

Normy metodyczne w badaniach mikrobiologicznych łańcucha żywnościowego

Krzysztof Kwiatek, Elżbieta Kukier, Magdalena Goldsztejn

z Zakładu Higieny Pasz Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach

Prawo żywnościowe Unii Europejskiej, mające zastosowanie na całej długości łańcucha żywnościowego, ma na celu utrzymanie na jak najniższym poziomie występowanie czynników zagrożeń, będących przedmiotem kontroli laboratoryjnej prowadzonej w ramach nadzoru producenckiego i urzędowego (1, 2, 3, 4, 5). Dotyczy to również zagrożeń typu mikrobiologicznego we wszystkich ogniwach łańcucha żywnościowego (6, 7). W ramach przyjętych kryteriów z zakresu bezpieczeństwa dla produktu finalnego stwierdza się, że nie tylko środki spożywcze, ale i pasze nie powinny zawierać mikroorganizmów, ich toksyn ani metabolitów w ilościach stanowiących zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Warunek ten znajduje obecnie swoje umocowanie prawne dla żywności, w uchwalonym, a następnie nowelizowanym rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2073/2005 z 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych (8). Wśród zawartych w tym rozporządzeniu parametrów jakości mikrobiologicznej wyróżnić można parametry stanowiące o bezpieczeństwie żywności oraz kryteria o charakterze jakościowym i parametrycznym mające charakter wskaźników higieny.

W grupie kryteriów mikrobiologicznych służących jako parametr bezpieczeństwa żywności wymienić należy: kryterium obecności drobnoustrojów patogennych dla człowieka tj.: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Enterobacter sakazaki* i *E. coli*, jako wskaźnik zanieczyszczenia kałowego. W grupie tej znalazły się również toksyny: enterotoksyna gronkocowa i histamina. W zakresie kryteriów mikrobiologicznych o charakterze parametrycznym, określającej poziom higieny, wyróżnić należy ogólną liczbę bakterii tlenowych, liczbę bakterii z rodziny Enterobacteriaceae, pałeczkę *Salmonella*, *E. coli* i koagulazo-dodatnie szczepy *Staphylococcus aureus*.

W odniesieniu do pasz istnieje zapis w rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady nr 183/2005, stwierdzający, że podmioty działające na rynku pasz powinny przestrzegać zgodności ze szczególnymi kryteriami mikrobiologicznymi (9).

Oznaczać to może, iż w niedalekiej przyszłości będą ustalone bardziej precyzyjne kryteria mikrobiologiczne dla pasz. Warto dodać, że od dłuższego czasu trwają prace w DG SANCO nad opracowaniem kryteriów mikrobiologicznych dla pasz (10). Warto tu zaznaczyć, że zgodnie z prawem UE „zasadniczą odpowiedzialność za bezpieczeństwo paszy ponosi przedsiębiorstwo paszowe” (10), a obowiązujące obecnie wymagania mikrobiologiczne dla pasz nie dopuszczają jedynie obecności pałeczek *Salmonella* spp. w 25 g paszy (7). Ponadto wydane zostały przepisy, które limitują liczbę bakterii z rodziny Enterobacteriaceae w materiałach paszowych pochodzenia zwierzęcego i surowej karmie dla zwierząt domowych (11).

Wykonanie badania mikrobiologicznego żywności i pasz oraz innych matryc z łańcucha żywnościowego wymaga zastosowania odpowiednich normatywnych metod badawczych, które określają sposób pobierania, przygotowania próbek do badań, tok postępowania analitycznego i formułowania wyniku. Stąd powstał zamiar opracowania tego artykułu, który stanowi aktualizację i kontynuację poprzedniego opracowania (12).

W badaniach mikrobiologicznych żywności i pasz coraz większą rolę odgrywają metodyczne normy międzynarodowe (ISO) i europejskie (EN), które w zdecydowanej większości są przyjmowane w naszym kraju jako normy polskie (PN) zharmonizowane z tymi normami (13, 14). W związku z powyższym celowe wydaje się omówienie zakresu stosowania aktualnych wydań polskich norm (PN), które są zalecane do stosowania w badaniach mikrobiologicznych. Należy też dodać, że w ostatnim okresie przyjęty został nowy ogólny tytuł norm ISO opracowywanych w ramach Podkomitetu SC9, w brzmieniu: „Mikrobiologia łańcucha żywnościowego” (Microbiology of the food chain), w zamian za „Mikrobiologia żywności i pasz” (Microbiology of food and animal feedingstuffs). Podobnie dotyczy tytułu norm EN opracowywanych w ramach CEN/TC 275 „Analiza żywności. Metody horyzontalne”. Oznacza to rozszerzenie zakresu badań i stosowania tych dokumentów o brakujące dotąd

