

JAROSŁAW KOWALIK, KAMIL ADAMCZEWSKI, STEFAN ZIAJKA

SZACOWANIE WZROSTU LICZBY KOMÓREK *LISTERIA MONOCYTOGENES* W SERZE MOZZARELLA Z WYKORZYSTANIEM URZĄDZENIA IMPEDYMETRYCZNEGO

Streszczenie

Celem badań było określenie liczby pałeczek *Listeria monocytogenes*, którymi zanieczyszczono próbki sera typu mozzarella i przechowywano je w temperaturze: 3, 6, 9, 12, 15, 21 i 37 °C. Pomiaru wzrostu liczby komórek *L. monocytogenes* dokonano za pomocą urządzenia Bactometer M64 (bioMérieux), stosując zmodyfikowane, selektywne podłoże mikrobiologiczne. Do podłoża BHI (bioMérieux) wprowadzono dodatek wybiórczy do bulionu Frasera i dodatek wybiórczy amonowo-żelazowy(III) dla *Listeria* (Merck). Otrzymane wyniki dopasowano do równania Baranyi'a i Roberta i porównano z modelami prognostycznymi w programie ComBase Predictor. W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano, że wraz ze wzrostem temperatury przechowywania tempo namnażania patogenu było większe, a wzrost liczby drobnoustroju następował także w warunkach chłodniczych. Zmodyfikowana pożywka mikrobiologiczna umożliwiła ilościowe określanie liczby komórek *Listeria* z wykorzystaniem urządzenia impedymetrycznego.

Słowa kluczowe: mozzarella, *Listeria monocytogenes*, bezpieczeństwo żywności, mikrobiologia prognostyczna

Wprowadzenie

Listeria monocytogenes to Gram-dodatnia pałeczka należąca wraz z *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. murrayi* oraz *L. welshimeri* do rodziny *Enterobacteriaceae*. Pałeczka ta nazywana jest często „bakterią lodówkową”, gdyż patogen może rozwijać się w warunkach chłodniczych (w zależności od składu fizykochemicznego środowiska), pomimo że jej optimum temperaturowe wynosi 30 - 37 °C [2, 5, 6, 18, 29, 31]. Pałeczki *Listeria* wywołują chorobę zwaną listeriozą. Na listeriozę narażone są głównie osoby mające nieprawidłowo funkcjonujący układ odpornościowy, osoby starsze, z chorobami nowotworowymi, z cukrzycą, marskością wątroby, alkoholicy,

Dr inż. J. Kowalik, mgr inż. K. Adamczewski, prof. dr hab. inż. S. Ziajka, Katedra Mleczarstwa i Zarządzania Jakością, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 7, 10-719 Olsztyn. Kontakt: j.kowalik@uwm.edu.pl

kobiety ciężarne oraz noworodki, wśród których śmiertelność wynosi 40 % w przypadku zakażeń wewnątrzłonowych oraz 10 % w przypadku zakażeń okołoporodowych [4, 5, 13, 16, 24, 30].

W 2011 roku na terenie UE zarejestrowano 107 zgłoszeń stwierdzających przekroczenie dopuszczalnego poziomu *Listeria* w produktach spożywczych. Przekroczenie dotyczyło m.in. ryb (61 razy, w tym 20 z Polski), serów różnego typu z Francji i Włoch (23 razy), pasztetów z Belgii, szynki i salami z Włoch [21].

W wykrywaniu obecności tego patogenu stosuje się, oprócz klasycznej metody płytkowej, metody alternatywne, wykorzystujące zmianę właściwości fizykochemicznych i biologicznych środowiska rozwoju mikroorganizmów. Wśród nich są metody: turbidymetryczne, filtracyjne, immunologiczne oraz wykorzystujące pomiar aktywności metabolicznej (impedymetria) [17]. Metoda impedymetryczna pozwala na wykrycie obecności oraz liczby mikroorganizmów w produkcie spożywczym, wykorzystując zmianę właściwości elektrycznych podłoża [3]. Rozporządzenie WE nr 178/2002 [22] wprowadziło pojęcie analizy ryzyka, w którym jednym z elementów składowych jest ocena ryzyka mikrobiologicznego. Ocenie ryzyka mikrobiologicznego może służyć mikrobiologia prognostyczna, która dostarcza informacji przydatnych w szacowaniu ryzyka narażenia na niebezpieczeństwo konsumentów w przypadku produktu zanieczyszczonego, który mógł lub może trafić do obrotu [12, 28]. Wykorzystanie mikrobiologii prognostycznej umożliwia ilościowe prognozowanie wzrostu lub przeżywalności drobnoustrojów [28].

