

BARBARA SZYMCZAK, WOJCIECH SAWICKI, ELŻBIETA BOGUSŁAWSKA-WĄS, ANNA KORONKIEWICZ, WALDEMAR DĄBROWSKI

## WYSTĘPOWANIE *L. MONOCYTOGENES* W ŚWIEŻYCH OWOCACH I WARZYWACH POCHODZĄCYCH Z UPRAW EKOLOGICZNYCH WOJEWÓDZTWA ZACHODNIOPOMORSKIEGO

### Streszczenie

Zgodnie z rozporządzeniem Komisji (WE) nr 1441/2007 z dnia 5.12.2007 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych nie ma obowiązku badania świeżych owoców i warzyw w kierunku obecności *L. monocytogenes*, mimo że jest coraz więcej informacji o izolacji tych bakterii z surowców roślinnych. Jakość owoców i warzyw w Polsce ocenia się na podstawie wzrokowej oceny świeżości, wyglądu zewnętrznego i ewentualnie zapleśnienia surowca.

Celem pracy była ocena występowania *L. monocytogenes* w świeżych owocach i warzywach oraz porównanie różnych metod identyfikacji tych bakterii.

Przebadano 220 próbek (w tym: 80 owoców i 140 warzyw), które pochodziły zarówno z lokalnych punktów sprzedaży detalicznej, jak również z upraw nawożonych obornikiem.

Na podstawie identyfikacji przeprowadzonej zgodnie z PN-EN ISO 11290-2:2000 *Listeria* sp. stwierdzono w 50 % prób buraków ćwikłowych, 25 % marchwi, 15 % pomidorów i ziemniaków oraz 5 % pietruszki i 25 % truskawek. Natomiast techniką multiplex PCR *L. monocytogenes* stwierdzono w 10 % prób truskawek, 5 % pietruszki i 15 % ziemniaków. Badania biochemiczne nie mogą stanowić ostatniego etapu identyfikacji *L. monocytogenes* ze względu na duże rozbieżności wyników z rezultatami badań przeprowadzonych metodami biologii molekularnej. Wykazano zależność pomiędzy występowaniem *L. monocytogenes* w owocach i warzywach a rodzajem zastosowanego nawożenia. *Listeria* sp. i *L. monocytogenes* izolowano tylko z tych prób owoców i warzyw, które uprawiano na terenach nawożonych obornikiem. Ze względu na częstość występowania *L. monocytogenes* w owocach i warzywach pochodzących z upraw ekologicznych istnieje konieczność weryfikacji i wprowadzenia obowiązkowych badań kontrolnych również tych surowców roślinnych.

**Słowa kluczowe:** antropopresja, *L. monocytogenes*, nawożenie, uprawy ekologiczne, owoce, warzywa

---

Dr inż. B. Szymczak, dr inż. W. Sawicki, dr inż. E. Bogusławska-Wąs, dr inż. A. Koronkiewicz, prof. dr hab. W. Dąbrowski, Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii Stosowanej, Wydz. Nauk o Żywności i Rybactwa, ul. Papieża Pawła VI 3, 71-459 Szczecin

## Wprowadzenie

Owoce i warzywa są podstawowym źródłem: witaminy C i prowitaminy A ( $\beta$ -karotenu), składników mineralnych (mikro- i makroelementów), błonnika pokarmowego, niektórych witamin z grupy B, związków terpenowych, flawonowych, garbników, chitonów i fitoncydów, dlatego powinny stanowić podstawowy składnik diety każdego człowieka. Żywieniowcy zalecają spożywanie owoców i warzyw pięć razy dziennie. Mimo wyraźnego wzrostu spożycie owoców i warzyw w Polsce, w porównaniu z krajami Unii Europejskiej, jest nadal małe (konsumpcja owoców jest o ponad 20 kg mniejsza niż zalecana przez Instytut Żywności i Żywienia). W 2002 r. według FAO Polska była krajem o najmniejszej konsumpcji owoców, ponieważ spożycie było ponad trzykrotnie mniejsze niż w Grecji czy Słowenii (kraje o najwyższej konsumpcji owoców). Pod względem spożycia warzyw Polska należy do czołówki krajów europejskich. Roczne spożycie warzyw na jednego mieszkańca wynosi około 111 kg/os. [7].