Methodological standards in food chain microbiological examinations

Kwiatek K., Kukier E., Goldsztejn M.,
Department of Hygiene of Animal Feedingstuffs,
National Veterinary Research Institute, Pulawy

This paper aims at the presentation of important issue of standards in food chain evaluation. In accordance of the quality assurance system, the microbiological laboratories are obligated to use standardized and validated methods which are precisely described as different norms. Taking this into account the article was prepared to present and describe Polish (PN), international (ISO) and European (EN) methodological norms which should be followed during microbiological examinations of different samples taken from the food chain. Furthermore, some general standardization aspects of microbiological examinations concerning scope of norms, culture media quality, preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions are also discussed in this paper.

Keywords: microbiological norm, standardization, laboratory examination.

matryce oraz ogniwa łańcucha żywnościowego. W związku z tym celem opracowania jest także zwrócenie uwagi na poszerzenie się zakresu badanych matryc przy stosowaniu norm metodycznych używanych dotychczas głównie w analizie mikrobiologicznej żywności i pasz.

Normy dotyczące ogólnych zasad badania mikrobiologicznego

Potrzeba ujednoczenia warunków laboratoryjnych mających istotny wpływ na powtarzalność wyników badań i możliwie jak najwyższą ich jakość znalazła odzwierciedlenie w znowelizowanej ostatnio międzynarodowej normie EN-ISO 7218:2007/A1:2013 „Microbiology of food and feedingstuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations”. Na poziomie krajowym norma ta została zharmonizowana i oznaczona jako PN-EN ISO 7218:2008/A1:2013–10 „Mikrobiologia żywności i pasz. Ogólne wymagania i zasady badań mikrobiologicznych”. W nowej normie bardziej szczegółowo określono sposób wykonywania badań mikrobiologicznych żywności i pasz, zgodnie z wymaganiami i potrzebami systemu zapewnienia wiarygodności wyników badań.

W obrębie grupy polskich norm (PN) zharmonizowanych z normami ISO/EN, określających ogólne zasady i metody badań mikrobiologicznych, należy wymienić w pierwszej kolejności te dotyczące przygotowania próbek żywności do badania

w laboratorium. Pierwszą z tej grupy jest norma PN-EN ISO 6887-1:2000 „Mikrobiologia żywności i pasz. Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Ogólne zasady przygotowania zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych”. Określony zakres tej normy wskazuje na ogólne zastosowanie na etapie przygotowania próbek do analiz mikrobiologicznych. Druga część omawianego dokumentu to norma PN-EN ISO 6887-2:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Część 2. Specyficzne zasady przygotowywania mięsa i przetworów mięsnych”. Norma powyższa ma zastosowanie do badania świeżego, surowego i przetworzonego mięsa, drobiu oraz przetworów drobiowych. Kolejny arkusz normatywny z tego zakresu to norma PN-EN ISO 6887-3:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Część 3: Specyficzne zasady przygotowywania ryb i przetworów rybnych”. Opisane tu zostały tylko te metody przygotowania próbek, które można wykorzystać głównie przy badaniu wielokierunkowym. Norma ma zastosowanie do badania surowych, przetworzonych, gotowanych lub mrożonych ryb, skorupiaków i mięczaków oraz produktów pochodnych. Czwararty arkusz to norma PN-EN ISO 6887-4/A1:2011 „Mikrobiologia żywności i pasz. Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Część 4: Specyficzne zasady przygotowania produktów innych niż mleko i przetwory mleczne, mięso i przetwory mięsne oraz ryby i przetwory rybne”. Powyższy dokument ma zastosowanie w badaniach takich produktów, jak: margaryna, mąka, produkty zbożowe, pasze, makuchy, żelatyna, produkty mleczne, jaja, produkty jajeczne, produkty fermentowane i produkty piekarnicze. Piąty arkusz to norma PN-EN ISO 6887-5:2010 „Mikrobiologia żywności i pasz. Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Część 5: Specyficzne zasady przygotowania mleka i przetworów mlecznych”. Niniejsza norma ma szerokie zastosowanie w badaniach mikrobiologicznych mleka i jego przetworów. Szósty arkusz to norma PN-EN ISO 6887-6:2013-06 „Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Część 6: Specyficzne zasady przygotowywania próbek

pobranych na etapie produkcji pierwotnej”. Próbkę do badań mikrobiologicznych pobrane ze środków transportowych i/lub liczenie drobnoustrojów pochodzących od żywych zwierząt lub z ich środowiska są w zakresie niniejszej normy, wyłączone są natomiast próbki pobierane do oceny jakości higienicznej mięsa. Niniejsza część ISO 6887, jako przykład poszerzania się zakresu badanych matryc, ma zastosowanie w przedmiotowej analizie laboratoryjnej próbek pobranych z narzędzi, gospodarstwa rolnego, ze środków transportu zwierząt lub z tusz zwierzęcych w ubojniach, jako wskaźnik stanu mikrobiologicznego.

