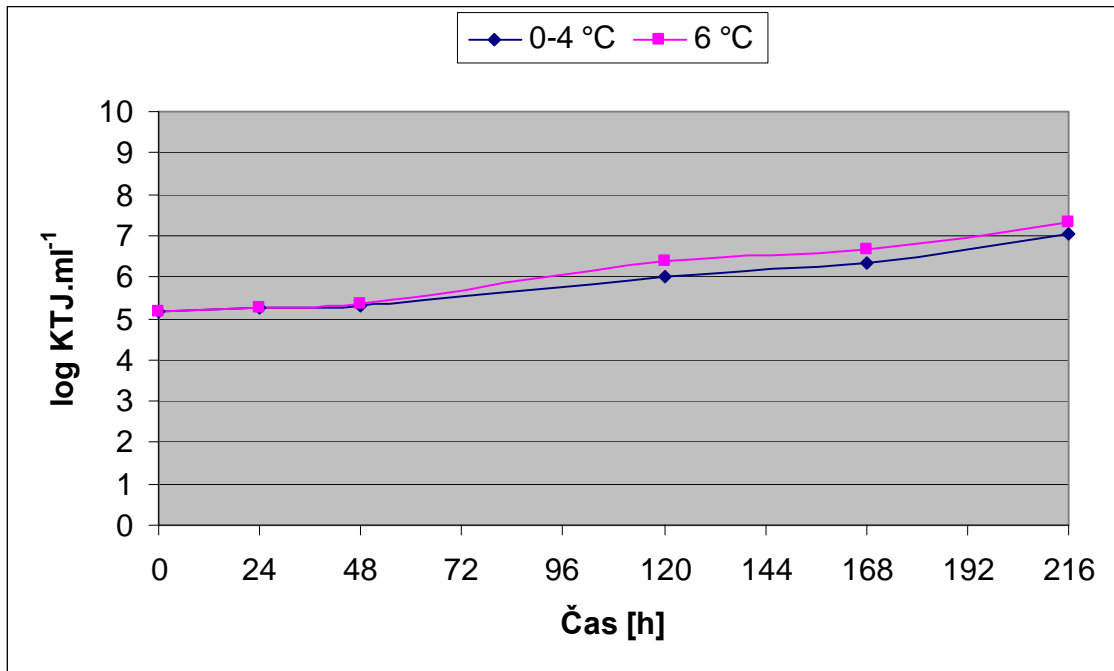
Rastová krivka *L.monocytogenes* v SKM pri termostatových teplotách

Obrázok 2



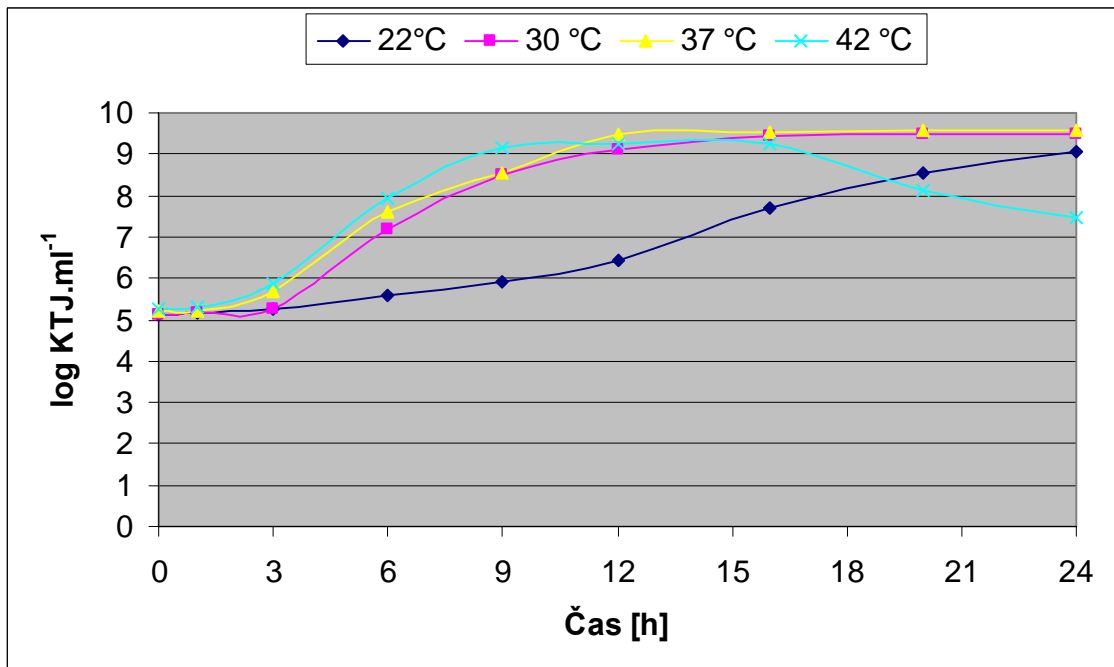
Rastová krivka *L.monocytogenes* v SOM pri chladničkových teplotách

Obrázok 3



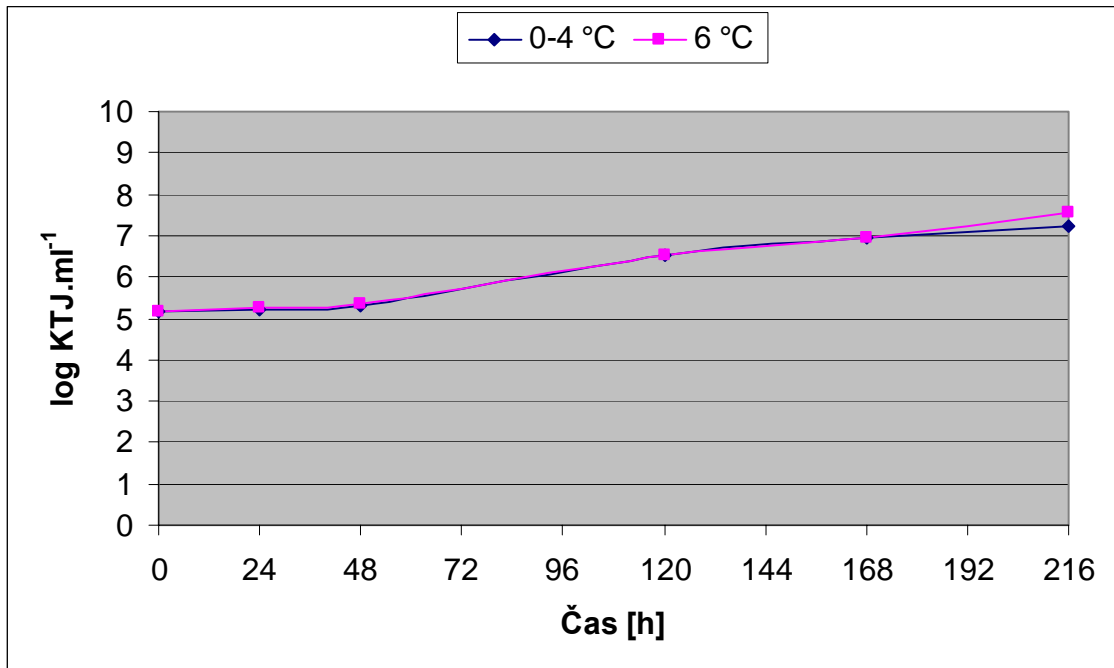
Rastová krivka *L.monocytogenes* v SOM pri termostatových teplotách

