

MAGDALENA MICHALCZYK, ANNA LESZCZYŃSKA-FIK

## **LISTERIA MONOCYTOGENES W PRZETWORACH TYPU „GRAVAD” Z PSTRĄGĄ TĘCZOWEGO (*ONCORHYNCHUS MYKISS*)**

### Streszczenie

Oszacowano częstość występowania *Listeria monocytogenes* w tuszach pstrągów tęczowych dostępnych w obrocie handlowym. *Listeria spp.* wyizolowano ze wszystkich prób ryb zakupionych w lokalnych sklepach rybnych, a w 50% przypadków była to *L. monocytogenes*. W rybach pobieranych w różnych okresach czasu bezpośrednio od producenta bakterii tych nie stwierdzono. W gravadach z pstrąga tęczowego zainokulowanych *L. monocytogenes* w liczebności <100 komórek/g surowca, dojrzewających 3 doby w temp. 3°C i składowanych w tej samej temperaturze przez 4 tygodnie, zaobserwowano stopniowe wymieranie badanego drobnoustroju.

**Słowa kluczowe:** *Listeria monocytogenes*, pstrąg tęczowy, gravad.

### Wstęp

Przetwory typu „gravad” należą do regionalnych, tradycyjnych, skandynawskich delikatesów rybnych. Produkują się je najczęściej z łososia, grenlandzkiego halibuta, a rzadziej z makreli lub śledzia [10]. Filety, wraz ze skórą, tych odpowiednio tłustych ryb traktuje się mieszaniną soli, cukru oraz przypraw, takich jak pieprz i koper. Filety układa się stronami wewnętrznymi do siebie i składa je 1 do 4 dni w temp. około 5°C. Po tym czasie, odwodnione już w dużym stopniu, nasączone solą i cukrem ryby pakuje się w warunkach próżniowych i przechowuje zwykle przez 4 do 6 tygodni [5, 10, 11, 14]. Wyrób taki może być nośnikiem bakterii *Listeria monocytogenes*, której występowanie stwierdzano na skórze ryb i w środowiskach wodnych. Drobnoustroj ten zdolny jest do wzrostu w temperaturze chłodniczej ( $\geq 2,5^{\circ}\text{C}$ ), wytrzymuje wysokie zasolenie ( $\leq 10\%$  NaCl) i warunki beztlenowe oraz pH 5,6–9,8, istnieje więc obawa, że w trakcie trwającego kilka tygodni składowania mógłby namożyć się nawet przy niewielkim zakażeniu początkowym do poziomu groźnego dla konsumentów [1, 11].

Wobec rosnącego popytu na żywność nisko przetworzoną, a także wzrostu zainteresowania wyrobami regionalnymi wywodzącymi się z różnych części świata, można się spodziewać, że produkty typu „gravad” znajdą nabywców również na rynku polskim i być może staną się przetworami przygotowywanymi w domu. W warunkach krajowych wydaje się, że najodpowiedniejszym surowcem do ich produkcji jest pstrąg tęczowy, który będąc rybą hodowlaną, jest stosunkowo tani i łatwy do kontrolowania pod względem bezpieczeństwa zdrowotnego.

Celem pracy było oszacowanie częstości występowania *Listeria monocytogenes* w tuszach pstrągów tęczowych dostępnych w obrocie towarowym oraz stwierdzenie czy drobnoustrój ten przy jego niewysokiej liczebności początkowej jest w stanie namnożyć się w trakcie produkcji i składowania wyrobów gravadowanych do poziomu stanowiącego ryzyko dla konsumentów.

### **Materiał i metody badań**

Materiałem do badań częstości występowania *Listeria spp.* były pstrągi zakupione w 10 różnych stoiskach rybnych na terenie Krakowa oraz siedem partii ryb pobranych bezpośrednio od tego samego producenta, w różnych odstępach czasu. W badaniach nad przeżywalnością *L. monocytogenes* użyto szczepu PEM 2191/ser ½. Ryby wolne od tej bakterii filetowano z pozostawieniem skóry, a następnie zanurzano w kąpieli zawierającej ok. 100 komórek *L. monocytogenes* w 1 ml. Tak przygotowane, nacierano mieszaniną soli i cukru. Zastosowano trzy warianty dodatku mieszaniny sól/cukier na 100 g ryby:

- I        6 g soli/9 g cukru,
- II       12 g soli/18 g cukru,
- III      18 g soli/27 g cukru.

Dojrzewanie prowadzono składując ryby przez 3 doby w temp. 3°C. Gotowy produkt, po zapakowaniu próżniowym, przechowywano w tej samej temperaturze przez cztery tygodnie.