Horizontalne normy metodyczne

Prowadzone od szeregu lat prace normalizacyjne na poziomie zarówno europejskim, jak i międzynarodowym mają również na celu ujednoczenie norm metodycznych dotyczących wykrywania drobnoustrojów patogennych, które w swoim zakresie rozciągają się na cały łańcuch żywnościowy. Czołowym zagadnieniem w tym obszarze jest metodyka wykrywania pałeczki *Salmonella*. Obecnie do wykrywania tego patogenu stosuje się powszechnie metodę opisaną w normie PN-EN ISO 6579:2003 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella* spp.”. Norma ta podaje metodę wykrywania pałeczek *Salmonella*, łącznie z *Salmonella* Typhi i *Salmonella* Paratyphi. Omawiana norma ma zastosowanie do produktów przeznaczonych do spożycia przez ludzi i pasz dla zwierząt oraz próbek środowiskowych z obszarów produkcji żywności i obrotu żywnością. Metoda ta jednak nie zapewnia wykrycia wszystkich szczepów *Salmonella* Typhi i Paratyphi. Z uwagi na zagrożenie osób wykonujących badania ważne jest, aby wykrywanie *Salmonella* było prowadzone jedynie przez właściwie wyposażone laboratoria, pod kierunkiem wykwalifikowanych mikrobiologów i przy zachowaniu odpowiedniej ostrożności w czasie prowadzenia badań. W 2007 r. opublikowano załącznik normatywny „D” do normy ISO 6579:2002/Amd. 1:2007, który został oznaczony jako PN EN-ISO 6579:2003/A1:2007 „Wykrywanie *Salmonella* spp. w kale zwierząt i próbkach środowiskowych z etapu produkcji pierwotnej”. Procedura tu opisana ma zastosowanie do wykrywania *Salmonella* spp. w kale zwierząt (drobiu) i próbkach pobranych na poziomie produkcji pierwotnej. Warto dodać, że od kilku już lat trwa proces nowelizacji tej normy z podziałem na 3 arkusze metodyczne poświęcone wykrywaniu, oznaczaniu liczby i serotypizacji *Salmonella*.

Kolejnym ważnym problemem badawczym w badaniu matrycy żywnościowej, paszowej oraz próbek środowiskowych jest wykrywanie i oznaczanie liczby *Listeria monocytogenes*. Aktualnie w laboratoriach do wykrywania *Listeria monocytogenes* stosuje się normę PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*. Metoda wykrywania obecności”. Nowelizacja metody z 2005 r. wprowadziła modyfikację pożywki do izolacji tego patogenu i testu na hemolizę, łącznie z precyzją wyników. Do oznaczania liczby bakterii z tego gatunku stosuje się obecnie drugą część normy PN-EN 11290-2:2000/A1:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*. Metoda oznaczania liczby”. Uwzględniając ograniczenia omówione we wprowadzeniu, norma ma zastosowanie do badania wszystkich rodzajów żywności i pasz oraz próbek środowiskowych, a próg wykrywalności metody wynosi 10 lub 100 jtk, odpowiednio: w 1 ml lub 1 g próbki.

Ważnym problemem w badaniu żywności jest również wykrywanie i oznaczanie liczby gronkowca złocistego – *Staphylococcus aureus*. Obecnie w badaniach mikrobiologicznych żywności i pasz stosowana jest norma PN-EN ISO 6888-1:2001/A1:2004 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków). Część 1. Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej Baird-Parkera”. Do oznaczania liczby *S. aureus* można również stosować normę PN-EN ISO 6888-2:2001/A1:2004 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków). Część 2. Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej z plazmą króliczą i fibrynohemem”. Dla próbek, w których spodziewany jest niski poziom kontaminacji przez gronkowce chrobotwórcze, zalecana jest norma PN-EN ISO 6888-3:2004/AC:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich. Część 3. Wykrywanie obecności i oznaczanie małych liczb metodą NPL”. Metoda ta ma zastosowanie w badaniach próbek produktów żywnościowych, próbek pobranych ze środowiska zakładów produkujących żywność i zajmujących się obrotem żywnością.

Do oznaczania liczby *Bacillus cereus* w żywności i paszach przeznaczona jest norma PN-EN ISO 7932:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby przypuszczalnych

Bacillus cereus. Metoda liczenia kolonii w temperaturze 30°C, w której stosowane jest podłoże MYP.