Źródłem zanieczyszczenia owoców i warzyw jest gleba i mikroorganizmy w niej występujące. Rodzaj mikroorganizmów i ich liczba w surowcach zależą od: populacji obecnej w glebie, sposobu nawadniania, stosowanych nawozów oraz czystości wody stosowanej do mycia warzyw i higieny linii technologicznych. Jakość owoców i warzyw w Polsce ocenia się najczęściej na podstawie wizualnej oceny świeżości, wyglądu zewnętrznego i ewentualnie zapleśnienia surowca [5].

Ze względu na duże zanieczyszczenie środowiska naturalnego, które ma wpływ na jakość produkowanej żywności, coraz większego znaczenia nabierają surowce roślinne z upraw ekologicznych. Zgodnie z rozporządzeniem Rady nr 834/2007 z dnia 28 czerwca 2007 r. [21] w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych, jednym z podstawowych kryteriów spełniających warunki gospodarstwa ekologicznego jest całkowity zakaz stosowania nawozów mineralnych i środków ochrony roślin. Dlatego najczęściej stosowanym nawozem naturalnym jest obornik, który może być źródłem wielu patogenów, w tym również *L. monocytogenes*. Drobnoustrój ten przedostając się do gleby może zanieczyścić owoce i warzywa, zwłaszcza dotyczy to warzyw korzennych, które są w bliskim kontakcie z glebą.

W literaturze odnotowano kilka przypadków zachorowań na listeriozę po spożyciu surowych warzyw. Najbardziej znany jest przypadek listeriozy, której źródłem zakażenia była kapusta nawożona obornikiem pochodzącym od owiec chorych na listeriozę (34 przypadki listeriozy okołoporodowej i 7 przypadków u ludzi dorosłych) [22]. Znane są również przypadki zachorowań na listeriozę w USA po spożyciu sałatek przygotowanych z surowych warzyw [11] czy pieczarek w Szwecji [15].

Celem pracy była ocena występowania bakterii *Listeria* sp. i *L. monocytogenes* w świeżych owocach i warzywach pochodzących z upraw ekologicznych woj. zachodniopomorskiego oraz porównanie różnych metod identyfikacji tych bakterii (m.in.

zdolności do rozkładu węglowodanów, hemolizy, testów CAMP, API i multiplex PCR).

### **Material i metody badań**

Przedmiotem badań było: 220 prób owoców i warzyw zakupionych w różnych placówkach sprzedaży detalicznej i pochodzących z upraw ekologicznych, gdzie do nawożenia wykorzystuje się wyłącznie obornik. Materiał badawczy, w ilości 1 kg z każdego sortymentu, pobierano bezpośrednio z upraw ekologicznych, co eliminowało kontaminację związaną z transportem i przechowywaniem. Ogółem przebadano 80 prób owoców, po 20 próbek z każdego sortymentu: borówki amerykańskiej, borówki czernicy, maliny i truskawki oraz 140 próbek warzyw, w tym po 20 z każdego sortymentu: buraków ćwikłowych, kapusty, marchwi, pietruszki, pomidorów, sałaty oraz ziemniaków. Przed analizą owoce i warzywa dokładnie myto pod bieżącą wodą, następnie odszypułkowały (w przypadku truskawek), natomiast warzywa obierano sterylnym nożem do jarzyn (burak ćwikłowy, marchew, pietruszka, ziemniak) i ponownie płukano pod bieżącą wodą.

