Ćwiczenie 5 Wykrywanie i identyfikacja wybranych zanieczyszczeń mikrobiologicznych żywności

(*Escherichia coli*, *Listeria* spp.)

Żywność może być źródłem mikroorganizmów chorobotwórczych, a jej zanieczyszczenie może nastąpić na każdym etapie łańcucha żywnościowego – od produkcji surowca, przez przetwarzanie i przechowywanie, aż po przygotowanie do spożycia. Zanieczyszczenia mikrobiologiczne mogą prowadzić zarówno do zakażeń, jak i zatruć pokarmowych. Do istotnych bakterii związanych z bezpieczeństwem żywności należą m.in. *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* oraz *Listeria monocytogenes*.

Badanie mikrobiologiczne żywności ma na celu przede wszystkim wykrycie obecności mikroorganizmów potencjalnie chorobotwórczych lub określenie ich liczebności. W zależności od badanego mikroorganizmu i celu analizy stosuje się metody klasyczne, oparte na hodowli, oraz metody alternatywne, m.in. immunologiczne i molekularne.

Escherichia coli

Escherichia coli jest Gram-ujemną bakterią należącą do rodziny *Enterobacteriaceae*, która naturalnie występuje w przewodzie pokarmowym (w jelicie grubym) ludzi i zwierząt. Choć większość jej szczepów jest nieszkodliwa, niektóre grupy posiadają czynniki wirulencji i mogą wywoływać groźne choroby układu pokarmowego. Szczególne znaczenie w mikrobiologii żywności mają szczepy wytwarzające toksynę Shiga (STEC, ang. *Shiga toxin-producing E. coli*), w tym serotyp *E. coli* O157:H7.

Toksyna Shiga (Stx) to silna toksyna bakteryjna, która hamuje syntezę białek i niszczy komórki śródbłonka, prowadząc do uszkodzenia drobnych naczyń krwionośnych jelit i nerek.

Obecność *E. coli* w produktach spożywczych świadczy o zanieczyszczeniu fekalnym oraz niewłaściwej higienie procesu produkcji. Do najczęstszych źródeł zakażeń szczepami STEC należą:

-surowe lub niedogotowane mięso (zwłaszcza wołowe),
- niepasteryzowane mleko, produkty mleczne oraz soki,
- skażone surowe warzywa, owoce i kiełki,
- zanieczyszczona woda,
- bezpośredni kontakt z zakażonymi ludźmi lub zwierzętami.

W klasycznej diagnostyce *E. coli* stosuje się hodowlę na podłożach selektywnych i różnicujących, a następnie identyfikację kolonii na podstawie ich cech morfologicznych i biochemicznych. Obecnie w badaniach ukierunkowanych na wykrywanie konkretnych szczepów patogennych coraz większą rolę odgrywają metody molekularne, które pozwalają na identyfikację charakterystycznych genów wirulencji.

***Staphylococcus* spp.**

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* są Gram-dodatnimi, względnie beztlenowymi ziarniakami, często występującymi w skupiskach przypominających grona. Wśród nich szczególne znaczenie dla bezpieczeństwa żywności ma *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus* może przedostawać się do żywności m.in. z rąk, skóry i dróg oddechowych osób mających kontakt z produktem. Szczególne zagrożenie stanowią szczepy zdolne do wytwarzania **enterotoksyn gronkowcowych**. Spożycie żywności zawierającej odpowiednią ilość tych toksyn może prowadzić do zatrucia pokarmowego, którego typowymi objawami są m.in. nudności, wymioty i biegunka.

Wykrywanie *S. aureus* może być prowadzone metodami hodowlanymi, biochemicznymi i molekularnymi. Należy jednak podkreślić, że **wykrycie bakterii nie jest równoznaczne z wykryciem enterotoksyny**. W przypadku oceny ryzyka zatrucia konieczne może być bezpośrednie oznaczanie toksyn lub genów kodujących ich wytwarzanie. Współczesne metody obejmują m.in. PCR, testy immunologiczne oraz techniki oparte na biosensorach.