Badania ukierunkowane na wykrywanie i oznaczanie liczby bakterii z rodziny Enterobacteriaceae są stosowane do oceny stanu sanitarno-higienicznego oraz stopnia zanieczyszczenia kałowego badanej matrycy. Do badań w tym zakresie ma obecnie zastosowanie norma PN-ISO 21528-1:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Enterobacteriaceae*. Część 1. Wykrywanie i oznaczanie liczby metodą NPL z przednamnaniem”. Zawarta w normie procedura postępowania badawczego ma zastosowanie do produktów spożywczych i pasz oraz próbek środowiskowych pobranych z obszaru produkcji i obrotu żywnością. Oznaczanie stopnia zanieczyszczenia wykonywane jest metodą NPL po inkubacji płynnej pożywki w temperaturze 30 lub 37°C. Metoda powinna być stosowana, gdy poszukiwane drobnoustroje wymagają ożywienia poprzez przednamnanie oraz gdy szacowana liczba drobnoustrojów mieści się w zakresie od 1 do 100 jtk/gram (ml) badanej próbki. Ograniczenie zastosowania niniejszej części normy wynika z faktu dużego zakresu rozrzutu wyników otrzymywanych opisaną metodą. Drugi arkusz tego dokumentu to norma PN-ISO 21528-2:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Enterobacteriaceae*. Część 2. Metoda płytkowa”. W niniejszym arkuszu normy opisano metodę oznaczania liczby Enterobacteriaceae bez etapu przednamnania. Ma ona zastosowanie w badaniu produktów spożywczych i pasz oraz próbek środowiskowych z obszaru produkcji i obrotu żywnością. Warto dodać, że trwają prace nad nowelizacją norm dotyczących Enterobacteriaceae, które wprowadzą m.in. podłoże Glucose OF Medium, służące do badań potwierdzających.

W dniu 9 września 2004 r. Komisja Naukowa do spraw Zagrożeń Biologicznych (Komisja BIOHAZ) Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) wydała opinię na temat czynników zagrożeń typu mikrobiologicznego występujących w odżywkach dla niemowląt i preparatach pochodnych. W opinii stwierdzono, że mikroorganizmami wymagającymi największej uwagi w przypadku odżywek dla niemowląt, preparatów specjalnego przeznaczenia medycznego oraz preparatów pochodnych są *Salmonella* spp. i *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter sakazaki*). Obecność tych czynników chorobotwórczych stanowi znaczne ryzyko, jeśli warunki po przygotowaniu odżywki do spożycia umożliwiają ich namnażanie. Jako

wskaźnik do oceny poziomu ryzyka mogą być wykorzystywane częściej występujące w tych produktach drobnoustroje z rodziny Enterobacteriaceae. Ponadto EFSA zaleciła monitorowanie i badanie obecności Enterobacteriaceae zarówno w środowisku produkcyjnym, jak i w gotowym produkcie. Ponieważ w rodzinie Enterobacteriaceae oprócz gatunków chorobotwórczych występują gatunki saprofityczne, często obecne w środowisku produkcji żywności i nie stanowiące zagrożenia dla zdrowia, rodzina Enterobacteriaceae może być wykorzystywana do rutynowych badań, a w razie wykrycia ich obecności można rozpocząć badania w kierunku wykrywania obecności wybranych patogenów, w tym *Cronobacter sakazakii*. W chwili obecnej do wykrywania obecności tego zaraźka proponuje się normę PKN/ISO/TS 22964:2008 „Mleko i przetwory mleczne. Wykrywanie *Enterobacter sakazaki*”.

W zakresie wykrywania i oznaczania liczby *E. coli* jako drobnoustroju wskaźnikowego poziomu higieny w produkcji żywności może być stosowana norma PN-ISO 7251:2006 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby przypuszczalnych *Escherichia coli*. Metoda najbardziej prawdopodobnej liczby”. W niniejszej normie oznaczanie liczby wykonywane jest z zastosowaniem inkubacji płynnej pożywki w temperaturze 35°C lub 37°C. Kolejną normą metodyczną w tym zakresie jest PN-ISO 16649-1:2004 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby beta-glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli*. Część 1. Metoda płytkowa w temperaturze 44°C z zastosowaniem membran i 5-bromo-4-chloro-3-indolilo-β-D-glukuronidu”. W opisanym metodyce stosuje się pożywkę stałą zawierającą składnik chromogeny w celu wykrycia beta-glukuronidazy oraz specjalne membrany. Drugi arkusz tej normy to PN-ISO 16649-2:2004 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby beta-glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli*. Część 2. Metoda płytkowa w temperaturze 44°C z zastosowaniem 5-bromo-4-chloro-3-indolilo-β-D-glukuronidu”. Do wykrywania patogennych szczepów *E. coli* ma również zastosowanie norma PN-EN ISO 16654:2002 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania *Escherichia coli* 0157”. Opisana w normie metoda badania ma zastosowanie przede wszystkim w badaniu żywności.

Kolejną grupą drobnoustrojów ważną z punktu widzenia oceny stanu higienicznego w produkcji żywności i pasz są pafeczki z grupy coli. Warto dodać, że ten rodzaj badań był w przeszłości dosyć powszechnie prowadzony w produkcji

i obrocie żywnością. Aktualnie do wykrywania i oznaczania liczby bakterii z grupy coli mogą być wykorzystywane dwie normy polskie zharmonizowane z normami ISO. Pierwsza z nich to PN-ISO 4831:2007 „Mikrobiologia żywności i pasz. Ogólne zasady oznaczania liczby bakterii z grupy coli. Metoda najbardziej prawdopodobnej liczby”. W niniejszej normie określono horyzontalną metodę oznaczania liczby bakterii z grupy coli techniką najbardziej prawdopodobnej liczby po inkubacji płynnej pożywki w temperaturze 37°C. Niniejsza norma ma zastosowanie do badania produktów przeznaczonych do spożycia przez ludzi lub zwierzęta. Druga z nich to norma PN-ISO 4832:2007 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby bakterii z grupy coli. Metoda płytkowa”. Norma opisuje metodę oznaczania liczby bakterii z grupy coli poprzez liczenie kolonii wyrosłych na stałych pożywkach po inkubacji w warunkach tlenowych. Norma może być stosowana do badania produktów przeznaczonych do spożycia przez ludzi i zwierzęta.

Stale rosnąca liczba przypadków kampylobakteriozy ludzi wiąże się z licznymi badaniami nad bakteriami z rodzaju *Campylobacter*. Służą do tego obecnie dwie normy, a mianowicie: PN-EN ISO 10272-1:2007 (AP1:2008) „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Campylobacter* spp. Część 1: Metoda wykrywania” oraz PKN-ISO/TS 10272-2:2008 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Campylobacter* spp. Część 2: Metoda liczenia kolonii”.

Ważną grupę drobnoustrojów w higienie żywności i pasz stanowią tzw. beztlenowe laseczki przetrwalnikujące rodzaju *Clostridium*. W obrębie tego rodzaju znajduje się gatunek *Clostridium botulinum* odpowiedzialny za produkcję toksyn botulinowych oraz *Clostridium perfringens* ważny z punktu widzenia toksykoinfekcji zwierząt i zatruc pokarmowych człowieka. Do norm metodycznych stosowanych w tym obszarze należą dwie normy, a mianowicie: PN-ISO 15213:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby bakterii redukujących siarczan (IV) rosnących w warunkach beztlenowych” i PN-EN ISO 7937:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby *Clostridium perfringens*. Metoda płytkowa”. Obydwie normy mają zastosowanie do badania produktów spożywczych i pasz oraz próbek środowiskowych w obszarze produkcji i obrotu żywnością.

Do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów zaleca się obecnie nową normę dwuarkuszową. Pierwszy arkusz to norma

PN-EN ISO 4833-1:2013-12 „Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Część 1. Oznaczanie liczby metodą posiewu zalewowego w temperaturze 30°C”, stosowany, gdy w badanej próbce spodziewana jest niska liczba drobnoustrojów lub są obecne drobnoustroje rosnące zalewowo, co może utrudniać liczenie wyrosłych kolonii. Drugi arkusz to norma PN-EN ISO 4833-2:2013-12 „Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Część 2. Oznaczanie liczby metodą posiewu powierzchniowego w temperaturze 30°C”, która jest przeznaczona do badania próbek zawierających obligatoryjne tlenowce lub liczną populację drobnoustrojów wrażliwych na podwyższoną temperaturę pożywki agarowej. Ponadto ma zastosowanie do badania produktów, których cząstki lub zabarwienie mogą utrudniać liczenie kolonii, a także w sytuacji, gdy potrzebne jest różnicowanie kolonii dla oceny jakości produktu. Normy mają zastosowanie do wszystkich matryc łańcucha żywnościowego.