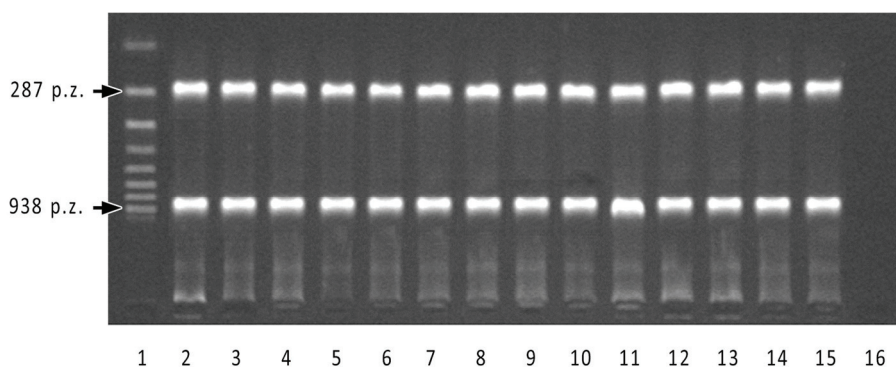
Do analiz pobierano 25 g próbki z powierzchniowej warstwy warzyw, natomiast owoce pobierano do badań w całości. Badania wykonywano horyzontalną metodą wykrywania obecności i oznaczania liczby *L. monocytogenes*, zgodnie z PN-EN ISO 11290-2:2000 [18], z uwzględnieniem zmian zawartych w PN-EN ISO 11290-2:2000/A1 [19]. Ponadto wykonywano identyfikację testami CAMP, API (BioMerièux, Francja) i multiplex PCR. Jako próby wzorcowej użyto szczepów *L. monocytogenes* CEB 3176 wyizolowanych w Instytucie Pasteura w Paryżu oraz *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) i *Rhodococcus equi* (PCM 559) pochodzących z Kolekcji Mikroorganizmów we Wrocławiu. Do wstępnej identyfikacji biochemicznej wybierano losowo po 5 kolonii z każdej próby, charakterystycznie rosnącej na podłożu selektywnym LSA (Oxoid, Anglia).

Reakcję multiplex PCR prowadzono w objętości 50 µl mieszaniny reakcyjnej zawierającej 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3 w 25 °C), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3 mM każdego nukleotydu, 30 pM/ml każdego startera, 2,5 U *Taq* DNA polimerazy (Eppendorf) oraz 5 µl matrycy DNA w termocyklerze Mastercycler Gradient (Eppendorf). Profil termiczny składał się z następujących etapów: wstępna denaturacja – 60 s/95 °C oraz 35 cykli obejmujących: denaturację – 30 s/94 °C, przyłączanie starterów – 20 s/51 °C i wydłużanie – 30 s/72 °C. Amplifikacja kończyła się wydłużaniem – 8 min/72 °C.

Tabela 1

Lista starterów stosowanych w badaniach.  
List of primers used in the research.

Starter Primer	Sekwencja (5'-3') Sequence (5'-3')	Przeznaczenie/gen docelowy Destination/target gene	Produkt PCR Product PCR	Źródło Reference
U1	CAG CMG CCG CGG TAA TWC	Identyfikacja do rodzaju <i>Listeria</i> /16S rRNA	938 p. z.	[2]
LI1	CTC CAT AAA GGT GAC CCT			
Iap1	CGA ATC TAA CGG CTG GCA CA	Identyfikacja do gatunku <i>L. monocytogenes</i> / iap	287 p. z.	[12]
Iap2	GCC CAA ATA GTG TCA CCG CT			



Ścieżki: 1 – marker XVI (Roche, Niemcy), 2 – szczep/strain CEB 3176 (szczep wzorcowy/model strain), 3 – szczep/strain T2/1, 4 – szczep/strain T6/23, 5 – szczep/strain P3/43, 6 – szczep/strain P3/44, 7 – szczep/strain P3/45, 8 – szczep/strain Z2/32, 9 – szczep/strain Z2/33, 10 – szczep/strain Z2/35, 11 – szczep/strain Z3/39, 12 – szczep/strain Z3/40, 13 – szczep/strain Z4/50, 14 – szczep/strain Z4/52, 15 – szczep/strain Z4/53, 16 – próba kontrolna (bez DNA)/control sample (without DNA). Ścieżki/Paths: od 2 do 15 (between 2 and 15) *L. monocytogenes*

Rys. 6. Identyfikacja rodzajowa i gatunkowa szczepów w kierunku przynależności do rodzaju *Listeria* na podstawie amplifikacji fragmentów sekwencji genów 16S rRNA (938 p.z.) i *iap* (287 p.z.).

Fig. 6. Identification of strains and species believed to belong to the *Listeria* genus based on the amplification of fragments of 16S rRNA gene sequences (938 bp) and *iap* (287 bp).

Rezultatem amplifikacji były produkty wielkości: 938 p.z. stwierdzające przynależność do rodzaju *Listeria* i 287 p.z. do gatunku *L. monocytogenes* (tab. 1, rys. 1).