Celem badań było:

- określenie tempa wzrostu *Listeria monocytogenes* w serze typu mozzarella podczas przechowywania w temp. 3 - 37 °C z wykorzystaniem alternatywnej metody pomiaru,
- zbadanie możliwości przystosowania metody impedymetrycznej do szybkiej mikrobiologicznej analizy ilościowej,
- wykorzystanie uzyskanych wyników w mikrobiologii prognostycznej.

Material i metody badań

Ser typu mozzarella, zakupiony w sklepie detalicznym, pochodził z trzech różnych partii produkcyjnych. Próbkę sera przebadano na obecność *L. monocytogenes* (zgodnie z normą PN-EN ISO 11290-1:1999/A1) [19]. Podzielono go na próbki o masie 25 g, a następnie zanieczyszczano hodowlą *Listeria monocytogenes* (szczepy 3 i 38) pozyskanych z Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności (Wydział Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie). Próbkę sera zanieczyszczono dziesięciokrotnym rozcieńczeniem (trzykrotny pasaż hodowli bulionowej) *L. monocytogenes* zapewniającym liczbę komórek na poziomie ok. 3 log jtk/g. Przygotowano po 15 próbek produktu dla 7 wariantów temperatury. Zanieczyszczone próbki

przechowywano w inkubatorach precyzyjnych z chłodzeniem ICP 500 (Mettler) w temp. 3, 6, 9, 12, 15, 21 i 37 °C.

Bactometer (bioMérieux) wykorzystuje zjawisko impedancji (zmiana przewodności elektrycznej pożywki podczas namnażania bakterii w założonej temperaturze wzrostu) [33]. W celu określania liczby komórek *Listeria monocytogenes* w produkcie dokonano kalibracji bactometru w odniesieniu do klasycznej metody płytkowej (według zaleceń instrukcji obsługi urządzenia). W metodzie płytkowej używano podłoża Chromocult Agar (Merck) według Ottavianiego i Agostiego (ALOA) do wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* (wg ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004) [9], zaś w systemie impedymetrycznym zmodyfikowaną pożywkę BHI (ang. *Brain Heart Infusion*, bioMérieux). Pożywkę tę celowo wzbogacono w dodatek selektywny Frasera (Merck), zawierający akryflawinę i kwas nalidiksowy (inhibitory wzrostu innych gatunków drobnoustrojów) oraz dodatek wzbogacający z cytrynianem żelazowo-amonowym (Merck) (stymulujący wzrost liczby komórek *Listeria*) [11, 14, 32]. W celu określenia selektywności zmodyfikowanej pożywki przebadano próbki sera niezanieczyszczonego pałeczkami *L. monocytogenes*. Bactometr nie wykrył zmian w impedancji podłoża.

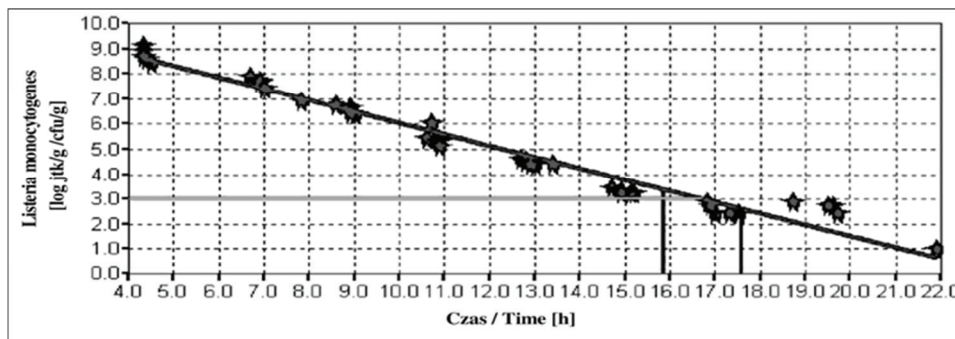
Pomiarów impedymetrycznych dokonywano za pomocą modułów baktometrycznych składających się z 16 wyposażonych w elektrody celek. Do każdej z nich dodawano 1 ml zmodyfikowanej, sterylnej pożywki BHI oraz 1 ml homogenatu badanego produktu, który otrzymano poprzez dodanie 225 ml wody peptonowej (Merck) do 25 g przechowywanej próbki (homogenizator typu Stomacher, Interscience). Czas, po którym dokonywano pomiaru liczby komórek zależał od dynamiki wzrostu patogenu w poszczególnych temperaturach przechowywania. Z każdej próbki wykonywano analizę mikrobiologiczną w trzech powtórzeniach, za wynik przyjmując średnią arytmetyczną z poszczególnych pomiarów.