Od 2009 r. obowiązuje w Polsce dwuczęściowa norma metodyczna do oznaczania grzybów w żywności i paszach, tj. PN-ISO 21527-1:2009 „Mikrobiologia

żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni. Część 1: Metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody wyższej niż 0,95” i PN-ISO 21527-2:2009 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni. Część 2: Metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody niższej lub równej 0,95”. Należy wskazać, że aktywność wody (a_w) w produkcie spożywczym jest definiowana jako ilość wody dostępnej dla drobnoustrojów. Wartość tę przyjęto do celu dokładniejszego określenia zapotrzebowania określonych mikroorganizmów na wodę. Czysta chemicznie woda posiada $a_w=1$. Wraz ze wzrostem stężenia związków rozpuszczalnych aktywność wody spada poniżej wartości 1. Większość drobnoustrojów może rosnąć w środowiskach, których aktywność wody wynosi powyżej 0,95, jednak wzrost niektórych z nich stwierdza się w środowiskach o aktywności wody wynoszącej nawet 0,6. Elementem różnicującym oba arkusze normy jest stosowana pożywka. Wybór metodyki badawczej może tu budzić pewne wątpliwości, wynikające z nieznamomości bądź różnic w a_w różnego rodzaju matryc badawczych trafiających do laboratorium. Ułatwieniem w wyborze metodyki jest załącznik

A zawarty w drugiej części normy, uzupełniony przez autorów artykułu o wartości a_w najczęściej badanych pasz (tab. 1). Pomiar a_w pasz wykonano urządzeniem AquaLab (Decagon Devices, USA). W zależności od stopnia wysuszenia materiałów paszowych i warunków przechowywania a_w może się wahać w dość szerokim zakresie. Przykładem mogą tu być chociażby nasiona kukurydzy, których a_w mieści się w zakresie od 0,5 do 0,8.

Zastosowanie drugiego arkusza normy do badania pasz wyraźnie ogranicza zawarty w niej zapis brzmiący następująco: „Niniejsza część ISO 21527 nie ma zastosowania do produktów w proszku o aktywności wody niższej lub równej 0,60 (zboża w proszku, produkty oleiste, przyprawy, rośliny strączkowe, nasiona, napoje w proszku instant, produkty w proszku dla zwierząt domowych itp.)”. W tej sytuacji metodą oznaczania liczby grzybów w paszach pozostaje metoda opisana w normie PN-R-64791:1994 „Pasze. Wymagania i badania mikrobiologiczne”, gdzie stosowane jest podłoże DRBC. Warto też zaznaczyć, że wspomniana powyżej norma PN-R-64791:1994 jest nadal stosowana do badania mikrobiologicznego pasz, gdzie poza oznaczaniem liczby grzybów stosuje się ją jeszcze do oznaczania liczby bakterii

Tabela 1. Aktywność wody w zależności od rodzaju matrycy

Aktywność wody	Rodzaj matrycy	
	żywność	pasze
>0,95	owoce konserwowe, warzywa konserwowe	-
≥0,95	świeże owoce, owoce konserwowe, warzywa, mięso, kiełbasy gotowane, ryby, mleko, pieczywo, żywność zawierająca do 4% sacharozy lub 7% NaCl	mleko dla zwierząt towarzyszących, kisonka z kukurydzy
≥0,91	sery twarde (cheddar, szwajcarski), wędzone mięso, wędliny (szynka), niektóre koncentraty soków owocowych zawierające 55% sacharozy lub 12% NaCl	sianokisonka
≥0,87	kiełbasy fermentowane (salami), sery suszone, margaryna, ciasta biszkoptowe, żywność zawierająca 65% sacharozy lub 15% NaCl	kisonka z lucerny
≥0,80	większość koncentratów soków owocowych, syropy: czekoladowy, owocowy, klonowy, ciasta o dużej zawartości cukru, ciasta owocowe, mleko zagęszczone, mąka, ryż, szynka wiejska, rośliny strączkowe o zawartości wody od 15% do 17%	nasiona kukurydzy
≥0,75	dżemy, marmolady, owoce lukrowane, owoce kandyzowane, marcepan, ptasie mleczko, miękkie cukierki, ciasta	nasiona kukurydzy
≥0,65	płatki owsiane o zawartości wody 10%, galaretki, melasa, orzechy, suszone owoce, miękkie cukierki (np. krówki), nierafinowany cukier trzcinowy	nasiona soi, śruta sojowa, nasiona kukurydzy, mieszanki paszowe dla zwierząt domowych, sucha karma dla zwierząt towarzyszących
≥0,60	suszone owoce o zawartości wody od 15% do 20%, karmel, toffi, miód, batony zbożowe, żywność granulowana	sucha karma dla zwierząt towarzyszących, zboża i produkty zbożowe, nasiona soi, śruta sojowa, śruta kukurydziana, koncentraty dla zwierząt domowych
≥0,50	makarony, spaghetti o wilgotności 15%-20%, przyprawy o zawartości wody 10%, ziola	nasiona kukurydzy, karma dla ryb, koncentraty dla zwierząt domowych
≥0,40	proszek jajeczny o zawartości wody 5%, nugaty	karma dla ryb
≥0,30	ciastka, krakersy, suchary i pieczywo chrupkie o zawartości wody od 3% do 5%, podstawa sosów w proszku	mączka z krwi drobiowej, mączka drobiowa, mączka z piór, suszona plazma z krwi
≥0,20	-	suszona hemoglobina, mączka drobiowa, mączka z piór
≥0,10	-	mączka z krwi drobiowej
≥0,03	mleko pełne w proszku o zawartości wody od 2% do 3%, zupy w proszku, kawa instant, suszone owoce o wilgotności 5%, płatki kukurydziane o wilgotności 5%	preparaty mlekozastępcze