Uzyskane produkty reakcji PCR rozdzielano elektroforetycznie w 2 % żelu agarozowym (Prona Agarose Plus, Belgia), barwionym bromkiem etydyny (Bio-Rad, USA) (0,5 µl/ml). Ostatnim etapem była wizualizacja żelu w świetle UV (Gel-Doc 2000 Bio-Rad, USA) i archiwizacja otrzymanych elektroforogramów. Wielkość produktu oceniano, porównując z markerem masowym XVI (Roche, Niemcy).

### Wyniki i dyskusja

Spośród 220 przebadanych prób: owoców (80) i warzyw (140) *Listeria* sp. stwierdzono w 25 % przebadanych prób truskawek, 50 % buraków ćwikłowych, 25 % marchwi, 15 % pomidorów i ziemniaków oraz 5 % pietruszki, potwierdzonych na podstawie identyfikacji biochemicznej zgodnie z normą PN-EN ISO 11290-1 (tab. 2).

Na podstawie prowadzonego wywiadu z rolnikami próby, te pochodziły wyłącznie z terenów nawożonych obornikiem. Wykluczono możliwość zanieczyszczenia wtórnego w trakcie transportu, bo pobierano próby bezpośrednio od rolników, bądź zakupiono w lokalnych punktach sprzedaży detalicznej, a następnie przewożono do laboratorium mikrobiologicznego.

*Listeria* sp. i *L. monocytogenes* nie stwierdzono w próbach: borówki amerykańskiej, borówki czernicy, maliny, kapusty i sałaty. Na podstawie przeprowadzonej identyfikacji biochemicznej gatunkami *Listeria* izolowanymi najczęściej z owoców i warzyw były: *L. innocua* (burak ćwikłowy – 35 % i truskawka – 25 %) i *L. grayi* (burak ćwikłowy – 25 %, ziemniak -15 %) (tab. 2).

Wykazano bardzo duże rozbieżności w wynikach identyfikacji *L. monocytogenes* uzyskanych na podstawie testów CAMP, API i multiplex PCR (tab. 3). Na podstawie identyfikacji testami CAMP *L. monocytogenes* potwierdzono w próbach buraków ćwikłowych – 25 %, pomidorów – 5 % i truskawek – 15 %. Znacznie częściej potwierdzano ten drobnoustrój testami API: pietruszka – 25 %, marchew – 20 %, burak ćwikłowy – 15 % i truskawka – 5 %. Natomiast techniką multiplex PCR *L. monocytogenes* potwierdzono w 10 % przebadanych próbach truskawek, 5 % pietruszki i 15 % ziemniaków. Próby warzyw, z których izolowano ten patogen pochodziły z upraw ekologicznych, gdzie jedynym stosowanym nawozem był obornik, a dodatkowo pola mogły być odwiedzane przez zwierzęta dzikie, takie jak: jelenie, sarny czy dziki. Na podstawie identyfikacji multiplex PCR nie stwierdzono występowania *Listeria* sp. i *L. monocytogenes* w próbach buraków ćwikłowych, marchwi, kapusty, pomidorów i sałaty (tab. 3).

Tabela 2

Identyfikacja biochemiczna bakterii z rodzaju *Listeria* izolowanych z owoców i warzyw.  
Biochemical identification of *Listeria* strains isolated from fruits and vegetables.

Próba Sample	Liczba prób dodatnich/ <sup>1</sup> Number of positive tests/ <sup>1</sup>	Liczba prób dodatnich zidentyfikowanych biochemicznie (na podstawie rozkładu węglowodanów i hemolizy) jako: <sup>1</sup> Number of positive samples identified biochemically (distribution of carbohydrates, haemolysis) as: <sup>1</sup>					
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	<i>L. ivanovii</i>	<i>L. grayi</i>	<i>L. welshimeri</i>	<i>L. seeligeri</i>
Truskawka Strawberry n=20	5/25 %	0	5/25 %	1/5 %	2/10 %	1/5 %	0
Burak ćwikłowy Beetroot n=20	10/50 %	0	7/35 %	2/10 %	5/25 %	0	1/5 %
Marchew Carrot n=20	5/25 %	1/5 %	3/15 %	1/5 %	2/10 %	0	0
Pomidor Tomato n=20	3/15 %	0	2/10 %	0	2/10 %	1/5 %	0
Pietruszka Persley n=20	1/5 %	0	1/5 %	0	0	0	0
Ziemniak Potato n=20	3/15 %	0	3/15 %	0	3/15 %	1/5 %	0

<sup>1</sup> odsetek przebadanych prób / per cent rate of samples analyzed.