Ogólną liczbę bakterii oznaczano na podłożu PCA (Merck) po 72-godz. inkubacji w temp. 30°C. Bakterie z rodzaju *Listeria* izolowano zgodnie z metodą opracowaną przez firmę Merck (Diagram of Procedure acc. to ISO/CD draft 11290 and Methode de Routine AFNOR V08-055 Detection of *Listeria monocytogenes*). Do analizy pobierano po 10 g gravadów. Stosowano dwustopniowe namnażanie w bulionie Frazera i przesiew na stałe podłoże różnicujące Oxford. Dalsze postępowanie identyfikacyjne obejmowało oznaczanie charakterystycznego wzrostu na podłożu półpłynnym w słupku, wykonanie preparatu mikroskopowego metodą Grama oraz szeregu reakcji biochemicznych. Reakcje te obejmowały oznaczenie aktywności katalazy, ureazy, wykorzystanie cytrynianu, produkcję indolu, reakcję M-R i V-P, redukcję azotanów, zdol-

ność hemolizy oraz rozkładu eskuliny, glukozy, maltozy, ramnozy i mannitolu. Wykonywano je zgodnie z powszechnie przyjętymi metodami [2].

Zawartość chlorków w przetworach oznaczano metodą Mohra [13].

### Wyniki i ich omówienie

Bakterie *Listeria* wyizolowano z prób zakupionych na stoiskach rybnych, a nie stwierdzono jej w surowcu pobranym bezpośrednio od producenta (tab. 1). Pomimo tego, że *Listeria spp.* jest wykrywana w środowiskach wodnych, to jednak głównym jej źródłem w rybach są zakażenia krzyżowe wynikające ze zbyt niskiej higieny obrotu handlowego. Jemmi i Keusch [8] badając 36 próbek wody z trzech szwajcarskich gospodarstw, zajmujących się hodowlą pstrąga tęczowego, tylko w 11% prób stwierdzili obecność *Listeria spp.*, przy czym w żadnej nie było *L. monocytogenes*. Wszystkie próby dodatnie pochodziły tylko z jednego gospodarstwa używającego wody rzecznej do prowadzenia hodowli. Na 1/3 z 45 próbek skóry badanych przez nich ryb stwierdzono *Listeria spp.* Zainfekowany surowiec pochodził tylko z dwóch farm. Badacze zwracają uwagę, że sposób prowadzenia gospodarstwa, pochodzenie wody, metoda jej wymiany, możliwość czyszczenia i odkażania stawów oraz dostęp do zbiorników dzikich ptaków, będących często nosicielami tego drobnoustroju, ma zasadniczy wpływ na skażenie ryb pałeczkami *Listeria*. Gonzales i wsp. [7] w żadnej z 30 pobranych próbek wody i ryb z dwóch gospodarstw pstrąga tęczowego nie stwierdzili tych potencjalnie chorobotwórczych bakterii. Według Bykowskiego [3], do 25% pstrągów z hodowli jest skażonych omawianym drobnoustrojem.

Tabela 1

Częstość występowania *Listeria spp.* w pstrągach tęczowych dostępnych w handlu.  
Frequency of *Listeria spp.* occurrence in rainbow trouts on retail trade.

Badany materiał Tested material	Liczba badanych próbek Number of examined samples	Liczba próbek w których stwierdzono <i>Listeria spp.</i> Number of samples with <i>Listeria spp.</i>	Liczba próbek w których obecna była <i>L. monocytogenes</i> Number of samples with <i>L. monocytogenes</i>
Surowiec pobrany ze stoisk rybnych Raw material from retail outlets	10	10	5
Surowiec zakupiony bezpośrednio od producenta Raw material from producent	7	0	0

Tabela 2

Przeżywalność *L. monocytogenes* w przetworach typu „gravad” z pstrąga tęczowego.  
Survival of *L. monocytogenes* in „gravad” type products from the rainbow trout.