tenowych mezofilnych i wykrywania bez-
tenowych laseczek przetrwalnikujących.

Do oznaczania liczby drobnoustrojów psychrotrofowych zaleca się obecnie normę PN-ISO 17410:2004 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów psychrotrofowych”. Inkubacja posiewów w tej metodzie prowadzona jest w temperaturze 6,5°C.

W ocenie jakości pasz coraz częściej jest oznaczana liczba bakterii probiotycznych, zarówno w gotowych mieszankach paszowych, jak i dodatkach paszowych zootechnicznych, definiowanych jako stabilizatory flory jelitowej. Do tego celu laboratorium ma do dyspozycji następujące metody normy metodyczne w randze PN, które są zharmonizowane z normami europejskimi (EN):

- PN-EN 15789:2009 „Pasz. Wykrywanie i oznaczanie liczby szczepów drożdży probiotycznych”.
- PN-EN 15788:2009 „Pasz. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Enterococcus (E. faecium) spp.*”.
- PN-EN 15784:2009E „Pasz. Wykrywanie i oznaczanie liczby przypuszczalnych *Bacillus spp.*”.
- PN-EN 15785:2009E „Pasz. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Bifidobacterium spp.*”.
- PN-EN 15786:2009E „Pasz. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Pediococcus spp.*”.
- PN-EN 15787:2009E „Pasz. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Lactobacillus spp.*”.

Do oznaczania liczby *Lactobacillus spp.* w żywności i paszach oraz innych matrycach łańcucha żywnościowego ma zastosowanie norma PN-ISO 15214:2002 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30°C”. W metodzie tej liczba żywych mezofilnych bakterii kwasu mlekowego w analizowanej matrycy badana jest na stałej pożywce MRS inkubowana w temperaturze 30°C przez 72 godz.

Do kontroli czystości środowiska zakładów produkujących żywność i pasze przeznaczoną jest norma PN-ISO 18593:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalne metody pobierania próbek z powierzchni z użyciem płytek kontaktowych i wymazów”. W normie tej pod pojęciem „środowisko” rozumie się wszystko, co ma kontakt z produktem żywnościowym czy paszą i może być źródłem jego pierwotnego i/lub wtórnego zanieczyszczenia (np. materiały, pomieszczenia, personel).

W badaniu parametrów higieny tusz zwierząt rzeźnych w przemyśle mięsnym stosowana jest norma PN-ISO 17604:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Pobieranie próbek z tusz do badań mikrobiologicznych”. W dokumencie tym opisano metody próbobrania w celu wykrycia i oznaczenia liczby mikroorganizmów na powierzchni tusz zwierząt rzeźnych bezpośrednio po uboju. W wyniku kilkuletnich prac została opracowana znowelizowana wersja tej normy, która podlega obecnie głosowaniu w okresie od 16 stycznia 2014 r. do 16 czerwca 2014 r.

Wyrazem dążenia do dalszej optymalizacji wytwarzania i harmonizacji metod kontroli jakości stosowanych pożywek jest ostatnio opracowany oraz poddany procedurze głosowania projekt normy ISO/FDIS 11133-1:2013 „Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media. (Mikrobiologia żywności, pasz i wody. Przygotowywanie, wytwarzanie, przechowywanie i kontrola jakości pożywek). Głosowanie nad niniejszym projektem trwało do 19 lutego 2014 r. i zakończyło się przyjęciem projektu do publikacji. Norma ISO/FDIS 11133 zawiera ogólną terminologię odnoszącą się do kontroli pożywek stosowanych w badaniach mikrobiologicznych żywności, pasz oraz wszystkich rodzajów wody. Ponadto podaje w sposób kompleksowy wytyczne systemu kontroli jakości i wymagań w procesie przygotowywania oraz stosowania pożywek w badaniach laboratoryjnych w zakresie określonym w autorskim opracowaniu (15).