***Listeria* spp.**

Rodzaj *Listeria* obejmuje bakterie Gram-dodatnie, spośród których najważniejszym patogenem związanym z żywnością jest *Listeria monocytogenes* zdolna do przetrwania i wzrostu w warunkach chłodniczych, co ma znaczenie w przypadku żywności gotowej do spożycia takiej jak wędliny, wędzone ryby, sery miękkie, niepasteryzowane mleko, gotowe sałatki oraz niedokładnie umyte warzywa i owoce. Jest szczególnie niebezpieczna, ponieważ może namnażać się nawet w niskiej temperaturze, np. w lodówce. Aby zapobiec zakażeniu, należy dokładnie myć warzywa i owoce, odpowiednio przechowywać żywność oraz poddawać potrawy obróbce termicznej w temperaturze powyżej 65–70°C. Zakażenie *L. monocytogenes* może prowadzić do listeriozy. Szczególnie narażone na ciężki przebieg choroby są kobiety w ciąży, noworodki, osoby starsze oraz osoby z obniżoną odpornością.

Klasyczne wykrywanie *Listeria* spp. obejmuje **wstępne namnażanie wzbogacające, izolację na podłożach selektywnych oraz identyfikację uzyskanych izolatów**. Metody molekularne, takie jak PCR i qPCR, umożliwiają szybsze wykrywanie i identyfikację bakterii.

I Wykrywanie zakażeń żywności bakteriami z grupy *E. coli* na podłożach Petrifilm™

Zasada metody

Płytki Petrifilm™ to gotowe, odwodnione podłoża mikrobiologiczne, które umożliwiają wykrywanie i oznaczanie liczby określonych grup mikroorganizmów. Są podłożami gotowymi do użycia i nie wymagają przygotowywania klasycznego agaru ani wylewania podłoża do szalek.
Sposób naniesienia próbki, jej ilość, użycie rozpływacza oraz zamknięcie płytki należy wykonać dokładnie według instrukcji właściwego wariantu Petrifilm i zatwierdzonej procedury laboratoryjnej.
Obejrzyj film: Petrifilm® Plates | Plates for Quality Indicator Testing

Do oznaczania bakterii z grupy *E. coli* wykorzystuje się płytki:
1. 3M Petrifilm E. coli/Coliform Count (EC) – przeznaczone do oznaczania liczby bakterii *E. coli* oraz bakterii z grupy coli.
inne popularne rodzaje płytek Petrifilm™ to:
2. Petrifilm AC – Aerobic Count
Oznaczanie ogólnej liczby drobnoustrojów tlenowych (ogólna liczba mikroorganizmów).
Zastosowanie: ocena jakości mikrobiologicznej żywności i surowców.
3. Petrifilm STX – Staph Express Count
Oznaczanie gronkowców koagulazododatnich, w tym *Staphylococcus aureus*.
Zastosowanie: kontrola bezpieczeństwa mikrobiologicznego żywności.

Podłoże zawiera składniki selektywne, wskaźniki enzymatyczne oraz system umożliwiający wizualizację kolonii oznacza to, że zawarte są w nim pecjalne składniki, dzięki którym rosnące bakterie stają się widoczne i można je rozpoznać na podstawie ich wyglądu, np. barwy, kształtu lub innych charakterystycznych cech. Składniki podłoża powodują, że kolonie bakterii przyjmują określone zabarwienie, co ułatwia ich obserwację, rozróżnianie.
Wyniki przedstawia się jako jednostki tworzące kolonie (jtk/CFU) w przeliczeniu na jednostkę objętości lub masy próbki.

Część praktyczna:

1. Zapoznaj się z rodzajem płytek Petrifilm™ oraz ich przeznaczeniem.
2. Przygotuj odpowiednio oznaczoną próbkę:
3. - wykonaj rozcieńczenie 10^{-1} badanych płynnych próbek żywności
4. Opisz płytki petrifilm (data, rodzaj badanego materiału, rozcieńczenie)

5. Inokuluj płytki zgodnie z instrukcją producenta.
6. Umieść płytki w warunkach inkubacji określonych dla danego produktu.
7. Po zakończeniu inkubacji przeprowadź obserwację wzrostu mikroorganizmów.

