

KAUNO TECHNOLOGIJOS UNIVERSITETO MAISTO INSTITUTAS

TVIRTINU:

KTU Maisto instituto direktorius

Antanas Šarkinas

2008 m. lapkričio mėn.d.

**MOKSLINIŲ TYRIMŲ IR TAIKOMOSIOS VEIKLOS PROGRAMA „MAISTO KOKYBĖ
IR SAUGA“**

**MEDŽIAGŲ, UŽTIKRINANČIŲ ŠALTAI RŪKYTŲ ŽUVŲ SAUGĄ, NUSTATYMAS IR JŲ
ANTIMIKROBINIO EFEKTYVUMO TYRIMAS**

2008 M. GALUTINĖ ATASKAITA

Tyrimo vadovas

Raimondas Narkevičius

Kaunas

2008

VYKDYTOJŲ SĄRAŠAS

Dr. Irena Mačionienė,
mikrobiologijos laboratorijos
vyresnioji mokslo darbuotoja

Vadovavo ir atliko mikrobiologinius tyrimus, susistemino tyrimų duomenis, dalyvavo rengiant ataskaitą

Dr. Raimondas Narkevičius,
technologijos laboratorijos
vyresnysis mokslo darbuotojas

Vadovavo darbui, rinko ir analizavo informaciją apie *L. monocytogenes*, žuvų perdirbimo įmonėse naudojamus biocidus, *L. monocytogenes* augimą slopinančius veiksnius, parinko tyrimams naudotas medžiagas, parengė rekomendacijas ir darbo ataskaitą

TURINYS

Įvadas	4 psl.
1. Teorinė ir eksperimentinė dalis	5 psl.
1.1. Tyrimo objektas ir metodai	5 psl.
1.2. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas	6 psl.
Išvados ir rekomendacijos	20 psl.
Literatūra	22 psl.
Priedai	
1 priedas. <i>Listeria monocytogenes</i> prevencijos ir augimo kontrolės šaltai rūkytoje žuvyje rekomendacijos	
2 priedas. Straipsnio „ <i>Listeria monocytogenes</i> dauginimosi prevencija šaltai rūkytoje žuvyje“ projektas	

IVADAS

Šaltai rūkyta žuvis yra vienas iš pavojingiausių, maisto saugos požiūriu, produktų. Patogeniniai mikroorganizmai yra pagrindiniai rizikos veiksniai, kuriuos būtina įvertinti ir eliminuoti šio žuvininkystės produkto gamyboje. *Listeria monocytogenes* yra vienas iš pavojingiausių šaltai rūkytoje žuvyje aptinkamų patogeninių mikroorganizmų. *L. monocytogenes* sukelta listeriozė yra potencialiai mirtinas susirgimas, ypač pavojingas žmonėms su nusilpusia imunine sistema, nėščioms moterims, vaikams. Todėl šio mikroorganizmo kontrolei bei prevencijai šaltai rūkytuose žuvies produktuose turi būti kreipiamas ypatingas dėmesys.

Ant nerūdijančio plieno įrengimų, plastikinių, keramikinių ar stiklo paviršių *L. monocytogenes* gali sudaryti taip vadinamą „bioplėvelę“, dėl ko mikroorganizmas tampa daug atsparesnis įprastinėms plovimo bei dezinfekavimo medžiagoms. Todėl maisto pramonės įmonėse turi būti naudojami patys efektyviausi *L. monocytogenes* inaktyvavimo požiūriu, biocidai (dezinfekavimo medžiagos), įgalinantys užtikrinti gamybos proceso bei produktų saugą. Šio darbo vienas iš tikslų yra iširti žuvų perdirbimo įmonėse naudojamų neautorizuotų biocidų antilisterinį poveikį ir įvertinti, ar jų naudojimas gali užtikrinti dezinfekavimo proceso efektyvumą bei produktų saugą.

Šiuo metu labai sunku pagaminti šaltai rūkytą žuvį, kurioje visiškai nebūtų *L. monocytogenes*, kadangi gamybos procesas nepakankamai efektyvus listericidiniu požiūriu, o mikroorganizmas yra nepaprastai gyvybingas, gali augti gamybos aplinkoje bei pakartotinai užkrėsti produktą. Įvertinant tai, kad šaltai rūkytos žuvies gamybos proceso metu neįmanoma visiškai inaktyvuoti *L. monocytogenes*, būtina kontroliuoti jos augimą produkte, kadangi manoma, jog rizika susirgti listerioze yra labai nedidelė, jei produkte yra mažiau nei 100 KSV/g *L. monocytogenes*. Europos Komisijos Reglamente (EB) Nr.2073/2005 „Dėl mikrobiologinių maisto produktų kriterijų“ šaltai rūkytiems žuvininkystės produktams numatyti griežti *L. monocytogenes* reikalavimai. Jame nurodoma, kad šaltai rūkytuose žuvies produktuose, atkraunant juos iš įmonės–gamintojos, *L. monocytogenes* neturi būti aptinkama 25 g produkto, arba per visą produkto realizacijos laiką šio mikroorganizmo koncentracija turi būti ne didesnė kaip 100 KSV/g produkto. Kad užtikrinti šį kriterijų, būtina ieškoti technologinių sprendimų, įgalinančių inaktyvuoti *L. monocytogenes* arba slopinti šio mikroorganizmo vystymąsi produkto laikymo metu. Tą įmanoma pasiekti technologiniame procese naudojant efektyvias baktericidiniu ar bakteriostatiniu poveikiu pasižyminčias medžiagas. Šio darbo kitas tikslas yra parinkti ir iširti efektyvias medžiagas, užtikrinančias šaltai rūkytos žuvies saugą per visą produkto tinkamumo vartoti laikotarpį.

1. TEORINĖ IR EKSPERIMENTINĖ DALIS

1.1. Tyrimo objektas ir metodai

Darbas buvo vykdomas KTU Maisto instituto mikrobiologijos bei technologijos laboratorijose.