Obrázok 4



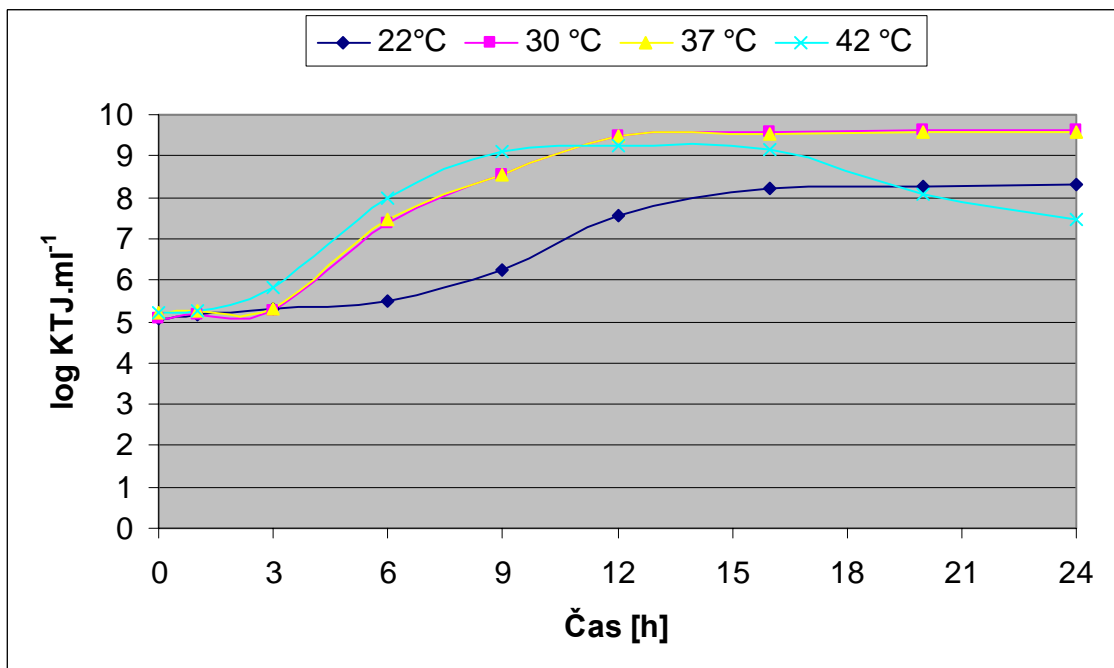
Rastová krivka *L.monocytogenes* v K pri chladničkových teplotách

Obrázok 5



Rastová krivka *L.monocytogenes* v K pri termostatových teplotách

Obrázok 6



Tabuľka 1

<i>Výsledky prípravných meraní</i>		
Substrát	a_w	pH
SKM	0,977	6,75
SOM	0,985	6,74
K	0,986	5,56

5 NÁVRH NA VYUŽITIE VÝSLEDKOV

Dizertačná práca prinesie nasledovné poznatky a praktické výsledky:

- vypracovanie modelových analýz správania sa *Listeria monocytogenes* v potravinách
- získanie podkladov pre odhad rizika
- možnosť zlepšenia kontroly a zásahu pri pozitívnom stanovení
- eliminácia kontaminácie potravín *Listeria monocytogenes*
- návrh účinnejších preventívnych a nápravných opatrení
- podklady pre ďalšie experimenty (sledovanie účinnosti dezinfekčných prostriedkov)

Listeria monocytogenes ako rozšírený patogén predstavuje riziko pri výrobe potravín, najmä takých, pri ktorých nedochádza k eliminácii počas výrobného procesu a ktoré svojou konzistenciou a zložením umožňujú jej existenciu. Poznanie dynamiky a priebehu rastu pri skladovacích podmienkach umožní lepší odhad možného patologického efektu pri konzumácii. Zároveň determinuje čas, pokým dôjde k nárastu v takom množstve, že sa potravina po konzumácii takmer s určitosťou spôsobí vypuknutie ochorenia. Známe množstvo kolónií narastených po určitom čase je tiež prostriedkom ku kvantifikácii prostriedkov potrebných na elimináciu prítomného počtu mikroorganizmov.

Vedomosti o rast a rozmnožovaní listérie v závislosti od konkrétnych podmienok prostredia (teplota, pH, a_w) umožňujú vytvorenie matematických modelov ako aj predpokladanie interakcií medzi baktériou, prostredím a limitujúcimi faktormi pre jednotlivé druhy potravín. Vytvorenie rizikového scenára odohrávajúceho sa pri vhodnej súhre nežiaducich okolností umožní lepšiu kontrolu a možnosť redukcie nepriaznivých následkov. Zároveň upozorňujú na nevyhnutné zmeny počas spracovateľského procesu v jednotlivých kritických bodoch.