Interpretacja wyników

Kolonie *E. coli* są zwykle niebieskie lub niebiesko-czerwone i wykazują obecność gazu.
Inne bakterie z grupy coli mogą tworzyć kolonie czerwone z gazem.
Uwaga: Interpretację należy prowadzić z uwzględnieniem oficjalnej instrukcji odczytu konkretnego typu płytki.
Interpretacja wyników,zobacz materiał: https://www.chemitec.co.il/Media/Uploads/E_COLI_-_COLI_IFU.PDF?utm_source=chatgpt.com

Opracowanie wyników

Liczbę mikroorganizmów w próbce można obliczyć z uwzględnieniem liczby kolonii, rozcieńczenia oraz objętości naniesionej próbki.
N= (C * D):V

gdzie:
N – liczba drobnoustrojów w próbce,
C – liczba policzonych kolonii,
D – odwrotność zastosowanego rozcieńczenia,
V – objętość naniesionej próbki w ml.
Wynik należy podać w jtk/ml lub jtk/g, zależnie od rodzaju badanego materiału.

II Wykrywanie *Listeria* spp. W żywności na podłożu różnicującym

W podłożu **do wykrywania i różnicowania bakterii *Listeria monocytogenes*** najważniejsze składniki różnicujące zależą od rodzaju podłoża. Szczególnie istotne są: substraty chromogenne, eskulina, cytrynian amonowo-żelazowy oraz mannitol z czerwienią fenolową.

Najważniejsze składniki różnicujące w podłożu Biomaxima:

Eskulina (1,0 g/l) – substrat hydrolizowany przez enzymy bakterii *Listeria*.
Cytrynian amonowo-żelazowy (0,5 g/l) – reaguje z produktem hydrolizy eskuliny, powodując czarne zabarwienie kolonii i podłoża.

Efekt: kolonie *Listeria* są szare mają zielonkawy odcień mają otoczone czarną strefą i zapadniętym środkiem.

Część praktyczna:

Do schłodzonego podłoża dodaj pozostałe składniki i całość wylej na szalki Petriego.
Wykonaj rozcieńczenie stukrotne badanych materiałów.
Wykonaj posiew w dwóch powtórzeniach z materiału rozcieńczonego oraz z rozcieńczonego 10 krotnie oraz stukrotnie.
Płytki inkubuj w 37°C do 48h.

Interpretacja wyników

Policz kolonie o charakterystycznym wyglądzie: szare mają zielonkawy odcień mają otoczone czarną strefą i zapadniętym środkiem.
Wynik należy podać w jtk/ml lub jtk/g, zależnie od rodzaju badanego materiału.

Literatura

1. Farber J.M., Peterkin P.I. (2005). Methods for the isolation and identification of *Listeria spp*. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiology Reviews*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16219509/.
2. Jadhav S. et al. (2016). An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. *Food Control*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26579116/.
3. Li Q. et al. (2024). A comprehensive review on the detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in food samples. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. DOI: 10.1111/1541-4337.13264. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38284582/.
4. Zhang J. et al. (2022). Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin genes of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products worldwide: a systematic review and meta-analysis. *Food Research International*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36461219/.
5. Validation of standard method EN ISO 11290 – Part 1 – Detection of *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology*. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29602513/.
6. World Health Organization (WHO). *E. coli*. Informacje dotyczące znaczenia *Escherichia coli*, szczepów STEC, źródeł zanieczyszczenia żywności oraz zagrożeń zdrowotnych. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli.
7. World Health Organization (WHO). *Food safety*. Informacje dotyczące zagrożeń mikrobiologicznych i chorób przenoszonych przez żywność. https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/food-safety.
8. 3M Food Safety. *3M Petrifilm E. coli/Coliform Count Plate – Product Instructions*. Instrukcja producenta dotycząca stosowania płytek Petrifilm.
9. 3M Food Safety. *3M Petrifilm E. coli/Coliform Count Plate – Interpretation Guide*. Instrukcja interpretacji wyników.
10. 3M Food Safety. *Reminders for Use: 3M Petrifilm E. coli/Coliform Count Plate*. Instrukcja prawidłowego stosowania podłoża.
11. International Organization for Standardization (ISO). (2001). *ISO 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli – Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide*. Geneva: ISO. https://www.iso.org/standard/29824.html.
12. *Evaluation of the 3M™ Petrifilm™ Rapid E. coli/Coliform Count Plate for the Enumeration of E. coli and Coliforms: Collaborative Study, First Action: 2018*. (2020). *Journal of AOAC International*, 103(2), 513. https://academic.oup.com/jaoac/article/103/2/513/5804146.
13. U.S. Food and Drug Administration (FDA). *Bacteriological Analytical Manual (BAM), Chapter 4: Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria*. https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria.