

ŪDENS AKTIVITĀTE (A_w) UN PH KĀ *LISTERIA MONOCYTOGENES* RĪSKA RĀDĪTĀJI ŠĶĒLĒS SAGRIEZTIEM GAĻAS PRODUKTIEM

WATER ACTIVITY (A_w) AND PH AS RISK SHOWING OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN SLICED MEAT PRODUCTS

Indulis Silinš¹, Edgars Liepiņš²

¹Pārtikas un veterinārais dienests, Dienvidzemgales pārvalde,
Food and Veterinary Service, Dienvidzemgale branch, Latvia,

²LLU, Veterinārmedicīnas fakultāte, Latvija
LUA, Faculty of Veterinary Medicine, Latvia

forest.con@apollo.lv, Edgars.Liepins@llu.lv

ABSTRACT

The widespread non-spore forming gram-positive bacteria *Listeria monocytogenes* (LM) is a food pathogen bacteria and the causative agent of listeriosis. Outbreaks of listeriosis have been associated with milk, cheese, vegetables and meat products. The aim of study was to determine water activity (a_w) and pH values in meat products – sausages, smoked meat and cold smoked sausages, as a risk factor of *L. monocytogenes* growing or survival. Completely were examined 110 samples, acquired in Latvia shops. a_w and pH was measured instrumentally at the Food and Environmental Hygiene institute (Faculty of Veterinary medicine) of the Latvia University of Agriculture. Except cold smoked sausages, all meat products had $a_w > 0.92$ and $5.75 < \text{pH} < 6.20$ values, supporting the eventual risk of *L. monocytogenes* growing.

KEY WORDS: meat products, *L. monocytogenes*, risk, water activity, pH.

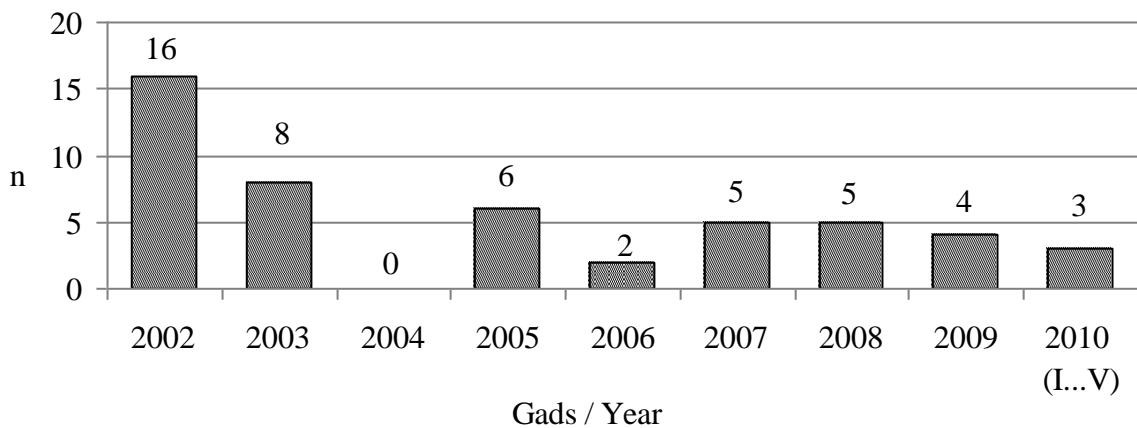
IEVADS

Termiski apstrādātiem, lietošanai gataviem gaļas produktiem mikrobioloģiskās bīstamības Eiropas Savienībā spēkā esošā likumdošanā nav deklarētas. Šādu „nevērību” attaisno produkta sagatavošanas tehnoloģiskajā procesā sasniegtā temperatūra, kas inaktīvā varbūtējās pārtikas infekciju ierosinātājas baktērijas, kā arī tālākie gatavās produkcijas uzglabāšanas apstākļi – relatīvi zema, baktēriju augšanai nepiemērota temperatūra. Lietošanas ērtumam daudzi gaļas produkti tiek papildus sagriezti gabalos vai šķēlēs un šajā procesā var tikt mikrobioloģiski kontaminēti no griešanas iekārtu un instrumentu virsmām, galvenokārt, ar persistējošo baktēriju, tādām kā *Listeria* spp. celmiem, uzturot risku saslimt ar listeriozi.