Badany materiał Tested material	Ogólna liczba bakterii w 1 g Total bacteria count (cfu/g)	<i>Listeria monocytogenes</i>	
Surowiec Raw material	$7 \cdot 10^4$	Nieobecna Absent	
Surowiec po inokulacji Material after inoculation	$7 \cdot 10^4$	Obecna na poziomie < 100 komórek/g Present on the level < 100 cells/g	
Próby po trzech dobach dojrzewania Samples after three days of maturing	I	$5 \cdot 10^4$	Obecna na poziomie < 100 komórek/g Present on the level < 100 cells/g
	II	$2 \cdot 10^3$	Obecna na poziomie < 100 komórek/g Present on the level < 100 cells/g
	III	$1 \cdot 10^3$	Nieobecna w 10 g Absent in 10g
Po tygodniu składowania After one week of storage	I	$1,2 \cdot 10^5$	Nieobecna w 10 g Absent in 10 g
	II	$4 \cdot 10^3$	Nieobecna w 10 g Absent in 10 g
	III	$3 \cdot 10^3$	Nieobecna w 10 g Absent in 10 g
Po dwóch tygodniach składowania After two weeks of storage	I	$2 \cdot 10^4$	Nieobecna w 10 g Absent in 10 g
	II	$1 \cdot 10^3$	Nieobecna w 10g Absent in 10 g
	III	$1,2 \cdot 10^3$	Nieobecna w 10 g Absent in 10 g
Po trzech tygodniach składowania After three weeks of stor- age	I	$3 \cdot 10^4$	Nieobecna w 10 g Absent in 10g
	II	$1,3 \cdot 10^3$	Nieobecna w 10 g Absent in 10 g
	III	$2,7 \cdot 10^3$	Nieobecna w 10 g Absent in 10 g
Po czterech tygodniach składowania After four weeks of stor- age	I	$3 \cdot 10^4$	Nieobecna w 10 g Absent in 10 g
	II	$3 \cdot 10^3$	Nieobecna w 10 g Absent in 10 g
	III	$2 \cdot 10^3$	Nieobecna w 10 g Absent in 10 g

Po inokulacji wolnego od *Listeria* surowca i poddaniu go procesowi gravadowania oraz po przechowywaniu nie tylko nie stwierdzono wzrostu *L. monocytogenes*, ale

nawet zauważono jej wymieranie, przy poziomie inokulacji poniżej 100 komórek/g, już po trzech dniach dojrzewania, gdy dodatek mieszaniny cukrowo-solnej wynosił 45 g/100 g ryby (tab. 2).

Dalsze składowanie powodowało wymieranie bakterii również przy niższych stężeniach mieszanki. W analizowanych warunkach ogólna liczebność bakterii również ulegała powolnej redukcji. Uzyskane wyniki nie w pełni korespondują z przedstawionymi przez innych autorów częstościami występowania *Listeria* w produktach poddanych procesowi gravadowania dostępnych w handlu. Lyhs i wsp. [12] stwierdzili obecność tego drobnoustroju w 14 z 43 zbadanych próbek gravadów, a Jørgensen i Huss [9] oznaczyli jako zainfekowane odpowiednio 25 i 33% gravadów z łososia i halibuta. Przy czym pięciu producentów dostarczyło wyroby, wśród których tylko poniżej 10% było zakażonych, natomiast od dwóch producentów gravady w prawie 90% były zanieczyszczone. W trakcie przechowywania w temp. 5°C wyrobów zainfekowanych *Listeria*, liczba tych bakterii zdaniem autorów wzrosła.

Rozbieżność pomiędzy danymi z przedstawionej literatury a uzyskanymi w tym doświadczeniu może wynikać z nieco innych warunków wytwarzania i składowania przetworów typu „gravad”. Lyhs i wsp. [12] podają, że zgodnie z deklaracjami producentów zawartość soli w ich wyrobach wahała się w granicach 1,5–4,1%. Oznaczony w wariancie I udział chlorku sodu wynosił 4,9%, w II 5,9%, a w III 8,6%. Należy przypuszczać, że w filetach pstrągów, jako znacznie mniejszych niż łososia czy halibuta, dochodzi do znacznie szybszego i pełniejszego nasycenia solą i cukrem. Cytowani autorzy nie podają zakresu temperatury, w jakiej następowało dojrzewanie badanych przez nich produktów, natomiast jako temperaturę składowania gotowego wyrobu wymieniają 8°C [5, 11, 15]. W opisywanym doświadczeniu filety dojrzewały w temp. 3°C i w takiej samej temperaturze były też przechowywane. Pomimo, że Fernandes i wsp. [6] nie stwierdzili żadnej inhibicji *Listeria* przez naturalną mikroflorę pstrąga tęczowego, to jednak proces dojrzewania wpływa na znaczącą modyfikację jej pierwotnego składu. W warunkach tych stwierdza się m.in. wzrost *Carnobacterium spp.*, mającego hamujący wpływ na wzrost *Listeria monocytogenes* [4, 14, 15]. Niewątpliwie w warunkach rzeczywistych mogą się zdarzyć przypadki wyższego wyjściowego zakażenia surowca. Być może również wybór konkretnego szczepu *L. monocytogenes* użytego do inokulacji miał wpływ na uzyskane, optymistyczne wyniki. Pomimo, że różny był czas dojrzewania ryb badanych przez innych autorów (2 dni) i użytych w tej analizie (3 dni), to trudno przypuszczać, aby fakt ten mógł mieć duże znaczenie dla przeżywalności pałeczek *Listeria*.