*L. monocytogenes* jest drobnoustrojem izolowanym z różnych grup żywności, w tym również z owoców i warzyw świeżych, mrożonych i przetworzonych. W związku z promowaniem upraw ekologicznych popularnym nawozem wykorzystywanym w gospodarstwach ekologicznych i sadach jest obornik. W badaniach Beuchat [3] wykazano zależność pomiędzy stosowaniem naturalnych nawozów organicznych a występowaniem bakterii *L. monocytogenes* w surowcach roślinnych. Badania potwierdziły, że zanieczyszczenie owoców i warzyw jest związane z czynnikiem antropogenicznym (nawożenie, nawadnianie, przechowywanie, transport itp.). Istotny wpływ na występowanie bakterii chorobotwórczych, w tym pałeczek *Listeria* sp. ma sposób nawożenia gleby, ponieważ główne źródło zanieczyszczenia stanowi obornik. W publikacjach na temat *Listeria* sp. i *L. monocytogenes* w owocach i warzywach nie ma dokład-

nych informacji dotyczących sposobu nawożenia gleby. Dodatkowym źródłem zanieczyszczenia bakteriami *Listeria* sp. i *L. monocytogenes* są dzikie zwierzęta (ich odchody) żerujące na polach uprawnych.

Tabela 3

Występowanie *L. monocytogenes* zidentyfikowanych na podstawie testów CAMP, API i multiplex PCR. Occurrence of *L. monocytogenes* identified on the basis of CAMP, API and multiplex PCR tests.

Próba/Sample	Liczba prób zidentyfikowanych testami CAMP jako <i>L. monocytogenes</i> Number of samples identified as CAMP test <i>L. monocytogenes</i> <sup>1</sup>	Liczba prób zidentyfikowanych testami API jako <i>L. monocytogene</i> Number of samples identified test API <i>L. monocytogenes</i> <sup>1</sup>	Liczba prób zidentyfikowanych jako <i>L. monocytogenes</i> potwierdzonych multiplex PCR Number of samples identified as evidenced by multiplex PCR <i>L. monocytogenes</i> <sup>1</sup>
Truskawka Strawberry n=20	3/15 % <sup>1</sup>	1/5 % <sup>1</sup>	2/10 % <sup>1</sup>
Burak ćwikłowy Beetroot n=20	5/25 %	3/15	0
Marchew Carrot n=20	0	4/20 %	0
Pomidor Tomato n=20	1/5 %	0	0
Pietruszka Persley n=20	0	5/25 %	1/5 %
Ziemniak Potato n=20	0	0	3/15 %
Razem Total n=120	9/45 %	13/10,8 %	6/5 %

<sup>1</sup> odsetek przebadanych prób

<sup>1</sup> per cent rate of samples tested

Jak wykazała Kordowska-Wiater [13], występowanie *L. monocytogenes* w warzywach (fasolka szparagowa, por, jarmuż, marchew, pietruszka) stwierdzono w 10,8 % przebadanych prób. Aguado i wsp. [1] w 1,2 % przebadanych prób mrożonych warzyw, głównie: fasoli, pomidorów, kalafiorów, groszku, marchwi i karczochów potwierdzili obecność *Listeria* sp. Garcia-Gimeno i wsp. [8] oznaczyli *L. monocytoge-*



nes w 21 na 70 prób świeżych mieszanek warzywnych gotowych do spożycia. Heisick i wsp. [10] wykazali, że 25,8 % prób ziemniaków i 30,3 % rzodkiewki zanieczyszczonych było *L. monocytogenes*. Natomiast Wong i wsp. [23] stwierdzili, że na 49 przebadanych próbach warzyw 12,2 % zanieczyszczonych było pałeczkami *L. monocytogenes*. W badaniach własnych wykazano, że *L. monocytogenes* występuje tylko w tych owocach i warzywach, które mają bezpośrednią styczność z glebą i pochodzą wyłącznie z upraw ekologicznych. Podobnie Francis i O'Beirne [6] oraz MacGowan i wsp. [14] informują o występowaniu pałeczek *L. monocytogenes* w ziemi uprawnej i warzywach. W badaniach własnych wykazano, że *L. monocytogenes* występuje w 10 % przebadanych próbach truskawek, 5 % pietruszki i 15 % ziemniaków pozyskiwanych z upraw ekologicznych. Doyle [4], Beuchat [3] i Olivier [16] dowiedli możliwości zanieczyszczenia surowca roślinnego w czasie transportu i obrotu. Gunasen i wsp. [9] wykazali, że 33 % przebadanych prób kapusty i 50 % sałaty przebadanych na Sri Lance zanieczyszczonych było *L. monocytogenes*.