Wyniki i dyskusja

Na rys. 1. przedstawiono krzywą kalibracji uzyskaną w programie komputerowym obsługującym system impedymetryczny. Wykreślono ją poprzez przypisanie uzyskanym czasom detekcji DT (czas, po którym następuje istotna zmiana impedancji pożywki w wyniku namnażania drobnoustroju), otrzymanych z kolejnych 10-krotnych rozcieńczeń hodowli *Listeria monocytogenes*, liczby jednostek tworzących kolonie (odczytanych z płytek Petriego z podłożem ALOA). Program komputerowy obsługujący urządzenie wyznaczył równanie regresji liniowej. Równanie miało postać:

$$\log \text{ jtk/g} = -0,45 \times \text{DT} + 10,34$$

(gdzie: DT – czas detekcji), a współczynnik determinacji $R^2 = 0,98$.



Rys. 1. Krzywa kalibracji umożliwiająca określenie liczby komórek *Listeria monocytogenes* w serze typu mozzarella.

Fig. 1. Calibration curve to determine the number of cells of *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese.

Oprócz monitorowania liczby drobnoustrojów w produkcie finalnym, istnieje możliwość prognozowania matematycznego wzrostu/przeżywalności badanych bakterii. Model prognostyczny w aplikacji ComBase Predictor (CP) (wykorzystujący równanie Baranyi'a i Roberta) umożliwiał symulację wzrostu liczby drobnoustrojów w określonych warunkach środowiska. Modele prognostyczne (zawarte w programach typu CP) tworzone są na podstawie wyników badań prowadzonych na zmodyfikowanych (zróżnicowanych pod względem składu fizykochemicznego) pożywkach syntetycznych. Wykorzystanie tego typu aplikacji pozwala na porównanie wygenerowanych modeli prognostycznych w CP z wynikami uzyskanymi w badaniach na produktach spożywczych. Zaobserwowano różnice w dynamice wzrostu liczby komórek *Listeria* między wygenerowanymi w CP a uzyskanymi podczas badań eksperymentalnych.

Aplikacją komputerową wspomagającą ocenę ryzyka mikrobiologicznego jest ComBase DMFit (ang. Dynamic Modelling Fit). Wykorzystuje ona również równanie Baranyi'a i Roberta [1, 10]. Program umożliwia dopasowanie modelu prognostycznego do wyników otrzymanych w badaniach. Ponadto wyznacza parametry takie, jak: czas trwania lagfazy oraz maksymalne tempo wzrostu liczby bakterii.

Wyniki badań własnych wprowadzono do aplikacji DMFit i otrzymano krzywe i parametry wzrostu *L. monocytogenes*. Uzyskane krzywe wzrostu porównano z krzywymi wygenerowanymi w programie CP. Program CP generował prognozy na podstawie wyników badań pochodzących z zanieczyszczonych *Listeria* zmodyfikowanych pożywek (z uwzględnieniem pH, zawartości NaCl), podobnych do parametrów fizykochemicznych sera typu mozzarella użytego w badaniach.

Podczas przechowywania zanieczyszczonych próbek sera w temp. 3 °C, wzrost liczby drobnoustrojów (rys. 2A) z poziomu początkowego – 3 log jtk/g do poziomu najwyższego – 7 log jtk/g nastąpił po 408 h (tab. 1). Przyrost liczby komórek w po-

czątkowej fazie przechowywania próbek był bardzo powolny, dopiero po ok. 200 h zaobserwowano wzrost logarytmiczny. Wyniki badań były podobne do przebiegu krzywych wzrostu wyznaczonych w CP. Maksymalne tempo wzrostu liczby komórek w temp. 3 °C wyniosło 0,0112 1/h (wyliczone w aplikacji DMFit). W DMFit wyliczono również czas trwania lagfazy (130 h). W temp. 6 °C zaobserwowano szybsze tempo wzrostu niż w temp. 3 °C (0,0159 1/h) (rys. 2B). W tej temperaturze fazę logarytmicznego wzrostu stwierdzono również po ok. 200 h. Maksymalny poziom populacji według wyliczeń w DMFit na podstawie uzyskanych wyników osiągnięto po 360 h (tab. 1). Podobną tendencję zaobserwowano w programie CP.