Preparatų antimikrobiniam aktyvumui įvertinti buvo atlikti modeliniai bandymai. Eksperimentams naudota kolekcinė *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 padermė. Listerijų ląstelių suspensijai paruošti kultūra buvo auginama 37 °C temperatūroje 1-2 paras ant mitybos terpės bendram mikroorganizmų skaičiui nustatyti (Plate count agar, *Liofilchem Diagnostici*). Užaugusios listerijų kultūros nuo agaru nuplautos steriliu fiziologiniu tirpalu. Pagal Mc Farland standartą Nr. 0,5 paruoštos ląstelių suspensijos 1ml pilta į ištirpintą ir atvėsintą iki 45°C temperatūros terpę bendram mikroorganizmų skaičiui nustatyti ir gerai išmaišoma. Tokiu būdu paruoštas listerijų ląstelių suspensijos mišinys su terpe buvo pilstomas po 10 ml į 90 mm skersmens Petri lėkštes. Terpei sustingus, joje padarytos 4 įdubos (8 mm skersmens). Į jas pilta po 50 µl paruoštos pagal gamintojo nurodymus atitinkamos koncentracijos plovimo ir dezinfekavimo medžiagos vandeninio tirpalo. Pasėliai buvo inkubuoti 48 h 37 °C temperatūroje. Antibakterinis preparatų poveikis listerijų kultūroms vertintas pagal skaidrių zonų, susidariusių aplink įdubas, skersmenį, išreiškiamą milimetrais. Jei aplink įdubas skaidrios zonos nesusidaro, daroma išvada, kad tirta medžiaga ar koncentracija neturi antibakterinio poveikio.

L. monocytogenes šaltai rūkytuose žuvies produktuose buvo nustatoma pagal LST EN ISO 11290-2:2003/A1:2005 „Maisto ir pašarų mikrobiologija. Monocitogeninių listerijų (*Listeria monocytogenes*) aptikimas ir skaičiavimas. Bendrasis metodas. 2 dalis. Skaičiavimo metodas (ISO 11290-2:1198).“ Pradinė suspensija buvo ruošiama pusės stiprumo Fraserio sultinyje be priedų, po to sėjama į ALOA terpę, inkubuojant 24-48 h 37°C temperatūroje. Būdingų kolonijų patvirtinimui naudotas persėjimas ant TSYEA terpės, inkubuojant 18-24 h 37°C temperatūroje, katalazės reakcija, dažymas Gramo būdu, hemolizės testas, angliavandenių skaidymo testas (ramnozės, ksilozės), CAMPO'o testas.

Naudotos terpės: Fraser broth base CM 0895 (Oxoid), Half Fraser Selective Supplement SR 0166, Fraser Selective Supplement SR 0156 (Oxoid), ALOA (Bifide), *Listeria* selective agar base-Oxford CM0856 (Oxoid).

Tyrimai buvo vykdomi šiomis kryptimis :

1. Literatūrinės informacijos apie biocidus bei bakteriostatiniu poveikiu pasižyminčias medžiagas, jų panaudojimo šaltai rūkytos žuvies saugai užtikrinti analizė.
2. Neautorizuoto biocido antilisterinio poveikio nustatymas ir įvertinimas.
3. Medžiagų, užtikrinančių šaltai rūkytos žuvies saugą, antilisterinio poveikio tyrimas.

Remiantis gautais tyrimų duomenimis bei įvertinus literatūrinę informaciją buvo parengtos rekomendacijos žuvų perdirbimo įmonių specialistams.

1.2. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

Pirmajame darbo etape buvo renkama ir analizuojama informacija apie *Listeria monocytogenes*, biocidus bei bakteriostatiniu poveikiu pasižyminčias medžiagas, jų naudojimą reglamentuojančius normatyvinius dokumentus, mokslinius tyrimus šioje srityje, jų panaudojimą šaltai rūkytos žuvies saugai užtikrinti.

1.2.1. Informacijos apie *Listeria monocytogenes* analizė.

Listeria yra bakterijų gentis, kurią sudaro septynios rūšys: *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, *Listeria innocua*, *Listeria welshimeri*, *Listeria seegligeri*, *Listeria grayi*, *Listeria murrayi*. Iš jų patogeninės yra tik *Listeria monocytogenes*, *Listeria seegligeri* ir *Listeria ivanovii*. Pastaroji yra patogenas atrajojantiems galvijams, tuo tarpu žmonių susirgimai, sukelti *Listeria ivanovii*, kaip ir *Listeria seegligeri*, yra labai reti.

L. monocytogenes yra labai plačiai paplitusi gamtoje. Ji aptinkama žmogaus ir gyvūnų virškinamajame trakte, dirvoje, užterštuose vandenyse, augaluose, maisto žaliavoje bei produktuose (nepasterizuotame piene, sūriuose, valgomuosiuose leduose, daržovėse, žuvies produktuose, mišrainėse, mėsainiuose) [1, 2]. *L. monocytogenes* aptikta mažiausiai 37 žinduolių (kaip laukinių, taip ir naminių) rūšyse, 17 paukščių rūšių, ir, gal būt, keliose žuvų rūšyse. Manoma, kad *L. monocytogenes* gali būti nuo 1 % iki 10 % žmonių žarnyne.

L. monocytogenes rūšies bakterijos yra lazdelės formos gramteigiamos patogeninės bakterijos. Yra žinoma 13 *L. monocytogenes* serotipų: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e ir 7. Serotipai 1/2a, 1/2b ir 4b sudaro 92 % iš žmonių ir gyvūnų išskirtų *L. monocytogenes* bakterijų. 4b yra Europoje, Kanadoje bei JAV dominuojantis serotipas, sukeliantis didžiąją dalį listeriozės susirgimų [3]. *L. monocytogenes* yra fakultatyvinis anaerobas, geriausiai augantis mikroaerofilinėmis sąlygomis, bet gerai auga ir aerobinėmis, ir anaerobinėmis sąlygomis. Tai

stebėtinai atspari bakterija. Minimalus augimą užtikrinantis vandens aktyvumas $a_w = 0,92$. Gali augti terpėje, kurioje NaCl koncentracija 10 %, o apie metus išgyventi terpėje, kurioje NaCl koncentracija 16 % [3, 4]. Priklausomai nuo rūgšties tipo, gali augti terpėje, kurios pH yra nuo 4,0 iki 9,5. Optimali *L. monocytogenes* augimo temperatūra yra 37 °C, bet gali augti esant temperatūrai nuo minus 0,4 iki plus 45 °C. Greitai inaktyvuojama esant aukštesnei nei 70 °C temperatūrai [4].

L. monocytogenes buvo aptikta triušių bei jūros kiaulyčių organizme daugiau kaip prieš 90 metų, tačiau ilgai nebuvo nustatyta, kad tai svarbus patogeninis mikroorganizmas, kuriuo galima užsikrėsti per maisto produktus. Tik po 1980 m. įvykusių kelių didelių listeriozės protrūkių Šiaurės Amerikoje bei Europoje nustatyta maisto produktų, kaip *L. monocytogenes* infekcijos šaltinio, svarba [5].