W laboratorium kwestie przygotowania próbek do badań reguluje m.in. norma PN-ISO 6498:2012 „Pasz. Wskazówki do przygotowania próbek do badań”. W niniejszej normie polskiej zharmonizowanej z normą międzynarodową podano metody przygotowania próbek do badań z próbek laboratoryjnych pasz, w tym karmy dla zwierząt domowych.

Reasumując, należy stwierdzić, że wszystkie grupy, rodzaje i gatunki drobnoustrojów chorobotwórczych i wskaźnikowych mogą być wykrywane i/lub oznaczane w żywności, paszach i innych matrycach łańcucha żywnościowego przy zastosowaniu polskich norm (PN), które są na ogół zharmonizowane z normami europejskimi (EN) i/lub normami międzynarodowymi (ISO). Jednocześnie występuje silna tendencja do dalszej międzynarodowej harmonizacji i poszerzenia zakresu stosowania norm z zakresu mikrobiologii łańcucha żywnościowego.

Piśmiennictwo

1. 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. *Official Journal L* 031, 01/02/2002, z późn. zm.
2. Rozporządzenie 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. w sprawie higieny środków spożywczych. *Dz. U. UE L* 139 z 30.04.2004, z późn. zm.
3. Rozporządzenie 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego. *Dz. U. UE L* 139 z 30.04.2004, z późn. zm.
4. Rozporządzenie 854/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące organizacji urzędowych kontroli w odniesieniu do produktów pochodzenia zwierzęcego przeznaczonych do spożycia przez ludzi. *Dz. U. UE L* 139 z 30.04.2004, z późn. zm.
5. Rozporządzenie 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z 29 kwietnia 2004 r. w sprawie kontroli urzędowych prowadzonych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regulami dotyczącymi zdrowia i dobrostanu zwierząt. *Dz. U. UE L* 139 z 30.04.2004, z późn. zm.
6. Dyrektywa 2003/99/EC Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 17 listopada 2003 r. w sprawie monitorowania chorób odzwierzęcych i odzwierzęcych czynników chorobotwórczych, zmieniająca decyzję Rady 90/424/EWG i uchylająca dyrektywę Rady 92/117/EWG. *Official Journal L* 325/31–40, 2003–12-12, z późn. zm.
7. Rozporządzenie (WE) 2160/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 17 listopada 2003 r. w sprawie zwalczania salmonelli i innych określonych odzwierzęcych czynników chorobotwórczych przenoszonych przez żywność. *Official Journal L* 325/1–15, 2003–12-12, z późn. zm.
8. Rozporządzenia Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. *Official Journal L* 338, 22.12.2005 z późn. zm.
9. Rozporządzenie 183/2005 Parlamentu Europejskiego i Rady z 12 stycznia 2005 r. ustanawiające wymagania dotyczące higieny pasz. *Dz. U. UE L* 35 z 8.2.2005, z późn. zm.
10. Projekt rozporządzenia Komisji w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dla pasz (Commission Regulation of on microbiological criteria for feedstuffs) – SANCO/2009/JHR/2009-EN.doc
11. Rozporządzenie Komisji (UE) Nr 142/2011 z dnia 25 lutego 2011 r. w sprawie wykonania rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1069/2009 określającego przepisy sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi, oraz w sprawie wykonania dyrektywy Rady 97/78/WE w odniesieniu do niektórych próbek i przedmiotów zwolnionych z kontroli weterynaryjnych na granicach w myśl tej dyrektywy (*Dz.U. L* 54 z 26.2.2011) z późn. zm.
12. Kwiatek K. Zawadzka E. Bezpieczeństwo żywności. Współpraca międzynarodowa w zakresie mikrobiologii żywności. Aspekty prawne. *Normalizacja* 2005, nr 10, 5–10.
13. Kwiatek K. Zawadzka E. Bezpieczeństwo żywności. Współpraca międzynarodowa w zakresie mikrobiologii żywności. Aspekty normalizacyjne. *Normalizacja* 2005, nr 11, 3–9.
14. Kwiatek K.: Normy metodyczne w urzędowym badaniu mikrobiologicznym żywności i pasz. *Życie Wet.* 2009, **84**, 816–821.
15. Kwiatek K.: Nowe normatywne wytyczne w zakresie wytwarzania i stosowania pożywek mikrobiologicznych. *Życie Wet.* 2013, **88**, 315–317.

Prof. dr hab. K. Kwiatek, Państwowy Instytut Weterynaryjny – PIB w Puławach, ul. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: kwiatekk@piwet.pulawy.pl