W temp. 9 °C (rys. 2C) maksymalny wzrost liczby komórek *L. monocytogenes* zaobserwowano po 144 h przechowywania (z poziomu 3 log jtk/g do 5 log jtk/g). Maksymalne tempo wzrostu wyniosło 0,0236 1/h, zaś lagfaza – 30 h (wyliczenia w ComBase DMFit). Podobny poziom *L. monocytogenes* w CP uzyskano po 200 h przechowywania w temp. 12 °C (rys. 2D). Wzrost liczby komórek *L. monocytogenes* następował bezpośrednio po zanieczyszczeniu materiału badawczego. Maksymalne tempo wzrostu wynosiło 0,0326 1/h (DMFit), a fazę stacjonarną osiągnięto po ok. 100 h przechowywania. Lagfazy nie zaobserwowano również podczas przechowywania próbek w temp. 15, 21 i 37 °C (rys. 2E, F, G). Maksymalne tempa wzrostu wyniosły odpowiednio: 0,0586, 0,0216 i 0,5635 1/h (DMFit) w temp. 15, 21 i 37 °C. Uzyskane wyniki z poszczególnych temperatur eksperymentalnych wprowadzono do aplikacji DMFit, uzyskując współczynniki determinacji R^2 świadczący o jakości dopasowania uzyskanych rezultatów do modelu Baranyi'a i Roberta. Najniższe wartości współczynnika uzyskano w przypadku danych pochodzących z badań prowadzonych w temp. 3 i 6 °C (R^2 = odpowiednio: 0,68 i 0,78). Lepszym dopasowaniem do modelu prognostycznego charakteryzowały się wyniki z temp. 9, 12, 15, 21 i 37 °C (R^2 = odpowiednio: 0,84, 1,0, 0,86, 0,93 i 0,94).

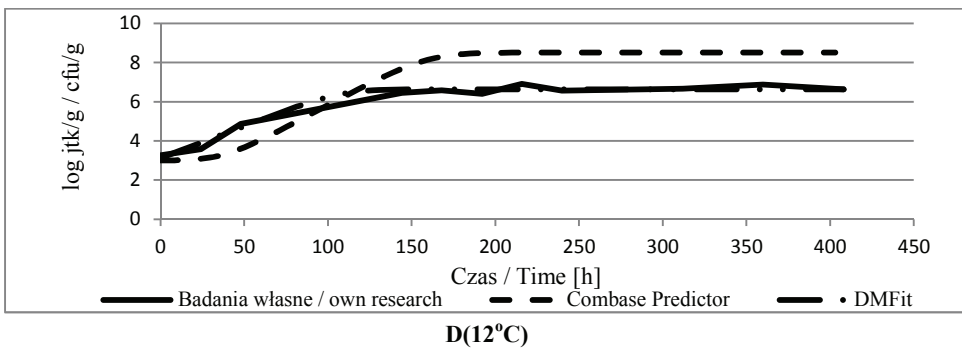
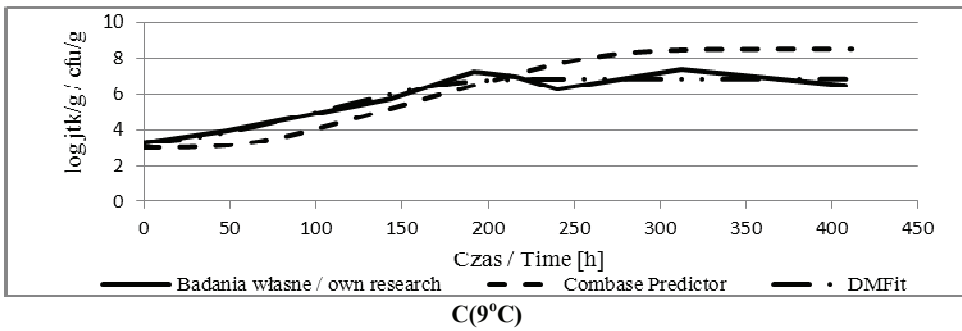
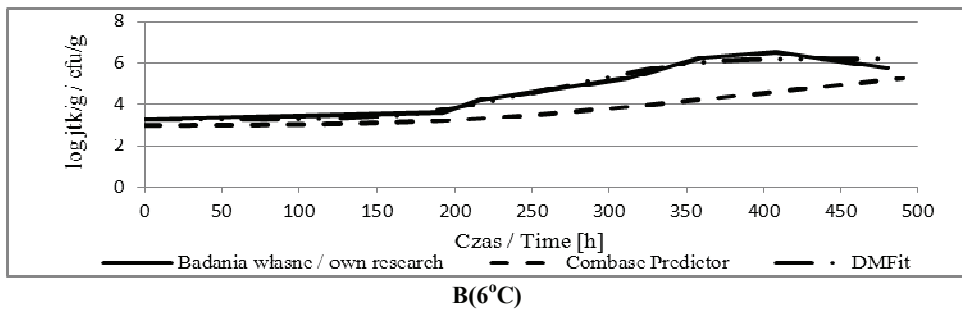
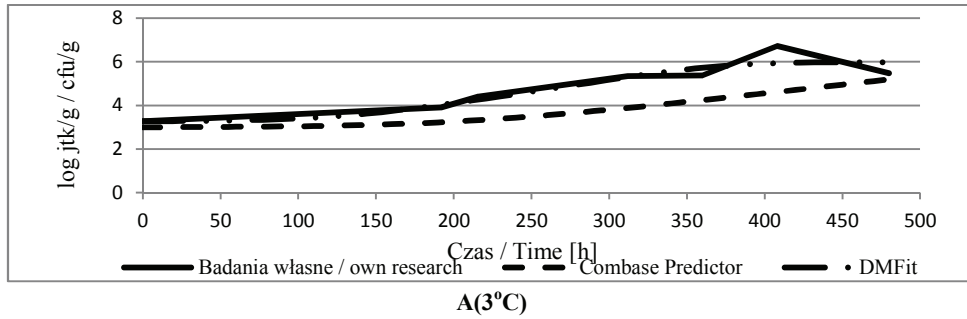
Na przeżywalność *L. monocytogenes* w określonym produkcie spożywczym może mieć wpływ wiele czynników. Bakterie te wykorzystują jako źródło energii: alkohole, kwasy organiczne, tłuszcze i inne substancje organiczne. Ser mozzarella stanowi dobre środowisko rozwoju *L. monocytogenes* ze względu na parametry fizykochemiczne. Zaobserwowany w badaniach własnych, w niskich temperaturach przechowywania, dłuższy czas trwania lag fazy niż w CP mógł wynikać ze współzawodnictwa bakterii fermentacji mlekowej (mikroflora technologiczna). Dominującym czynnikiem wpływającym na tempo namnażania patogenu była temperatura, o czym świadczy brak fazy adaptacyjnej w przypadku zanieczyszczonych próbek przechowywanych w temp. 15, 21 i 37 °C [25, 26]. Stecchini i wsp. [27] badali zachowanie *L. monocytogenes* w temp. 5 °C w serze typu mozzarella oraz w obecności bakterii z gatunku *Lactococcus lactis*. Badacze ustalili czas trwania lagfazy na poziomie 91 h oraz maksymalne tempo wzrostu wynoszące 0,0314 1/h (wyliczenie w aplikacji ComBase DMFit). Wzrost licz-