## Wnioski

1. W warunkach hodowli stawowej istnieją techniczne możliwości produkcji pstrąga tęczowego wolnego od *Listeria monocytogenes*, bądź zakażonego nią w minimalnym stopniu.
2. Przy niewysokiej liczebności badanego drobnoustroju (poniżej 100 komórek/g surowca) właściwie przeprowadzone procesy gravadowania i składowania gotowego wyrobu wpływają na jego wymieranie.

## Literatura

- [1] Brackett R.E.: Presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in food and water. Food Technol., 1998, 4, 162-164.
- [2] Burbianka M., Pliszka A., Burzyńska H.: Mikrobiologia Żywności, PZW, Warszawa 1983.
- [3] Bykowski P.: Jakość zdrowotna surowców i produktów pochodzenia wodnego. Przem. Spoż. 1998, 7, 13-16.
- [4] Duffes F., Leroi F., Boyaval P., Dousset X.: Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium spp.* strains in simulated cold smoked fish system stored at 4°C. Int. J. Food Microbiol., 1999, 47, 33-42.
- [5] Ericsson H., Stalhandske P.: PCR detection of *Listeria monocytogenes* in gravad rainbow trout. Int. J. Food Microbiol., 1997, 35, 281-285.
- [6] Fernandes C., Flick G.J., Thomas T.B.: Growth of inoculated psychrotropic pathogens on refrigerated fillets of aquacultured rainbow trout and channel catfish. J. Food Prot., 1998, 61(3), 313-317.
- [7] Gonzalez C.I., Lopez-Diaz T.M., Garcia-Lopez M.L., Otero A.: Bacterial microflora of wild brown trout (*Salmo arutta*), wild pike (*Esox lucius*), and aquaculture rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). J. Food Prot., 1999, 62/11, 1270-1277.
- [8] Jemmi T., Keusch A.: Occurrence of *Listeria monocytogenes* in freshwater fish farms and fish-smoking plants. Food Microbiol., 1994, 11, 309-316.
- [9] Jorgensen L.V., Huss H.H.: Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. Int. J. Food Microbiol., 1998, 42, 127-131.
- [10] Knochel S.: Fish fermentation technology. The United Nations University, 1993, pp. 53-70.
- [11] Loncarevic S., Tham W., Danielsson-Tham M.L.: Prevalence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria spp.* in smoked and „Gravad” fish. Acta Vet. Scan., 1996, 37, 13-18.
- [12] Lyhs U., Hatakka M., Maki-Petays N., Hyytia E., Korkeala H.: Microbiological quality of Finnish vacuum-packaged fishery products at retail level. Archiv. Für Lebensmittelhygiene, 1998, 11/12, 49, 121-144.
- [13] Minczewski J., Marczenko Z.: Chemia analityczna. PWN. Warszawa 1987.
- [14] Paarup T., Ruiz-Capillas C., Morales J., Lopez E., Moral A.: „Gravad” type rainbow trout packed in vacuum and modified atmosphere: microbiological, biochemical and sensory aspects. Institut International du Froid, Paris (France). Refrigeration and Aquaculture. Bordeaux (France). Colloquium, proceedings of the conference of IIR Commission C2, March 1996, pp. 20-22.
- [15] Tham W., Ericsson H., Loncarevic S., Unnerstad H., Danielsson-Tham M.-L.: Lessons from an outbreak of listeriosis related to vacuum - packed gravad and cold - smoked fish. Int. J. Food Microbiol., 2000, 62, 173-175.

Praca była finansowana ze środków KBN w roku 2002 jako projekt badawczy 3P06T 005 23.

## LISTERIA MONOCYTOGENES IN „GRAVAD” RAINBOW TROUT (ONCORHYNCHUS MYKISS)

### S u m m a r y

Frequency of *Listeria monocytogenes* occurrence in rainbow trout obtained from retail outlets was evaluated in this paper. *Listeria spp.* was isolated from all samples purchased in fish departments of local shops and 50% of isolated forms it was *Listeria monocytogenes*. Fish collected directly from farms, in different time periods were free from this bacterium. In „gravad” fishes inoculated with *Listeria monocytogenes* to the level of 100 cfu/g of raw material, matured within 3 days at 3°C, and then stored during 4 weeks, the gradual death-rate of bacteria was observed. ~

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, rainbow trout, gravad. ☒