Obecnie jakość mikrobiologiczna produktów żywnościowych podlega wymaganiom zawartym w rozporządzeniu Komisji (WE) nr 1441/2007 z dnia 5.12.2007 roku [20] w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych, w którym nie uwzględniono badania świeżych owoców i warzyw pod względem występowania *L. monocytogenes*. Rozporządzenie to określa tylko kryteria bezpieczeństwa i higieny produkcji owoców i warzyw krojonych, gotowych do spożycia, które nie powinny zawierać bakterii *Salmonella* (w 25 g), a dopuszczalne zanieczyszczenie *E. coli* wynosi 100 jtk/g.

Ze względu na wzrastającą ilość spożywanych świeżych owoców i warzyw, promowanie żywności pochodzącej z tzw. upraw ekologicznych, gdzie obornik stanowi jedyny dopuszczalnie stosowany nawóz, a ponadto może być źródłem zanieczyszczenia *L. monocytogenes* oraz wzrastającą liczbę zachorowań na listeriozę, istnieje potrzeba kontroli świeżych owoców i warzyw w kierunku *L. monocytogenes*.

## Wnioski

1. Bakterie *L. monocytogenes* izolowano tylko z owoców i warzyw pochodzących z upraw ekologicznych.
2. Badania biochemiczne wykonane na podstawie PN-EN ISO 11290-2:2000 nie mogą stanowić ostatniego etapu identyfikacji *L. monocytogenes* ze względu na duże rozbieżności wyników z badaniami przeprowadzonymi metodami biologii molekularnej.
3. Najbardziej wiarygodną metodą identyfikacji *L. monocytogenes* jest multiplex PCR.
4. Ze względu na częstość występowania *L. monocytogenes* w świeżych owocach i warzywach pochodzących z upraw ekologicznych istnieje konieczność weryfika-



cji i wprowadzenia obowiązkowych badań kontrolnych również tych surowców roślinnych.

*Praca finansowana ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego nr N N312 234438*

### Literatura

- [1] Aguado V., Vitas A.L., Garcia-Jalon I.: Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from vegetable processing plant by RAPD and REA. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, **90**, 341-347.
- [2] Border P.M., Howard J.J., Plastow G.S., Siggins K.W.: Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polimerase chain reaction. *Letters and Applied Microbiol.*, 1990, **11**, 158-162.
- [3] Beuchat L.R. : *Listeria monocytogenes*: incidence on vegetables. *Food Control*, 1996, **7**, 223-228.
- [4] Doyle M.P.: Fruits and vegetables safety- microbiological considerations. *Hortscience*, 1990, **25**, 1478-1481.
- [5] Duszkiewicz-Reinhard W., Grzybowski R., Sobczak E.: Teoria i ćwiczenia z mikrobiologii ogólnej i technicznej, Wyd. SGGW, Warszawa 1999.
- [6] Francis G.A., O'Beirne D.: Effects of acid adaptation on the survival of *Listeria monocytogenes* on modified atmosphere packaged vegetables. *Int. J. Food Sci. Technol*, 2001, **36**, 477-487.
- [7] Filipiak T.: Produkcja oraz spożycie owoców i warzyw w Polsce. *Roczn. Nauk.* 2005, tom **VIII**, zeszyt 3.
- [8] Garcia-Gimeno R.M., Zurera-Cosano G., Amaro-Lopez M.: Incidence, survival and growth of *Listeria monocytogenes* in ready-to-use mixed vegetables salads in Spain. *J. Food Safety*, 1996, **16**, 75-86.
- [9] Gunasena D.K., Kodikara C.P., Ganepola K., Widanapathirana S.: Occurrence of *Listeria monocytogenes* in food in Sri Lanka. *J. Nation. Sci Council of Sri Lanka*, 1995, **23**, 107-114.
- [10] Heisick J.E., Wagner D.E., Nierman M.L., Peeler J.T.: *Listeria* spp. found on fresh market product. *Applied Environ. Microbiol.*, 1989, **55**, 1925-1927.
- [11] Ho J.L., Shands K.N., Freidland G., Eckind P. & Fraser D.W.: An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Archives Internal. Medicine*, 1986, **146**, 520-524.
- [12] Jatou K., Sahli R., Bille J.: Development of polymerase chain reaction assays for detection of *Listeria monocytogenes* in clinical cerebrospinal fluid samples. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30**, 1931-1936.
- [13] Kordowska-Wiater M., Janas P., Sosnowska B., Waśko A., Nowak A., Kluza B.: Występowanie bakterii patogennych oraz drobnoustrojów wskaźnikowych zanieczyszczenia fekalnego w mrożonych warzywach. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **2 (51)**, 134-144.
- [14] MacGowan A.P., Bowker K., McLauchlin J., Bennett P.M. Reeves D.S.: The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. *Int. J. Food Microbiol.*, 1994, **21**, 325-334.
- [15] Nguyen-The, Karlin F.: The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci.Nutr.*, 1994, **34**, 371-401.
- [16] Olivier S.P., Jayarao B.M., Almeida R.A.: Foodborne pathogens in milk and dairy farm environment: food safety and public health implication. *Foodborne Pathogens Disease.*, 2005, **2**, 115-129.