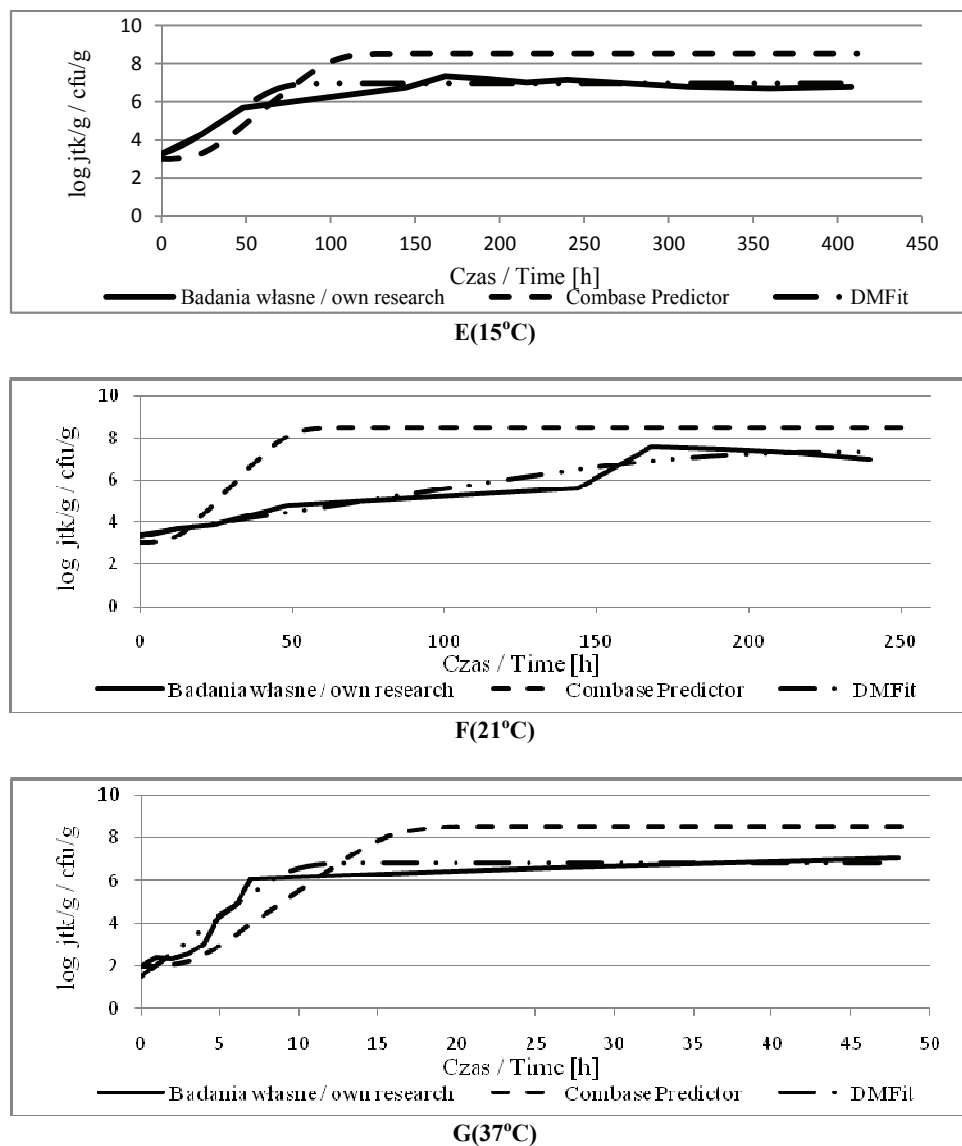
by drobnoustrojów następował przez ok. 270 h z poziomu 2 log jtk/g do 5 log jtk/g. Wymienieni autorzy uzyskali dwukrotnie szybsze tempo wzrostu patogenu w porównaniu z badaniami własnymi w temp. 6 °C, podczas podobnego czasu przechowywania. Menon i Garg [15], którzy badali wpływ olejku goździkowego na *L. monocytogenes* w serze w temp. 7 °C, również zaobserwowali wzrost liczby komórek patogenu. Wykazali oni maksymalne tempo wzrostu na poziomie 0,0365 1/h i czas trwania lagfazy – 11 h. Wzrost liczby komórek z poziomu początkowego 4 log jtk/g do poziomu 6 log jtk/g trwał ok. 80 h. Zaobserwowali dwukrotnie szybsze maksymalne tempo wzrostu, krótszą lagfazę oraz mniejszy przyrost liczby komórek w porównaniu z badaniami własnymi w temp. 6 °C.