L. monocytogenes sukelta liga listeriozė yra potencialiai mirtina (mirtingumas 20–30 %) ir labiausiai pavojinga žmonėms su nusilpusia imunine sistema (pagyvenusiems, sergantiems ŽIV, kepenų ciroze ir t. t.), nėščioms moterims, naujagimiams [6, 7]. Listeriozei būdingi peršalimo simptomai, tokie kaip karščiavimas, raumenų skausmai, kartais virškinamojo trakto sutrikimai. Jei infekcija išplinta į centrinę nervų sistemą, širdį, akis, simptomai gali progresuoti ir sukelti stiprius galvos skausmus, kaklo paralyžių, pusiausvyros praradimą, nejudrumą ar konvulsijas. Susirgus listerioze nėštumo metu, ji gali sukelti priešlaikinį gimdymą, vaisiaus žūtį arba liga gali persiduoti kūdikiui. JAV Ligų kontrolės centro duomenimis nėščios moterys listerioze serga 20 kartų dažniau nei kiti asmenys [6]. Reikia pažymėti, kad nėra tiksliai nustatyta, kokia *L. monocytogenes* koncentracija yra pavojinga žmogui ir sukelia susirgimą [8]. Šiuo metu manoma, kad minimali žmogui pavojinga *L. monocytogenes* koncentracija yra nuo 100 iki 1000 KSV/1g ar 1 ml produkto [3, 9, 10].

Dažniausiai listeriozę sukelia paruošti vartoti maisto produktai, kurie:

- 1) palaiko *L. monocytogenes* augimą;
- 2) rekomenduojami laikyti atšaldyti ilgą laiką;
- 3) vartojami papildomai listericidiškai neapdoroti (pvz. nevirti) [6, 7].

Iš jų galima paminėti sūrius, ypač minkštus ir pelėsinius, dešrainius, paštetus, saliami, nepasterizuotą ir pasterizuotą pieną, ledus, sviestą, rūkytus mėsos ir žuvies produktus, daržoves ir mišraines.

Vieni iš pavojingiausių maisto produktų, galinčių sukelti listeriozę, yra šaltai rūkyti maisto produktai, kadangi žaliava dažnai yra užkrėsta *L. monocytogenes*, gamybos procese nėra listericidinių operacijų, o produkto laikymo sąlygos (žema temperatūra bei ilga trukmė) yra tinkamos šiam mikroorganizmui augti. Pavyzdžiui, FAO/PSO apskaičiuotais listeriozės susirgimo

rizikos duomenimis [8], įvertinus produkto vartojimo dažnį, tikimybė susirgti listerioze suvalgius šaltai rūkytos žuvies yra 4,2 karto didesnė nei išgėrus pasterizuoto pieno ir, atitinkamai, 1500 ir 8400 kartų didesnė nei suvalgius ledų ar fermentuotos mėsos. Todėl ypač šaltai rūkytų maisto produktų gamybos procese turi būti kreipiamas labai didelis dėmesys *L. monocytogenes* kontrolei žaliavoje, produkte, šio mikroorganizmo patekimo į produktą būdams nustatyti bei prevencijai.

Vienas pagrindinių *L. monocytogenes* šaltinių maisto pramonės įmonėse yra žaliava. Patekusi su žaliava *L. monocytogenes* gali plačiai paplisti maisto pramonės įmonėje, užteršti įrengimus, gamybos aplinką, sūrymą, darbuotojų pirštines, peilius ir t.t. Reikia pažymėti, kad *L. monocytogenes* ant nerūdijančio plieno įrengimų paviršiaus gali sudaryti taip vadinamą „bioplėvelę“, dėl ko mikroorganizmas tampa daug atsparesnis plovimo bei dezinfekavimo medžiagoms [11]. Net ir perdirbant žaliavą be *L. monocytogenes*, proceso metu ji gali būti užkrėsta šiuo mikroorganizmu. Pagrindinės maisto produktų gamybos proceso operacijos, galinčios turėti įtakos *L. monocytogenes* augti, yra terminis apdorojimas, šaldymas (žaliavos arba produkto), sūdymas ir rūkymas.

Terminis apdorojimas aukštesnėje nei 70 °C temperatūroje paprastai inaktyvuoja *L. monocytogenes*, tačiau, nežiūrint to, šis mikroorganizmas dažnai aptinkamas ir termiškai apdorotuose maisto produktuose. Reikia pažymėti, kad jei produktas yra termiškai apdorojamas neišfasuotas, papildomai produktą apdorojant (pjaustant, smulkinant, fasuojant) yra labai didelė tikimybė, kad jis bus pakartotinai užterštas *L. monocytogenes* nuo įrangos ar gamybos aplinkos.

Sušaldant maisto produktus yra sustabdomas mikroorganizmų augimas, jie gali būti iš dalies inaktyvuojami. Pastarojo proceso eiga priklauso nuo daugelio faktorių, tokių kaip mikroorganizmų rūšis, sušaldymo temperatūra ir greitis, terpė, kurioje mikroorganizmai sušaldomi, ir kt. Žinoma, kad gramteigiamos bakterijos yra atsparesnės sušaldymui nei gramneigiamos bakterijos [12], daugiau mikroorganizmų išlieka gyvybingais greitai sušaldant maisto produktus. Mikroorganizmų jautris šaldymui priklauso ir nuo jų fiziologinio aktyvumo: eksponentinėje augimo fazėje ląstelės yra daug jautresnės šalčio poveikiui nei stacionarioje fazėje [12]. Duomenų apie sušaldymo įtaką *L. monocytogenes* gyvybingumui nėra daug. Nustatyta, kad šaldant *L. monocytogenes* iki minus 18°C buferyje, jos koncentracija sumažėja 10 kartų, kai tuo tarpu šaldant mitybos terpėje sumažėja tik 50 % [12]. Klausimas apie maisto produktų ar žaliavų sušaldymo įtaką *L. monocytogenes* gyvybingumui nėra pakankamai išnagrinėtas.

Kai kurie maisto produktai yra sūdomi, kad NaCl koncentracija produkto vandens fazėje pasiektų nuo 1 iki 5 %, nors, kaip jau minėta anksčiau, tokia NaCl koncentracija nesustabdo *L. monocytogenes* augimo. Padidinus druskos koncentraciją produkto vandens fazėje iki 6 % būtų

galima sustabdyti *L. monocytogenes* augimą 5 °C temperatūroje, tačiau tokia NaCl koncentracija neišvengiamai veiktų produktų skonines savybes.

Žinoma, kad karštas rūkymas inaktyvuoja *L. monocytogenes* [13, 14, 15]. Tuo tarpu, pavyzdžiui, šaltas žuvies rūkymas 20–30 °C temperatūroje sumažina ant žuvies paviršiaus inokuliuotų *L. monocytogenes* ląstelių skaičių 100 kartų, bet inokuliuotos į žuvieną *L. monocytogenes* ląstelės gali augti ir rūkymo proceso metu [16]. Antilisterinį efektą turi kai kurie komerciniai rūkymo tirpalai, nors atskirų preparatų inhibitorinės savybės *L. monocytogenes* atžvilgiu labai skiriasi [17].