Kombinácie letálnych teplôt, alebo inhibičných látok, ktoré sú buď súčasťou surovín (NaCl, kyselina mliečna) alebo sa využívajú pri sanitačnom procese (čistiace a dezinfekčné prostriedky) vedie k výraznému znižovaniu ohrozenia a možnosti vzniku infekcie.

Výsledky dosiahnuté v práci môžu tiež slúžiť ako podklad pre prípravu experimentov zameraných na elimináciu *Listeria monocytogenes* na rôznych povrchoch rôznymi prostriedkami. Uplatnenie môžu nájsť aj pri príprave hygienicko-epidemiologických štúdií.

6 ZÁVER

Listeria monocytogenes je významným patogénom nachádzajúcim sa vo vysokej miere v prostredí, odkiaľ môže preniknúť do surovín a následne do potravín a takto ohroziť zdravie spotrebiteľa. Je pôvodcom závažného alimentárneho ochorenia nazývaného listerióza, ktoré postihuje zvieratá ako aj človeka. Simulácia správania sa listérií pri rôznych podmienkach vo rôznych potravinách prináša poznatky, ktoré môžu napomôcť k účinnejšej eliminácii a znižovaní rizika ich výskytu.

Rast listérií prebiehal vo všetkých sledovaných teplotných variantoch vo všetkých troch substrátoch. Dynamika rastu zodpovedala jednotlivým kultivačným teplotám. Priebeh rastovej krivky ako aj zistené počty *Listeria monocytogenes* mali pri všetkých substrátoch približne podobnú úroveň. Najvyššie absolútne hodnoty boli spravidla dosahované u syrového korbáčika, ktoré boli súčasne spojené s najnižším celkovým počtom mikroorganizmov. Táto súvislosť vyplýva zo skutočnosti, že vo výrobku je prítomný nižší počet mikroorganizmov než v surovom mlieku.

Najnižšia rýchlosť rastu spoločne s najdlhšou lag-fázou bola zaznamenaná pri najnižších teplotách (0 – 4 a 6 °C). Trvanie lag-fázy sa pohybovalo v rozmedzí 24 až 48 hodín. Po uplynutí tejto doby nastala fáza exponenciálneho rastu. Pri termostatových teplotách uplynula lag-fáza spravidla do troch hodín. Nástup exponenciálnej fázy sa urýchlil spolu s narastajúcou teplotou. Najvyššia rastová rýchlosť sa dosiahla pri najvyššej teplote (42 °C), čo však nie je optimálna teplota pre rast *Listeria monocytogenes* a pravdepodobne súvisela s extrémne skrátenou lag-fázou, čo malo za následok prudké zvyšovanie počtu buniek. Exponenciálna fáza však mala v porovnaní s teplotami 30 a 37 °C kratšie trvanie, preto mala najvyššia hustota populácie nižšiu hodnotu než pri týchto dvoch teplotách.

Pri chladničkových teplotách 0 – 4 °C a 6 °C z úvodného množstva 10^5 KTJ.ml⁻¹ vzrástol po 216 hodinách počet listérií na konečných 10^7 KTJ.ml⁻¹, čo v logaritmickej vyjadrení predstavovalo nárast o 2 až 2,5 logaritmickej jednotky. Keďže v čase ukončenia experimentu bunky neprešli stacionárnou fázou, v prípade ďalšieho ponechania pri týchto teplotách by sa počet kolónií pravdepodobne naďalej zvyšoval.

Pri termostatovej teplote 22 °C bol konečný počet v surovom kravskom mlieku a syrovom korbáčiku na úrovni 10^8 KTJ.ml⁻¹. V surovom ovčom mlieku dosiahol hodnotu rádovo vyššiu. V logaritmickej vyjadrení to predstavovalo nárast o 3 logaritmickej jednotky v prípade prvých dvoch menovaných substrátov a o 4

logaritmické jednotky v prípade tretieho. V čase ukončenia experimentu sa počet buniek začal blížiť k maximálnej dosiahnuteľnej hodnote.