Tabela 1. Zestawienie wyznaczonych parametrów (ComBase DMFit) opisujących zachowanie *L. monocytogenes* w serze mozzarella.

Table 1. Compilation of calculated parameters (ComBase DMFit) describing the behaviour of *L. monocytogenes* in mozzarella cheese.

Parametry Parameters	Temperatura / Temperature [°C]						
	3	6	9	12	15	21	37
Lagfaza Lag phase [h]	200	200	30	0	0	0	0
Maksymalne tempo wzrostu Maximum growth rate [h ⁻¹]	0,0112	0,0159	0,0236	0,0326	0,0586	0,0216	0,5635
Maksymalna gęstość populacji [log jtk/g] Maximum population density [log cfu/g]	6,72	6,29	7,21	6,91	7,32	7,61	7,09
Czas uzyskania maksimum populacji Time to achieve maximum population [h]	408	360	192	216	168	168	48
Czas generacji Generation time [h]	89,3	62,9	42,4	30,7	17,1	46,3	1,8





Rys. 2. Zestawienie otrzymanych wyników (oraz dopasowanych w aplikacji DMFit) wzrostu liczby pałeczek *Listeria monocytogenes* w serze mozzarella podczas przechowywania w temp.: 3 °C (A), 6 °C (B), 9 °C (C), 12 °C (D), 15 °C (E), 21 °C (F) i 37 °C (G) z modelem prognostycznym CP.

Fig. 2. Comparison of obtained results (that match DMFit application) of growth of *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese during storage at: 3 °C (A), 6 °C (B), 9 °C (C), 12 °C (D), 15 °C (E), 21 °C (F) and 37 °C (G) with CP predictive model.

Określenie obecności, a w szczególnych przypadkach również liczby komórek *L. monocytogenes* w produktach spożywczych należy do producenta żywności. Zgodnie z rozporządzeniem Komisji Europejskiej nr 2073 z 2005 roku [23] dla żywności gotowej do spożycia, w której możliwy jest wzrost *L. monocytogenes*, niebędącej żywnością przeznaczoną dla niemowląt ani żywnością specjalnego medycznego przeznaczenia, określono wartość maksymalną liczby komórek *L. monocytogenes* – 100 jtk/g. W rozporządzeniu zaproponowano referencyjną metodę określania liczby *Listeria monocytogenes* w produktach spożywczych (ISO 11290-2) [20]. Metoda klasyczna (płytkowa) jest czasochłonna, dlatego po walidacji metody alternatywnej w stosunku do metody referencyjnej ilościowe określanie liczby komórek drobnoustroju można dokonać w znacznie krótszym czasie. Ma to duże znaczenie w przypadku produktów o krótkim terminie przydatności do spożycia, a będących już w łańcuchu dystrybucyjnym. Obecnie istnieją na rynku nowsze aparaty wykorzystujące zjawisko impedymetrii, które po właściwym przystosowaniu z powodzeniem można zastosować do ilościowego określania ryzyka rozwoju wielu grup patogenów w różnych produktach spożywczych. W celu zapewnienia bezpieczeństwa zdrowotnego żywności i przewidywania zagrożeń można wykorzystać bazę danych ComBase. Baza danych działa w systemie *online*, zawiera wyniki badań oraz programy komputerowe, które umożliwiają prognozowanie wzrostu liczby drobnoustrojów przy uwzględnieniu różnych czynników środowiska. Po walidacji na podstawie własnych danych eksperymentalnych, aplikacja może być użyteczna w prognozowaniu zachowania różnych gatunków drobnoustrojów (w tym patogenów) [7]. Programy tego typu można wykorzystać w zakładach przemysłowych na etapie analizy zagrożeń, szacowania ryzyka mikrobiologicznego czy weryfikacji wyników badań prowadzonych przez przykładowe laboratoria i instytucje publiczne zajmujące się nadzorem sanitarnym. Obecnie powstają bazy danych zawierające modele wzrostu drobnoustrojów na podstawie wyników badań konkretnych produktów spożywczych. Przykładem może być portal internetowy Wama Predictor, w którym znajdują się modele wzrostu/przeżywalności różnych patogenów w wybranych produktach mleczarskich i mięsnych [8].