Kaip matome, kai kurių maisto produktų, kurių gamybos procese nėra listericidinio apdorojimo operacijos (paprastai tai būna terminis apdorojimas aukštesnėje nei 70 °C temperatūroje), o šaldymo, sūdymo bei rūkymo procesų parametrai neužtikrina visiško *L. monocytogenes* inaktyvavimo.

Net ir gaminant termiškai apdorotus maisto produktus taip pat yra labai didelė tikimybė, kad jie bus pakartotinai užteršti *L. monocytogenes* nuo įrangos ar gamybos aplinkos. Todėl ypatingas dėmesys turi būti kreipiamas įrangos plovimui, jos bei gamybos aplinkos dezinfekavimui. Tam turi būti naudojamos *L. monocytogenes* inaktyvavimo požiūriu efektyviausios plovimo bei dezinfekavimo medžiagos (biocidai).

1.2.2. Informacijos apie neautorizuotą biocidą ANK analizė bei jo poveikio *Listeria monocytogenes* tyrimai

Maisto pramonės įmonėse yra naudojamos labai įvairūs biocidai (dezinfekavimo medžiagos): ketvirtiniai amonio junginiai, peroksidai, alkoholiai, chloro junginiai. Jų poveikio mechanizmas mikroorganizmams yra skirtingas. Vienos iš šių cheminių medžiagų suardo baltymų ir fermentų tiolio jungtis, kitos pažeidžia membranas ir iššaukia baltymų denatūraciją, dar kitos stabdo DNR sintezę bei blokuoja tiolio grupes ar pažeidžia citoplazmos membranų fosfolipidinį sluoksnį. Įvairūs mikroorganizmai yra nevienodai jautrūs minėtų faktorių poveikiui, todėl ir skirtingi biocidai yra nevienodai efektyvūs atskirų mikroorganizmų atžvilgiu. Norint užtikrinti gamybos proceso bei produktų saugą maisto pramonės įmonėse turi būti naudojami efektyviai *L. monocytogenes* inaktyvuojantys biocidai.

Iš cheminių medžiagų dažnai naudojamos chloro turinčios medžiagos (natrio ar kalcio hipochloritai, chloraminai, nauji chloraktyvūs junginiai su paviršinio aktyvumo medžiagomis), glutaraldehidai, peroksiacto rūgštis, vandenilio peroksidas. Antimikrobiškai labai aktyviai veikia

organiniai ketvirtiniai amonio junginiai. Pastarieji dezinfekantai gerai tirpsta vandenyje, neturi kvapo, skonio, mažai toksiški žmogui, nesukelia metalų korozijos, neerzina odos paviršių.

Lietuvos maisto pramonės įmonėse šiuo metu yra naudojamos įvairios, tarp jų ir naujos, importinės bei vietinės gamybos dezinfekavimo medžiagos. Reikia pažymėti, kad šias medžiagas Lietuvoje platina daugelis firmų. Todėl būtina tirti bei palyginti tarpusavyje Lietuvos maisto pramonės įmonėse plačiausiai naudojamų dezinfekavimo medžiagų efektyvumą *Listeria monocytogenes* inaktyvavimo požiūriu ir naudoti tik efektyviausias iš jų.

Dezinfekavimo medžiagų naudojimo maisto pramonės įmonėse galimybes reglamentuoja Europos Parlamento ir Tarybos 1998 m. vasario 16 d. direktyva 98/8/EB dėl biocidų tiekimo į rinką. Šioje direktyvoje nurodoma, kad į rinką gali būti pateikiami tik autorizuoti biocidai. Biocidai direktyvoje apibrėžiami kaip „veikliosios medžiagos ir (ar) preparatai, skirti sunaikinti, sulaikyti, nukentinti, išvengti poveikio arba kitokiu būdu kontroliuoti bet kurį kenksmingą organizmą cheminėmis arba biologinėmis priemonėmis“, o autorizacija – kaip „teisės tiekti biocidą į rinką suteikimas ir jo naudojimo tvarkos nustatymas“. Kai kurios dezinfekavimo medžiagos gali būti gaminamos ir naudojamos betarpiškai įmonėse, jų nepakuojant, nesandėliuojant ir netiekiant į rinką. Tokiu atveju, šių medžiagų nereikia autorizuoti, jos nėra direktyvos 98/8/EB objektas.

Kai kuriose Lietuvos maisto pramonės įmonėse įrangos dezinfekcijai yra naudojama neautorizuota, vietoje gaminama medžiaga, jos gamybos įrangos tiekėjų vadinama anolitu (ANK). Šis biocidas yra gaunamas elektrolizuojant mažos koncentracijos natrio chlorido vandeninius tirpalus specialiame įrenginyje. Kaip nurodoma įrangos tiekėjų pateikiamoje informacijoje bei literatūroje, [18] natrio chlorido tirpalų elektrolizės metu susidaro nestabilūs ar pusiau stabilūs junginiai ir laisvieji radikalai HClO , ClO^{\cdot} , ClO^- , Cl^{\cdot} , HO^{\cdot} , H , H_2O_2 , O_3^{\cdot} , O_2 , O^{\cdot} . Nurodoma, kad biocide ANK aktyvūs oksidatoriai yra ne tik chloro bet ir peroksidiniai junginiai, kurių kompleksinis veikimas užtikrinti didelį baktericidinį efektyvumą [19]. Kaip svarbus šios dezinfekavimo medžiagos pranašumas nurodomas jo pigumas. Vienok, įrangos, skirtos minėto neautorizuoto biocido gamybai, tiekėjų pateiktoje informacijoje nėra duomenų apie jo poveikį *L. monocytogenes*. Tuo tarpu, būtent šis mikroorganizmas yra vienas pavojingiausių patogenų šaltai rūkytų ir kitų žuvies produktų gamyboje. Todėl mes tyrėme neautorizuoto biocido ANK poveikį *Listeria monocytogenes* augimui.

Pirmajame eksperimentinės darbo dalies etape buvo nusatytas ir įvertintas neautorizuoto biocido ANK poveikis *Listeria monocytogenes* augimui. Tyrimai buvo atlikti su dviem skirtingos aktyviojo chloro koncentracijos ANK mėginiais, gautais iš biocido gamybai reikalinga įranga prekiaujančios firmos atstovų. Tirtų mėginių charakteristika pateikiama 1 lentelėje.