- [17] Porto E., Eiroa M.: Occurrence of *Listeria monocytogenes* in vegetables. Dairy Food Environ. Sanitation, 2001, **21**, 282-286.
- [18] PN-EN ISO 11290-2:2000. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*.
- [19] PN-EN ISO 11290-2:2000/A1. Zmiana do polskiej normy. Dotyczy PN-EN ISO 11290-2. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*.
- [20] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Dz. U. 2007 r. Nr 61, poz 417.
- [21] Rozporządzenie Rady (WE) nr 834/2007 z dnia 28 czerwca 2007 r. w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych i uchylające rozporządzenie (EWG) Nr 2092/91.
- [22] Schlech W.F., Lavigne P.M., Bortolussi R.A., Alleri A.C., Haldane E.V., Wort A.J., Hightower A.W., Johnson S.E.: Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. New Eng. J. Med., 1983, **308**, 203-206.
- [23] Wong H.C.H., Chao W., Lee S.: Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan, Appl. Environ. Microbiol., 1990, **56 (10)**, 3101-3104.

#### OCURRENCE OF *L. MONOCYTOGENES* IN FRESH FRUITS AND VEGETABLES FROM ORGANIC FARMS IN WEST POMERANIAN REGION

##### S u m m a r y

Pursuant to the Commission Directive (EC) No. 1441/2007 of 05.12.2007 on microbiological criteria for foodstuffs, there is no obligation to inspect fresh fruits and vegetables whether or not they contain *L. monocytogenes* although there are more and more reports on finding these bacteria in plant materials. The quality of fruits and vegetables in Poland is assessed based on the visual evaluation of freshness and external appearance of the material, and on checking if this material does not get mouldy.

The objective of this paper was to assess the occurrence of *L. monocytogenes* in fresh fruits and vegetables and to compare different methods of identifying these bacteria.

220 samples were analyzed (80 fruits and 140 vegetables); all of them originated from both the local retail outlets and the agricultural farms using manure as a fertilizer.

Based on the identification performed according to PN EN ISO 11290-2:2000, *Listeria* sp was found in 50 % of beetroot samples, in 25 % of carrot, in 15 % of tomatoes and potatoes, and in 5% of parsley and in 25 % of strawberries. And when using a multiplex PCR technique, *L. monocytogenes* was found in 10 % of the strawberry samples, in 5 % parsley, and in 15 % potatoes. Biochemical analyses should not be the final phase of identifying *L. monocytogenes* because there are wide discrepancies between the results of this analysis and the results of research conducted using the molecular biology methods. A correlation was shown between the presence of *L. monocytogenes* in fruits and vegetables and the type of fertilizer used. *Listeria* sp and *L. monocytogenes* were isolated only from the samples of fruits and vegetables grown in farms where soils were manured. Owing to the frequency of *L. monocytogenes* occurrence in fruits and vegetables from certified farms running organic farming, it is vital to revise the control screening of plant materials and to make it obligatory.

**Key words:** anthropopression, *L. monocytogenes*, manuring, fruits organic farming, vegetables ☒