Wnioski

1. Alternatywne metody pomiaru liczby komórek wykorzystujące zjawisko impedymetrii po wykalibrowaniu urządzenia i zmodyfikowaniu pożywki mogą być przydatne do szybkiego ilościowego określania bakterii *Listeria monocytogenes* w serze typu mozzarella.
2. Wyniki badań pozyskane podczas przechowywania *Listeria monocytogenes* w serze typu mozzarella i dopasowane do modelu Baranyi'a w ComBase DMFit są zbliżone do prognoz wygenerowanych w CP.

3. Program CP generuje krzywe wzrostu liczby komórek *Listeria monocytogenes* zapewniające margines bezpieczeństwa prognoz w zakresie danych eksperymentalnych w temp. 3 - 37 °C, co pozwala na korzystanie z niego podczas szacowania ryzyka mikrobiologicznego produktów o podobnych parametrach fizykochemicznych.

Praca naukowa finansowana ze środków Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w ramach projektu badawczego pt. „Zastosowanie mikrobiologii prognostycznej do modelowania bezpieczeństwa żywności” (N R12 0097 06).

Literatura

- [1] Baranyi J., Tamplin M.: ComBase: A Common Database on Microbial Responses to Food Environments. *J. Food Prot.*, 2004, **9** (67), 1834-1840.
- [2] Budzińska K., Wroński G., Szejniuk B.: Survival time of bacteria *Listeria monocytogenes* in water environment and sewage. *Pol. J. Environ. Stud.*, 2012, **1** (21), 31-37.
- [3] Czaczyk K., Trojanowska K.: Zastosowanie szybkich metod oznaczania i identyfikacji drobnoustrojów. *Przem. Spoż.*, 2006, **2**, 14-21.
- [4] Dziubek Z.: Zakażenia wywołane przez bakterie Gram dodatnie. W: *Choroby zakaźne i pasożytnicze*. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 2010, ss. 118-119.
- [5] Furowicz A.J.: Bakteryjne i wirusowe choroby związane z zatruciami pokarmowymi. W: *Choroby odzwierzęce przenoszone drogą pokarmową*. Red. A. Boroń-Kaczmarska. Wyd. Lek. PZWL, Warszawa 1999, ss. 132-153.
- [6] Hilbert F., Smulders F. J. M.: Kälte ist kein vollständiger Schutz, *Fleischwirtschaft*, 2000, **12**, 26-28.
- [7] Informacje o bazie ComBase [online]. Dostępne w Internecie [20.01.2013]: <http://www.combase.cc/index.php/en/>
- [8] Informacje o bazie Wama Predictor [online]. Dostępne w Internecie [22.02.2013]: <http://wamapredictor.uwm.edu.pl/WamaPredictor>
- [9] ISO 11290-2:1998/Amd 1:2004. Modyfikacja pożywki do oznaczania liczby. Modyfikacja normy EN ISO 11290-2:1998. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*. Metoda oznaczania liczby.
- [10] Koseki S.: Microbial Responses Viewer (MRV): A new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. *Int. J. Food Microbiol.*, 2009, **134**, 75-82.
- [11] Kowalik J., Łobacz A., Tarczyńska A.S., Ziajka S.: Graphic validation of growth models for *Listeria monocytogenes* in milk during storage. *Milchwissenschaft*, 2012, **1** (67), 38-42.
- [12] Kowalik J., Łobacz A., Tarczyńska A.S., Ziajka S.: Zastosowanie mikrobiologicznych modeli prognostycznych w produkcji bezpiecznej żywności. *Med. Weter.*, 2009, **6** (65), 381-384.
- [13] Magdzik W., Naruszewicz-Lesiuk D., Zieliński A.: Listerioza. W: *Choroby zakaźne i pasożytnicze – epidemiologia i profilaktyka*. α-Medica Press, Bielsko-Biała 2007, ss. 188-193
- [14] Malarska J.: Tradycyjne i nowoczesne metody ilościowego oznaczania drobnoustrojów. *Med. Weter.*, 2005, **10**, 1091-1092.
- [15] Menon K.V., Garg S.R.: Inhibitory effect of clove oil on *Listeria monocytogenes* in meat and cheese. *Food Microbiol.*, 2001, **6** (18), 647-650.
- [16] Molenda J.: Listerioza – patogenoza, perspektywy bezpieczeństwa żywności. *Med. Weter.*, 2009, **3**, 151-154.
- [17] Nowak A., Ołtuszek-Walczyk E.: *Listeria monocytogenes* w żywności metody wykrywania i oznaczania. *Przem. Spoż.*, 2012, **11** (66), 30-33.