1 lentelė

Biocido ANK mėginių fizikiniai – cheminiai rodikliai

Mėginys	Aktyviojo chloro koncentracija mėginyje, % (mg/l),	Oksidacijos – redukcijos potencialas, mv	Aktyvusis rūgštingumas, pH
ANK ₂₀₀	0,02 % (200 mg/l)	790	7,01
ANK ₅₀₀	0,05 % (500 mg/l)	910	6,99

Biocido ANK poveikis *L. monocytogenes* augimui buvo palygintas su pramoniniu būdu gaminamų dezinfekavimo medžiagų „Jėga 2D“ (veiklioji medžiaga natrio hipochloritas) ir „Mėta“ (veiklioji medžiaga benzil-C12-C16-alkildimetilchloridas) poveikiu. Šių medžiagų darbinių tirpalų koncentracijos atitiko jų vartojimo instrukcijose gamintojo nurodomas koncentracijas. Tyrimo rezultatai pateikiami 2 lentelėje.

2 lentelė

Biocidų įtaka *Listeria monocytogenes* kultūros augimui

Eil. Nr.	Biocidas (dezinfekavimo medžiaga)	Darbinio tirpalo koncentracija, proc.	<i>L. monocytogenes</i> slopinimo zonų skersmuo, mm
1.	ANK ₂₀₀	neskiedžiamas	11
2.	ANK ₅₀₀	neskiedžiamas	12,7
3.	Jėga 2D	3,0	19
4.	Mėta	3,0	27,1

Kaip matome iš 2 lentelėje pateikiamų duomenų, neautorizuoto biocido ANK₂₀₀ ir ANK₅₀₀ poveikis *L. monocytogenes* buvo panašus, tačiau jis buvo maždaug dvigubai silpnesnis, nei palyginimui tirtų maisto pramonėje naudojamų dezinfekavimo medžiagų „Jėga 2D“ ir „Mėta“ poveikis.

Reikia pažymėti, kad anksčiau mūsų atliktų tyrimų duomenimis [20], kurie yra pateikiami 3 lentelėje, dalis maisto pramonėje naudojamų ar rekomenduojamų naudoti dezinfekavimo medžiagų pasižymi daug didesniu antilisteriniu poveikiu nei biocidas ANK.

3 lentelė

Maisto pramonėje naudojamų dezinfekavimo medžiagų įtaka *Listeria monocytogenes* kultūros augimui [20]

Eil. Nr.	Plovimo ir dezinfekavimo medžiagos	Darbinių tirpalų koncentracija, proc.	<i>L. monocytogenes</i> slopinimo zonų skersmuo, mm
1.	Divosan Activ	2,0	33,0
		4,0	49,5
2.	Divosan Forte	2,0	47,3
3.	Oxivir	2,5	44,0
		1,0	26,7
4.	Žaibas	0,5	24,6
		1,0	28,0
5.	FARMOSEPT F14	2,0	22,7
		4,0	37,0
6.	F268 AIROL S	0,3	22,8
		1,3	35,0
7.	Calgonit sterizid forte	0,5	26,3

Įvertinę atliktų tyrimų duomenis, galime konstatuoti, kad neautorizuotas biocidas ANK pasižymi antilisteriniu poveikiu, tačiau, jo efektyvumas, lyginant su šiuo metu maisto pramonėje naudojamų ar rekomenduojamų naudoti dezinfekavimo medžiagų efektyvumu, yra daug mažesnis. Todėl žuvies perdirbimo įmonėse šį biocidą būtų tikslinga naudoti tik kartu su autorizuotais biocidais kaip papildomą, sąlyginai nebrangią dezinfekavimo priemonę.

Aukščiau minėti tyrimai buvo atliekami su neautorizuotu biocidu, gautu iš jo gamybai reikalinga įranga prekiaujančios firmos atstovų. Norėdami patikslinti, ar panašiu antilisteriniu efektyvumu pasižymi ir betarpiškai gamybinėms sąlygom pagamintas neautorizuotas biocidas, iš vienos žuvies perdirbimo įmonės buvo gautas jų naudojamas šviežiai pagamintas biocidas ANK₅₀₀. Kaip parodė tyrimai, gamybinėms sąlygom pagaminto neautorizuoto biocido mėginio poveikis *L. monocytogenes* buvo analogiškas anksčiau tirtos firmos atstovų pateikto mėginio poveikiui. Nustatytas *L. monocytogenes* slopinimo zonų skersmuo, atinkamai, buvo 12,5 mm ir 12,7mm.

Dezinfekavimo medžiagų efektyvumas gali keistis jų laikymo metu, todėl mes tyrėme biocido ANK₅₀₀ poveikio *L. monocytogenes* augimui kitimą laikant šį biocidą 5, 15 ir 30 parų tamsoje plastikinėje taroje. Tyrimų duomenys pateikiami 4 lentelėje

4 lentelė

Biocido ANK₅₀₀ poveikio *L. monocytogenes* kitimas laikant

Biocidas	<i>L. monocytogenes</i> slopinimo zonų skersmuo, mm, esant išlaikymo trukmei, paromis			
	1	5	15	30
ANK ₅₀₀	12,7	12,7	12,7	12,7

Kaip matome iš šio tyrimo duomenų, biocidas ANK₅₀₀ buvo stabilus laikant *L. monocytogenes* slopinimo zonų skersmuo po 30 parų buvo toks pat kaip ir šviežiai pagaminto biocido.

Neautorizuoto biocido ANK gamybai reikalingos įrangos tiekėjų rekomendacijose nurodoma, kad yra galimos įvairios šios medžiagos panaudojimo žuvies produktų gamyboje sritys, o biocido tirpalų koncentracija gali svyruoti nuo 3 % iki 100 %. Todėl mes papildomai ištyrėme biocido ANK₅₀₀ tirpalo koncentracijos (praskiedimo laipsnio) įtaką šios medžiagos antilisteriniam efektyvumui. Tyrimo rezultatai pateikiami 5 lentelėje.

5 lentelė

Biocido ANK₅₀₀ tirpalų koncentracijos įtaka *L. monocytogenes* augimui

Biocidas	<i>L. monocytogenes</i> slopinimo zonų skersmuo, mm, esant biocido koncentracijai, %				
	1	3	5	10	100
ANK ₅₀₀	Zonos nesusidarė	Zonos nesusidarė	Zonos nesusidarė	9,7	13,3

Kaipmatome iš 5 lentelės duomenų, esant biocido ANK₅₀₀ tirpalo koncentracijai nuo 1 % iki 5 %, *L. monocytogenes* slopinimo zonos nesusidarė, kas liudija, kad tokios koncentracijos tirpalai nėra efektyvūs antilisteriniu požiūriu. Esant koncentracijai 10 % ir didesnei, jaučiamas pakankamai stiprus chloro junginių kvapas, todėl naudojant tokius tirpalus žuvis ar jos produktai gali turėti pašalinį prieskonį ir kvapą.