Listērijas ir plaši sastopamas dabā - ūdenī, augsnē, uz dārzeniem. Tās ir ļoti noturīgas, apkārtējā vidē var saglabāties līdz 7 gadiem (Brooks et al., 1998). Vārot un pasterizējot iet bojā 3 minūšu laikā. Spēj augt 4.0°C temperatūrā gaļas produktos (Lunde'n et al., 2003), bet selektīvās barotnēs laboratorijā ar ilgu (174 h) lag fāzi -1.5°C (Hudson et al., 1994), iztur sasaldēšanu, tādēļ to sauc par ledusskapja baktēriju. (Lag fāze = laiks, kurā šūna piemērojas videi un sāk dalīšanos.)

Listerioze ir atipiska pārtikas infekcija un tās izraisītājs ir *Listeria monocytogenes* – viena no sistemātikā iekļautajām 6 sugām (Vazquez-Boland et al., 2001). Pēdējo gadu

desmitu epidemioloģiskie pētījumi rāda, ka galvenais inficēšanās ceļš cilvēkiem ir alimentārais (Thevenot et al., 2005) - lietojot uzturā tehnoloģiski nepareizi sagatavotus vai nepareizi uzglabātus pārtikas produktus. Eiropā tā ir samērā reta slimība, starp 1 miljons iedzīvotāju reģistrē vidēji 2 - 7 saslimšanas gadījumus. Listeriozei starp citām pārtikas infekcijām ir samērā augsta mirstība, vidēji 30 - 40%. Viens no apjomīgākiem saslimšanas gadījumiem pēc gaļas produktu lietošanas reģistrēts 2008. gada augustā Kanādā, kad no 57 saslimušajiem nomira 22 (38.6%) (Gilmour et al., 2010). Viena no pirmajām pasaulē Amerikas Savienotās Valstīs ir noteikušas 0 kontaminācijas līmeni ar *L. monocytogenes* lietošanai gataviem gaļas produktiem (Shank et al., 1996). Latvijā reģistrētie listeriozes gadījumi zināmi pēc valsts aģentūras Latvijas infektoloģijas centrs (Latvia Infectology Centre, LIC) publicētajiem datiem un apkopoti 1. attēlā.



1.attēls. Latvijā reģistrētie humānās listeriozes gadījumi (n) 2002. – 2010. gg
 Figure 1. The approved cases (n) of human listeriosis in Latvia, yy 2002 – 2010
 (Data source: LIC <http://www.lic.gov.lv/index.php?p=1327&pp=10756&lang=258>)

Kontaminācijas līmenis 0 nenozīmē, ka produktā nav dzīvotspējīgu listēriju. Nosakot *L. monocytogenes* skaitu 1 gramā produkta ar koloniju skaitīšanas metodi, iegūst rādītāju – kolonijas veidojošās vienības 1 gramā produkta (kvv g^{-1}), kuram ir vērtība, ja pārbaudāmā produkta gramā reāli ir vairāk par 100 uz barotnes plates augt spējīgām šūnām (Augustin, Carlier, 2000).

Sodien pārtikas mikrobioloģiskā riska pētījumi sāk padziļināt izpratni par baktēriju un t.sk. *L. monocytogenes* augšanas īpatnībām dažādos produktos. Modificējot vides apstākļus, pētījumi notiek individuālu šūnu līmenī (Augustin, Guillier, 2006), kas tiek salīdzināti ar populācijas augšanas parametriem – ar iespējamo variāciju līdz 60%. J.C. Augustin un L. Guillier (2006) izdala 18 dažādus augšanas parametrus, kuri ar klasteru analīzi sagrupēti galvenajos 4: temperatūra, a_w , pH un produkta sastāvs un struktūra.

Jēdzienu **ūdens aktivitāte** (a_w , angļu val. - water activity) pirmo reizi sāka lietot austrāliešu zinātnieks W.J. Skots (Scott, 1953), lai raksturotu mikroorganismiem izmantošanai pieejamā ūdens stāvokli pārtikas produktos un pierādītu mikroorganismu augšanas atkarību no šī stāvokļa. Pēc fizikālās būtības ūdens aktivitāte ir attiecība starp produktā esošā ūdens brīvās, parciālās daļas spiedienu p un teorētiski iespējamo piesātinātā tvaika spiedienu p_0 .

a_w skaitliski ir robežās no 0.00 līdz 1.00 un ir noteikts kā mikrobioloģisko bīstamību raksturojošs parametrs daudziem pārtikas produktiem un, kā augšanu limitējošais rādītājs daudzām mikroorganismu grupām.

L. monocytogenes augšanai nepieciešamā a_w vērtība pārtikas produktā ir ≥ 0.92 (Augustin, Carlier, 2000). Augstāk pieminētā formula ir tuvināts aprēķins, kas pilnībā

apmierina prakses vajadzības. Dziļāka jēdziena teorētiskā izpratne balstās uz termodinamisko un fizikāli – ķīmisko sistēmas analīzi (Van den Berg and Bruin, 1981).

Tiek uzskatīts, ka *L. monocytogenes* augšana optimāla sastāva barotnē nenotiek, ja pH vērtība ir ≤ 4.4 (George, Levett, 1990; Degenhardt, Sant'Anna, 2007).

Lai gan svarīgāko mikroorganismu augšanas faktoru – ūdens aktivitātes un pH mērījumi pārtikas produktiem ar šodienas ierīcēm un augstu precizitāti izdarāmi dažu minūšu laikā, to izmantošana raksturīga, galvenokārt, pētniecisko mērķu sasniegšanai. Lai ieinteresētu Latvijas pārtikas uzraudzības iestādes un ražotājus ātrā un praktiski viegli izpildāmā pārtikas produktu mikrobioloģiskā riska novērtēšanas metodē, par aprakstītā pētījuma mērķi kļuva a_w un pH mērījumi šķēlēs sagrieztiem gaļas produktiem un to *L. monocytogenes* riska novērtējums.

MATERIĀLS UN METODIKA

Pētījums veikts LLU VMF Pārtikas un vides higiēnas institūtā 2010. gada maija – jūlija mēnešos. Pārtikas tirdzniecības vietās iegādātiem 110, sagrieztiem šķēlēs (gabalos) un iesaiņotiem gaļas produktiem instrumentāli izmērija a_w un pH. Ūdens aktivitāti noteica ar elektronisku mērīšanas ierīci „PawKit” (DECAGON, ASV), ko pārbaudīja un kalibrēja, izmantojot koncentrētu (6.0 mol) NaCl šķīdumu. Ierīces garantētā mērījuma precizitāte bija $\pm 0.02 a_w$, mērījuma ilgums 5 minūtes. pH mērījumus veica ar Testo 205 pH-metru, kas aprīkots ar automātisku temperatūras kompensācijas funkciju (ražotājs TESTO AG, Vācija). Ierīces kalibrāciju un verifikāciju veica pēc 2-punktu kalibrēšanas metodes izmantojot pH 4.01 un 7.00 standarta šķīdumus. Mērījumu precizitāte ± 0.01 pH, indikācijas stabilizācija ~60 sekundes. Riska novērtēšanai izmantota jautājumu – punktu matrica, kuras modifikācijas tiek pielietotas produktu ražošanas kvalitātes vadības standartu shēmās (LVS EN ISO 22000:2005, 2006), kas redzama 1. tabulā.

***L. monocytogenes* riska novērtējuma kritēriji, to līmeņi un novērtējuma punkti**
The qualitative and quantitative assessment of *L. monocytogenes* risk parameters

Kritēriji Parameters	Kritēriju kvantitatīvais (punkti) un kvalitatīvais vērtējums Kvantitative (points) and qualitative values of LM Risk parameters		
	(1p)	(2p)	(3p)
a) varbūtība, ka produktā ir LM possibility of LM contamination	zema low	vidēja middle	augsta high
b) augšanas atkarība no temperatūras growth depending of temperature	neuztur not support	uztur support	optimāla optimal
c) a_w ietekme uz LM augšanu effect of a_w	neuztur not support	uztur support	optimāla optimal
d) pH ietekme uz LM augšanu effect of pH	neaug no growth	iespējams growth/no growth	optimāla optimal
e) produkta sastāva ietekme effect of structure	nomāc suppressed	neietekmē neutral	veicina support
f) fona mikrofloras ietekme effect of common bacteria	nomāc suppressed	neietekmē neutral	veicina support
g) relatīvais uzglabāšanas laiks shelf storing time	īss short	vidējs medium	pārsniedz lag exceed lag

Atkarībā no kritēriju (a – g) kvalitatīvā novērtējuma, matricā tiek ierakstīta punktu vērtība. Konkrētajā modelī minimālā iespējamā punktu summa ir 7, bet maksimālā – 21. Ja novērtējums ir 14 punkti un vairāk, vērtējamais produkts tiek iekļauts paaugstināta riska produktu grupā kā potenciāls *L. monocytogenes* kontaminants. Ja kaut viena kritērija novērtējums ir 1 punkts, neatkarīgi no punktu kopsummas, produkts tiek iekļauts zema riska grupā – *L. monocytogenes* drošs produkts. Riska matricā ietver to kritēriju skaitu, kas ir nozīmīgi analizētajam riska uzturētājam – šajā gadījumā būtiskus parametrus, kas nepieciešami *L. monocytogenes* izdzīvošanai un augšanai lietošanai gatavos gaļas produktos.

REZULTĀTI UN DISKUSIJA

Šķēlēs vai gabalos sagrieztajām vārītajām desām un karstā kūpinājuma gaļas produktiem sekundārais piesārņojums ar *L. monocytogenes* no griešanas iekārtu virsmām un instrumentiem ir salīdzinoši bīstamāks nekā sākotnējais izejvielās. Sagrieztā iesaiņotā produkta uzglabāšana temperatūrā < 6 °C dod augšanas priekšrocības tieši *L. monocytogenes* (Lunde'n et al., 2003). Gadījumos, kad produkta $a_w > 0.92$ un pH 5.0 – 6.5 intervālā, bet uzglabāšanas temperatūra bremzē saprofito un pienskābo baktēriju augšanu, *L. monocytogenes* iespējams augšanas temps gaļas produktos, ar plašu metodi nosakāmo skaitu palielinot par 1 lg, ir aptuveni 500 h (Augustin et al., 2005). Iepakoto, termiski apstrādāto un šķēlēs sagriezto gaļas produktu, kā arī aukstā kūpinājuma produktu LM riska novērtējuma rezultāti redzami 2. tabulā.