Pri termostatových teplotách 30 °C a 37 °C po uplynutí 24 hodín počet narastených kolónií dosiahol úroveň 10^9 KTJ.ml⁻¹. Oproti začiatočnému množstvu to bol nárast o 4,5 logaritmických jednotiek. Keďže v čase posledných odberov už prebiehala stacionárna fáza rastu, možno predpokladať že pri dlhšom trvaní experimentu by v rovnakom časovom intervale sledovania pri najbližšom odbere počet buniek klesol.

Pri termostatovej teplote 42 °C bolo možné ako pri jedinej zo zvolených teplôt pozorovať aj odumieranie buniek. Maximálna hustota populácie bola dosiahnutá po uplynutí 12 až 16 hodín a predstavovala množstvo 10^9 KTJ.ml⁻¹. Oproti počiatočnému stavu sa počet buniek zvýšil o 4,3 logaritmické jednotky. V záverečnej fáze sa počet buniek znížil na 10^7 KTJ.ml⁻¹ (o 1,8 logaritmických jednotiek).

Pri kultivačnej teplote 55 °C sa v pokusne infikovaných vzorkách nezaznamenal žiaden rast (ani jedna narastená kolónia po 48 hodinách kultivácie), čo potvrdilo pôvodný predpoklad o negatívnom výsledku.

Na porovnanie dosiahnutých hodnôt ako aj grafického vyjadrenia rastových kriviek bol použitý software PMP vo verzii 7.0. Pri konfrontácii modelovaných a nami získaných hodnôt môžeme konštatovať, že sa výsledky vzťahujúce sa k celkovému počtu a k trvaniu fázy narastania počtu buniek zhodovali v rámci štandardných odchýlok. Rozdiely sa týkali predovšetkým dĺžky trvania lag-fázy, čo mohlo byť ovplyvnené rozličným zložením substrátov a prítomnosťou sprievodnej mikroflóry v našom pokuse.

7 PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU

GOLIAN, J. – SOKOL, J. – ČARNOGURSKÝ, J. 2004. Využitie prediktívnych modelov pre určovanie rizika z potravín. In *Aktuálne problémy riešené v agrokomplexe*. Nitra : SPU, 2004, s. 50. ISBN 80-8069-477-8

GOLIAN, J. – CHOVANEC, M. – SOKOL, J. – ČARNOGURSKÝ, J. 2005. Možnosti eliminácie *Arcobacter spp.* z potravín a vody. In *O hygiene a technológii potravín XXXV: Lenfeldovy a Höklovy dny*. Brno : VFU, 2005, s. 93-96. ISBN 80-7305-544-9

GOLIAN, J. – CHOVANEC, M. – PAVLIČOVÁ, S. – ČARNOGURSKÝ, J. 2005. Využitie metód modelovania a hodnotenia hygienickej neškodnosti potravín. In *Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín*, Nitra : SPU, 2005, s. 50. ISBN 80-8069-612-8

GOLIAN, J. – CHOVANEC, M. – PAVLIČOVÁ, S. – ČARNOGURSKÝ, J., 2005. Mikrobiálna kontrola vybraných povrchov v prevádzke na spracovanie mäsa. In *Rizikové faktory potravinového reťazca*, Nitra : SPU, 2005, s. 67-71. ISBN 80-8069-594-6

GOLIAN, J. – ŠIŠKA, B. – ČARNOGURSKÝ, J. 2006. Bezpečnosť a mikrobiologické riziká konzumácie majonézových šalátov. In *Rizikové faktory potravinového reťazca*, Nitra : SPU, 2006, s. 92-95. ISBN 80-8069-760-4

SOKOL, J. – ČARNOGURSKÝ, J. – ŠNIRC, J. – PAŽOUT, V. – GOLIAN, J. – RAJSKÝ, D. – IGLOVSKÁ, J. 2007. Listeriózy – ich epidemiologické aspekty. In *Bezpečnosť a kontrola potravín*, Nitra : SPU, 2007, s. 98-102. ISBN 978-80-8069-860-7