Apibendrinant atliktų tyrimų duomenis, galime konstatuoti, kad neautorizuotas biocidas ANK pasižymi antilisteriniu poveikiu, tačiau, jo efektyvumas, lyginant su šiuo metu maisto pramonėje naudojamų ar rekomenduojamų naudoti dezinfekavimo medžiagų efektyvumu, yra daug mažesnis. Skiedžiant biocidą ANK₅₀₀ vandeniu, tirpalai, kurių koncentracija yra nuo 1 % iki 5 %, *L. monocytogenes* augimo neslopina. Šis biocidas yra pakankamai stabilus laikant jį tamsoje. Todėl žuvis perdirbimo įmonėse šį biocidą būtų tikslinga naudoti tik kartu su efektyviais autorizuotais biocidais kaip papildomą, sąlyginai nebrangią dezinfekavimo priemonę.

1.2.3. Medžiagų, užtikrinančių šaltai rūkytos žuvis saugą, antilisterinio poveikio tyrimas

Šaltai rūkytos žuvis gamybos procese nėra listericidinio apdorojimo operacijos (paprastai tai būna terminis apdorojimas aukštesnėje nei 70 °C temperatūroje), o šaldymo, sūdyimo bei rūkymo procesų parametrai neužtikrina visiško *L. monocytogenes* inaktyvavimo. Todėl realiai šiuo metu neįmanoma pagaminti šaltai rūkytos žuvis, kurioje visiškai nebūtų *L. monocytogenes*, ir daugelyje pasaulio šalių (ES, JAV, Australijoje, Naujojoje Zelandijoje, Italijoje, Austrijoje) priimtas reikalavimas, kad 25 g produkto nebūtų aptinkama *L. monocytogenes* (taip vadinamas „nulinės tolerancijos“ kriterijus) praktiškai yra sunkiai įgyvendinamas.

Kadangi šaltai rūkytos žuvis gamybos proceso metu neįmanoma visiškai inaktyvuoti *L. monocytogenes*, būtina kontroliuoti jos augimą produkte, kadangi manoma, jog rizika susirgti listerioze yra labai nedidelė, jei produkte yra mažiau nei 100 KSV/g *L. monocytogenes* [8, 9, 10,]. Prie veiksmų, stabdančių *L. monocytogenes* augimą produktą laikant, galima priskirti produkto sušaldymą, įpakavimą CO₂ atmosferoje, nitritų, laktatų, sorbatų panaudojimą, bakteriocinų bei listericidiniu poveikiu pasižyminčios mikrofloros panaudojimą.

Kaip jau buvo minėta, *L. monocytogenes* neauga žemesnėje nei minus 0,4 °C temperatūroje, todėl produkto sušaldymas yra efektyvus būdas neleisti šiam mikroorganizmui augti produktą laikant.

Nustatyta, kad modifikuotos atmosferos pakuotė, kurioje CO₂ koncentracija yra didelė (nuo 70 iki 100 %), efektyviai slopina *L. monocytogenes* augimą, ypač laikant produktą žemoje

temperatūroje [21, 22]. Toks pakavimo metodas neturi neigiamos įtakos produkto juslinėms savybėms [21]. Todėl, *L. monocytogenes* augimo prevencijos požiūriu, galima pakuoti šaltai rūkytą žuvį CO₂ atmosferoje, nors tai reikalauja investicijų papildomai pakavimo įrangai bei dėl padidėjusios pakuotės apimties padidina produkto transportavimo išlaidas.

JAV šaltai rūkytos žuvies gamyboje leista naudoti nitritus (ne daugiau 0,02 %) bei, kaip GRAS (Generally Recognized as Safe) statusą turinčius maisto priedus, sorbatas. ES šių priedų naudojimas rūkytų žuvies produktų gamyboje neleidžiamas. Nitritai efektyviai slopina *L. monocytogenes* augimą 5 °C temperatūroje, nors 10 °C temperatūroje beveik neturi įtakos šiam procesui [23]. Eksperimentai kultivuojant *L. monocytogenes* mitybos terpėje parodė, kad 5 °C temperatūroje ir sorbatas slopina šio mikroorganizmo augimą esant žemesniam terpės pH [24], nors duomenų apie sorbato įtaką *L. monocytogenes* augimui šaltai rūkytoje žuvyje nėra.

L. monocytogenes augimą slopina kai kurie bakteriocinai – tai daugelio bakterijų rūšių produkuojami biologiškai aktyvūs baltymai, turintys antimikrobinį poveikį. Daugelio bakteriocinų veikimo spektras yra gana siauras, bet kai kurių iš jų, ypač išskirtų iš pienarūgščių bakterijų, antimikrobinio aktyvumo spektras yra platus [25]. Iš antibakterinį poveikį turinčių bakteriocinų reikėtų pažymėti lactociną 705, niziną, pediociną AcH, reuteriną, sakaciną, diverciną ir kt. Kai kurie iš jų (nizinas, divercinas, bakteriocinai, išskirti iš *Carnobacterium spp.*) efektyviai stabdo *L. monocytogenes* augimą šaltai rūkytoje žuvyje [26]. Nustatyta, kad apdorojus pakavimo medžiagu paviršių pieno terpės pagrindu pagamintais nizino bei pediocino milteliais, efektyviai stabdomas *L. monocytogenes* augimas mėsos paviršiuje [27]. Bakteriocinų panaudojimą stabdo tai, kad ES bakteriocinai šiuo metu nėra įtraukti į leistinių šaltai rūkytos žuvies gamyboje maisto priedų sąrašą, jie nėra pakankamai stabilūs, o aktyvumas priklauso nuo daugelio pašalinių faktorių.

Bakteriocinus galima panaudoti *L. monocytogenes* kontrolei maisto produktuose ne pridėdant jų tiesiogiai, bet panaudojant bakteriocinus produkuojančias bakterijas, kurios augdamos išskirtų bakteriocinus betarpiškai produktuose. Šis metodas efektyviai naudojamas *L. monocytogenes* slopinti šaltai rūkytų dešrų gamyboje, kadangi pienarūgštės bakterijos yra naudojamos suintensyvinti dešrų fermentacijos procesus [28, 29]. Šaltai rūkytos žuvies gamyboje *L. monocytogenes* augimą visiškai slopina *Carnobacterium piscicola* ir *Carnobacterium divirgens* bakterijų priedai [30]. Šios bakterijos neturi neigiamos įtakos juslinėms produkto savybėms, kai tuo tarpu panaudojus *Lactobacillus sake* šaltai rūkytoje lašišoje atsiranda stiprus sieros kvapas [31].