***Listeria monocytogenes* riska vērtības šķēlēs sagrieztiem, iesaiņotiem gaļas produktiem**

The values of *Listeria monocytogenes* risk in sliced and packed meat products

Riska vērtējuma parametri Risk assessment parameters		Vārītas desas Boiled sausages		Pusžāvētas desas Smoked sausages		Kūpināta gaļa Smoked meat		Vistas gaļas produkti Poultry products		Fermentētas desas Cold smoked sausages		Fermentēta gaļa Cold smoked meat	
		\bar{X}^*	p ^{**}	\bar{X}	p	\bar{X}	p	\bar{X}	p	\bar{X}	p	\bar{X}	p
Varbūtība Possibility	a	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3
Temperatūra, °C Temperature	b	6.0	2	6.0	2	6.0	2	6.0	2	6.0	2	6.0	2
a _w	c	0.95	3	0.95	3	0.94	2	1	3	0.82	1	0.92	2
pH	d	6.12	3	5.85	3	6.05	3	6.3	3	4.72	1	5.75	2
Sastāvs Structure	e	±	2	±	2	±	2	±	2	-	1	-	1
Probiotiki Probiotics	f	nav	2	nav	2	nav	2	nav	2	ir	1	ir	2
Dienas Storing days	g	< 30	2	< 20	2	< 30	2	< 20	1	> 30	1	> 30	1
Punkti Summary points		17		17		16		16		10		13	

* \bar{X} – mean value; ** p – points

Varbūtība, ka produkts sagriešanas laikā tiks kontaminēts ar *L. monocytogenes*, pieņemta kā 1.0 (neizbēgama) visām produktu grupām, jo bīstamība var realizēties tikai tad, ja tās ierosinātais piedalās. Arī uzglabāšanas temperatūra 6 °C bija vienāda visām produktu grupām, līdz ar to a kritērija nozīme dod 3 punktus, bet b kritērija nozīme LM riska uzturēšanā novērtēta ar 2 punktiem.

Ūdens aktivitāte (a_w) un pH (c un d kritēriji) būtiski neatšķīrās starp termiski apstrādāto produktu grupām un to vērtības ir optimālas *L. monocytogenes* augšanai, saņemot 3 punktus riska novērtējumā. Fermentēto desu un fermentētās gaļas produktu a_w un pH mērījumi būtiski atšķīrās gan savstarpēji (p<0.01), gan no termiski apstrādātajiem produktiem (p<0.001). Fermentētās desas abos gadījumos atbilst zema riska novērtējumam (1 punkts), bet aukstā kūpinājuma gaļas produktu c un d kritēriji novērtēti kā vidēji riskanti (2 punkti).

Sastāva un probiotiķu nozīme karstās apstrādes produktiem nav pilnībā novērtējama, tāpēc riska faktoru varbūtējai ietekmei 2 punkti. Rūpnieciskā ražojuma aukstā kūpinājuma (fermentētās) desas obligāti satur probiotiķu piedevas, kas nomāc citus mikroorganismus un nodrošina zemu pārtikas infekciju risku (1 punkts).

Produkta ražotāja piešķirtais uzglabāšanas ilgums ir jāvērtē atkarībā no pārējiem kritērijiem. Ja produktam kādā no iepriekšējiem kritērijiem ir 1 punkta vērtējums, uzglabāšanas termiņa kritērijam nav lielas nozīmes riska uzturēšanā. Pretējā gadījumā

nevar izslēgt *L. monocytogenes* skaita palielināšanos līdz kritiskajam līmenim – 2 lg kvv g⁻¹, iespēju raksturojot ar lag fāzes vērtību, kas, piemērojot J.C. Augustin et al. (2005) pētījumus, varētu būt ~20 dienas. Līdz ar to vārīto desu, pusžāvēto desu un karstā kūpinājuma gaļas produktu grupām uzglabāšanas ilguma risks novērtēts ar 2 punktiem, bet vistas gaļas produktiem (uzglabāšanas termiņš mazāks par 20 dienām) un aukstā kūpinājuma produktiem ar 1 punktu.

Riska punktu summa 14 ir kritiskā robeža, lai produktu iekļautu riska grupā un rūpīgi izstrādātu priekšnosacījumu pasākumus visā produkta tapšanas procesā. Neatkarīgi no punktu summas, ja kaut viens kritērijs novērtēts kā *L. monocytogenes* augšanu kavējošs, produkts nebūtu iekļaujams LM riska grupā.