- [18] Pichner R.: Nachweis und Klassifizierung von Bakterien. *Fleischwirtschaft*, 2007, **11**, 105-106.
- [19] PN-EN ISO 11290-1:1999/A1. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*. Metoda wykrywania obecności.
- [20] PN-EN ISO 11290-2:2000. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*. Metoda oznaczania liczby.
- [21] Raport roczny za rok 2011. [online]. RASFF. Dostępne w Internecie [22.02.2013]: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm
- [22] Rozporządzenie (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28 stycznia 2002 r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności. Dz. Urz. UE L 31/1, s. 1, z 01.02.2002.
- [23] Rozporządzenie (WE) Komisji nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Dz. Urz. UE L 338/1 s. 1, z 22.12.2005.
- [24] Schwartzman M.S., Maffre A., Tenenhaus-Aziza F., Sanaa M., Butler F., Jordan K.: Modelling the fate of *Listeria monocytogenes* during manufacture and ripening of smeared cheese made with pasteurised or raw milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, **145**, 31-38.
- [25] Sip A., Gardo A.: *Listeria monocytogenes*. Metody eliminowania z żywności – chemiczne, biologiczne i kombinowane. *Przem. Spoż.*, 2011, **3**, 35-38.
- [26] Sip A., Krasowska M., Więckowicz M.: Zastosowanie bakteriocyn klasy IIa bakterii fermentacji mlekowej. *Biotechnologia*, 2009, **3**, 126-147.
- [27] Stecchini M.L., Aquili V., Sarais I.: Behavior of *Listeria monocytogenes* in Mozzarella cheese in presence of *Lactococcus lactis*. *Int. J. Food Microbiol.*, 1995, **3 (25)**, 301-310.
- [28] Szczawiński J.: Mikrobiologia prognostyczna – zastosowanie praktyczne. *Med. Weter.*, 2012, **9 (68)**, 540-543.
- [29] Szymczak B., Sawicki W., Bogusławska-Wąs E., Koronkiewicz A., Dąbrowski W.: Występowanie *L. monocytogenes* w świeżych owocach i warzywach pochodzących z upraw ekologicznych województwa zachodniopomorskiego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2011, **2 (75)**, 67-76.
- [30] Virella G.: Mikrobiologia i choroby zakaźne. Red. P.B Heczko., Wyd. Med. Urban & Partner, Wrocław 2000, ss. 130-132.
- [31] Voysey P.A., Anslow P.A., Bridgwater K.J., Lavender B., Watson L.: The effects of butter characteristics on the growth of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Dairy Technol.*, 2009, **3 (62)**, 326-330.
- [32] Walczycka M.: Metody inaktywacji i hamowania wzrostu *Listeria monocytogenes* w przetworach mięsnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **2 (43)**, 61-72.
- [33] Zaręba T., Tyski S.: Zastosowanie metody impedymetrii w badaniu skuteczności działania środków konserwujących leki. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 2002, **54**, 89-96.

ESTIMATING CELL GROWTH OF LISTERIA MONOCYTOGENES IN MOZZARELLA CHEESE USING IMPEDIMETRIC DEVICE

S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the count of *Listeria monocytogenes*, used to contaminate the samples of mozzarella cheese that were stored at a temperature of 3, 6, 9, 12, 15, 21, and 37 °C. The *L. monocytogenes* cell growth was measured by a M64 Bactometer device (bioMérieux) using a modified, selective microbiological culture medium. Into the BHI medium (bioMérieux) were added: a selective additive to a Fraser broth and a selective iron (III) ammonium additive for *Listeria* (Merck). The results obtained were adjusted to match the Baranyi and Roberts equation and compared with the

predictive models in ComBase Predictor. Based on the research results obtained, it was found that, along with the increasing storage temperature the rate of proliferation of the pathogen increased, and, also, reported was the increase in the count of organisms under the cooling conditions. The modified culture medium made it possible to determine quantitatively the count of *Listeria* cells with the use of an impedimetric device.

Key words: mozzarella cheese, *Listeria monocytogenes*, food safety, predictive microbiology ☒