L. monocytogenes augimas yra slopinamas rūgščioje aplinkoje (esant mažam terpės pH), todėl kai kurios rūgštys (acto, pieno, citrinų) gali būti panaudojamos šio mikroorganizmo prevencijai mėsos produktų gamyboje [32, 33]. Šaltai rūkytos žuvies gamyboje šių rūgščių panaudojimas nėra

priimtinas, nors *L. monocytogenes* augimą slopina kai kurios šių rūgščių druskos [34]. Reikia pažymėti, kad organinių rūgščių druskų naudojimo klausimai šaltai rūkytos žuvies gamyboje nėra visiškai ištirti, nenustatyta jų įtaka produkto juslinėms savybėms bei technologiniai panaudojimo aspektai.

Apibendrinant šios darbo dalies literatūros analizės duomenis, galima konstatuoti, kad šiuo metu praktiškai neįmanoma pagaminti šaltai rūkytos žuvies, kurioje visiškai nebūtų *L. monocytogenes*, kadangi gamybos procesas nepakankamai efektyvus listericidiniu požiūriu, o mikroorganizmas yra nepaprastai gyvybingas, gali augti gamybos aplinkoje bei pakartotinai užkrėsti produktą. Visuotinai yra manoma, jog minimali žmogui pavojinga *L. monocytogenes* koncentracija produkto vartojimo metu yra 100 KSV/g. Todėl yra būtina kontroliuoti jos augimą produkte, kad per visą produkto galiojimo laiką *L. monocytogenes* koncentracija jame neviršytų 100 KSV/g. Šaltai rūkytų žuvies produktų gamyboje perspektyvūs *L. monocytogenes* augimo slopinimo produkte metodai yra organinių rūgščių druskų panaudojimas ir bakteriocinus produkduojančių bakterijų panaudojimas. Šiuo metu pasaulyje aktyviai tiriami šių faktorių praktiniai panaudojimo aspektai, jų įtaka *L. monocytogenes* inaktyvavimui bei produkto juslinėms savybėms.

Todėl toliau šiame darbe mes tyrėme galimybes slopinti *L. monocytogenes* augimą šaltai rūkytoje žuvyje naudojant kai kurių organinių rūgščių druskas.

Pirmojoje šios tyrimų dalies bandymų serijoje bandymams buvo naudojamas šviežios lašišos faršas. Į paruoštus mėginius, atvėsintus iki 5 °C temperatūros, buvo inokuliuojama *L. monocytogenes* kultūra. Į inokuliuotus bandomuosius mėginius tuojau pat buvo dedamos atitinkamos tiriamosios medžiagos ir juose bei kontroliniame mėginyje (be priedų) buvo nustatoma *L. monocytogenes* koncentracija. Mėginiai buvo laikomi + 5 °C ir analizuojami po 5 ir 10 parų.

Pirmojoje bandymų serijoje buvo tiriami trys mėginiai: kontrolinis, be antimikrobinių medžiagų priedo ir du bandomieji. Į vieną bandomąjį mėginį (toliau vadinamą „mėginys Nr. 1“) buvo pridedama 3 % aukščiau minėto biocido ANK₅₀₀. Ši medžiaga buvo tiriama dėl tos priežasties, kad, prisilaikant šio biocido vartojimo žuvies perdirbimo įmonėje rekomendacijų, į galutinį produktą gali patekti ir tam tikras kiekis paties biocido, kuris, gal būt, galėtų slopinti *L. monocytogenes* augimą. Į kitą bandomąjį mėginį (toliau vadinamą „mėginys Nr. 2“) buvo pridedama 3 % organinės rūgšties natrio druskos (natrio laktato). Ši medžiaga rekomenduojama naudoti *L. monocytogenes* augimo prevencijai mėsos produktuose.

Tyrimo rezultatai pateikiami 6 lentelėje.

Baktericidiniu ar bakteriostatinu poveikiu pasižyminčių medžiagų įtaka *L. monocytogenes* augimui žalios žuvies farše

Eil. Nr.	Mėginys	<i>L. monocytogenes</i> koncentracija, KSV/g, išlaikius mėginį + 5 °C temperatūroje, paromis		
		1	5	10
1	Kontrolinis	6,4*10 ⁶	6,0*10 ⁸	1,0*10 ⁸
2	Mėginys Nr. 1	6,5*10 ⁶	9,5*10 ⁷	9,9*10 ⁷
3.	Mėginys Nr. 2	5,5*10 ⁶	1,3*10 ⁷	1,5*10 ⁶

Kaip matome iš aukščiau pateiktų duomenų, pradinis tiriamųjų medžiagų įvedimas į mėginį neturėjo įtakos *L. monocytogenes* koncentracijai jame ir buvo praktiškai vienodas tiek kontroliniame, tiek ir bandomuosiuose mėginiuose. Išlaikius mėginius + 5 °C temperatūroje 5 paras, visuose mėginiuose *L. monocytogenes* koncentracija padidėjo, tačiau mažiausia ji buvo mėginyje Nr. 2. Tuo tarpu mėginyje Nr. 1 ji buvo artima kontroliniam. Analogiška tendencija pastebėta ir išlaikius mėginius + 5 °C temperatūroje 10 parų. Kaip matome analizuodami šio tyrimo duomenis, biocido ANK priedas (mėginys Nr. 1) praktiškai neturėjo įtakos *L. monocytogenes* augimui inokuliuotame šviežios lašišos farše. Tuo tarpu, organinės rūgšties natrio druskos priedas (mėginys Nr. 1), lyginant su kontrole, ženkliai sumažino *L. monocytogenes* augimą, nors visiškai jo ir nesustabdė. Tai, tikriausiai, nulėmė aukšta pradinė *L. monocytogenes* koncentracija inokuliuotame mėginyje (10⁶ KSV/g). Todėl antroje bandymų serijoje į mėginius buvo inokuliuojama mažesnis *L. monocytogenes* kultūros kiekis (10⁶ KSV/g).

Reikia pažymėti, kad pirmojoje šios tyrimų dalies bandymų serijoje buvo atliktas papildomas preliminarinis tyrimas, siekiant nustatyti, ar turi įtakos *L. monocytogenes* koncentracijai mėginyje jo sušaldymas. Kaip parodė šio tyrimo rezultatai, sušaldymas ženkliai sumažino *L. monocytogenes* koncentraciją inokuliuotame mėginyje. Todėl būtina tęsti tyrimus ir nustatyti šaldymo įtaką *L. monocytogenes* gyvybingumui bei šios technologinės operacijos, kaip *L. monocytogenes* eliminavimo iš produkto veiksnio, perspektyvumą.