SECINĀJUMI

Termiski apstrādāto šķēlēs sagriezto, iesaiņoto gaļas produktu ūdens aktivitātes un pH vērtības ir optimālas *L. monocytogenes* augšanai un skaita palielināšanai iespējamās kontaminācijas gadījumā, kas uztur vienas no pārtikas infekcijas slimībām – listeriozes risku.

Aukstā kūpinājuma (fermentēto) desu un gaļas produktu ūdens aktivitātes un pH vērtības neuztur *L. monocytogenes* augšanu, kas atļauj šo gaļas produkta veidu iekļaut listeriozes zema riska grupā.

Jautājumu – punktu matrica varētu tikt izmantota ne tikai listeriozes ierosinātāja riska novērtēšanai šķēlēs sagrieztiem, lietošanai gataviem gaļas produktiem, bet arī citu pārtikas infekciju izraisītāju riska apzināšanai un produktu ražošanas kvalitātes vadībā.

LITERATŪRA

3. Augustin, J.C. and Carlier V. Modelling the growth rate of *Listeria monocytogenes* with a multiplicative type model including interactions between environmental factors. *International Journal of Food Microbiology*, 2000; 56: 53–70.
4. Augustin, J.C., Zuliani V., Cornu M. and Guillier L. Growth rate and growth probability of *Listeria monocytogenes* in dairy, meat and seafood products in suboptimal conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 2005; 99: 1019-1042.
5. Augustin, J.C. and Guillier L. Modelling the individual cell lag time distributions of *Listeria monocytogenes* as a function of the physiological state and the growth conditions. *Journal of Applied Microbiology*, 2006; 111: 241-251.
6. Brooks, G.F., Butel J.S. and Morse S.A. Non-Spore forming gram-positive bacilli. In: E. Jawetz, J.L. Melnick and E.A. Adelberg's (eds) *Medical Microbiology*, 21st ed. Appleton and Lange, Connecticut, 1998; 194-195.
7. Degenhardt, R. and Sant'Anna E.S. Survival of *Listeria monocytogenes* in low acid Italian sausage produced under Brazilian conditions. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2007; 38: 309-314.
8. George, A.E. and Levett P.N. Effect of temperature and pH on survival of *Listeria monocytogenes* in coleslaw. *International Journal of Food Microbiology*, 1990; 11: 345-349.
9. Gilmour, M.W., et al. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics*, 2010; 11: 120-124. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/120> (Skatīts 15.07.2010.)
10. Hudson, J.A., Mott S.J. and Penney N. Growth of *Listeria monocytogenes*, *Aeromonas hydrophila*, and *Yersinia enterocolitica* on vacuum and saturated carbon dioxide controlled atmospherepackaged sliced roast beef. *Journal of Food Protection*, 1994; 57: 204-208.

11. Lunde'n J., Autio T. and Korkeala H. Persistent and nonpersistent *Listeria monocytogenes* contamination in meat and poultry processing plants. *Journal of Food Protection*, 2003; 66: 2062–2069.
12. LVS EN ISO 22000:2005 Pārtikas drošības pārvaldības sistēmas. Prasības jebkurai pārtikas aprites ķēdes organizācijai. LVS, 2006; 62.
13. Scott, W.J. Water relations of *Staphylococcus aureus* at 30 °C. *Australian Journal of Biological Science*, 1953; 6: 549-564.
14. Shank, F.R., Elliot E.L, Wachsmuth I.K. and Losikoff M.E. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. *Food Control*, 1996; 7: 229–234.
15. Thevenot, D., Delignette-Muller M.L., Christieans S. and Ver-nozy-Rozand C. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 2005; 101: 189-200.
16. Van den Berg, C. and Bruin S. Water activity and its estimation in food systems: Theoretical aspects. In: L. Rockland and G. F. Stewart (eds) *Water activity: Influences on food quality*, New York, Academic Press, 1981; 1–61.
17. Vazquez-Boland, J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J. and Kreft J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Review*, 2001; 14: 584-640.