Antrojoje šios tyrimų dalies bandymų serijoje bandymams buvo naudojamas rūkytos lašišos faršas. Į paruoštus mėginius, atvėsintus iki 5 °C temperatūros, buvo inokuliuojama *L. monocytogenes* kultūra. Į inokuliuotus bandomuosius mėginius tuojau pat buvo dedamos

atitinkamos tiriamosios medžiagos ir juose bei kontroliniame mėginyje (be priedų) buvo nustatoma *L. monocytogenes* koncentracija. Mėginiai buvo laikomi + 5 °C ir analizuojami po 5, 10, 15, 20, ir 25 parų.

Šioje bandymų serijoje buvo tiriami keturi mėginiai: kontrolinis, be antimikrobinų medžiagų priedo, ir trys bandomieji. Į vieną bandomąjį mėginį (toliau vadinamą „mėginys Nr. 1“) buvo pridėdama 3 % aukščiau minėto biocido ANK₅₀₀. Į kitą bandomąjį mėginį (toliau vadinamą „mėginys Nr. 2“) buvo pridėdama 3 % organinės rūgšties natrio druskos. Į trečią bandomąjį mėginį (toliau vadinamą „mėginys Nr. 3“) buvo pridėdama 3 % organinių rūgščių natrio druskų mišinio. Tyrimo rezultatai pateikiami 7 lentelėje.

7 lentelė

Baktericidiniu ar bakteriostatiniu poveikiu pasižyminčių medžiagų įtaka *L. monocytogenes* augimui rūkytoje žuvyje

Eil. Nr.	Mėginys	<i>L. monocytogenes</i> koncentracija, KSV/g, išlaikius mėginį + 5 °C temperatūroje, paromis					
		1	5	10	15	20	
1	Kontrolinis	2,9*10 ⁴	2,9*10 ⁴	1,6*10 ⁵	3,5*10 ⁵	5,8*10 ⁵	
2	Mėginys Nr. 1	2,6*10 ⁴	7,9*10 ⁴	5,5*10 ⁵	1,2*10 ⁵	1,7*10 ⁷	
3.	Mėginys Nr. 2	2,4*10 ⁴	1,4*10 ⁴	6,3*10 ³	7,1*10 ³	2,0*10 ³	
4.	Mėginys Nr. 3	2,3*10 ⁴	1,0*10 ⁴	7,3*10 ³	3,6*10 ³	2,4*10 ³	

Kaip matome iš aukščiau pateiktų duomenų, pradinis tiriamųjų medžiagų įvedimas į mėginį praktiškai neturėjo įtakos *L. monocytogenes* koncentracijai jame ir bandomuosiuose mėginiuose mažai skyrėsi nuo kontrolinio. Išlaikius mėginius + 5 °C temperatūroje 5 paras, mėginyje Nr. 1 *L. monocytogenes* koncentracija netgi padidėjo, lyginant su kontroliniu. Tuo tarpu mėginiuose Nr. 2 ir Nr. 3 *L. monocytogenes* koncentracija sumažėjo, kas liudija apie baktericidinį į mėginius pridėtų medžiagų poveikį. Ženklesnis *L. monocytogenes* koncentracijos sumažėjimas nustatytas mėginyje Nr. 3. Analogiška tendencija išliko ir išlaikius mėginius + 5 °C temperatūroje ilgesnį laiką (10 - 20 parų). Taigi, galime konstatuoti, kad efektyviai *L. monocytogenes* augimą

inokuliuotame šiuo mikroorganizmu šaltai rūkytos žuvies farše stabdo kaip atskira organinės rūgšties natrio druska, taip ir organinių rūgščių natrio druskų mišinys.

Juslinės šaltai rūkytos žuvies su šių medžiagų priedu savybės mažai skyrėsi nuo kontrolės. Todėl tikslinga ir rekomenduojama šias medžiagas naudoti *L. monocytogenes* augimo šaltai rūkytoje žuvyje prevencijai

IŠVADOS IR REKOMENDACIJOS

1. *Listeria monocytogenes* yra vienas iš pavojingiausių šaltai rūkytoje žuvyje aptinkamų patogeninių mikroorganizmų, jos sukelta listeriozė yra potencialiai mirtinas susirgimas. Todėl šio mikroorganizmo kontrolei bei prevencijai šaltai rūkytuose žuvies produktuose turi būti kreipiamas ypatingas dėmesys.
2. Šiuo metu realiai nėra įmanoma užtikrinti, kad pagamintame šaltai rūkytos žuvies produkte nebus *L. monocytogenes*, nes gamybos procese nėra listericidinių operacijų, o mikroorganizmas yra visuotinai paplitęs, stebėtinai atsparus ir gali užkrėsti produktą pakartotinai. Geros higienos praktikos ir RVASVT sistemos taikymas įgalina tik minimizuoti šio mikroorganizmo koncentraciją produkte. Todėl įmonėms gamintojoms rekomenduojama užtikrinti sąlygas, kad *L. monocytogenes* nesidaugintų per visą produkto tinkamumo vartoti laikotarpį, nes yra manoma, kad žmonių sveikatai pavojinga šio mikroorganizmo koncentracija yra daugiau kaip 100 ksv/g produkto.
3. Ištirta organinių rūgščių druskų priedų įtaka *L. monocytogenes* augimui šaltai rūkytoje žuvyje.
4. Nustatyta, kad efektyviai *L. monocytogenes* augimą inokuliuotame šiuo mikroorganizmu žuvies farše stabdo kaip atskira organinės rūgšties natrio druska, taip ir organinių rūgščių natrio druskų mišinys.
5. Tirtame koncentracijų intervale (iki 3 %) aukščiau minėtų organinių rūgščių natrio druskų priedas neturi neigiamos įtakos šaltai rūkytos žuvies juslinėms charakteristikoms.
6. Gauti preliminariniai duomenys, kad *L. monocytogenes* koncentraciją inokuliuotame šiuo mikroorganizmu žuvies farše ženkliai sumažina jo sušaldymas. Šaldymo (kaip žaliavos, taip ir produkto) operacija gali būti ir yra plačiai taikoma gaminant šaltai rūkytos žuvies produktus. Todėl būtina tęsti tyrimus ir nustatyti šaldymo įtaką *L. monocytogenes* gyvybingumui bei šios technologinės operacijos, kaip *L. monocytogenes* eliminavimo iš produkto veiksnio, perspektyvumą.
7. Ištirtas neautorizuoto biocido ANK, gaminamo elektrolizuojant mažos koncentracijos natrio chlorido vandeninius tirpalus, poveikis *L. monocytogenes* augimui.
8. Nustatyta, kad aukščiau minėtas biocidas pasižymi antilisteriniu poveikiu, tačiau, jo efektyvumas, lyginant su daugeliu šiuo metu maisto pramonėje naudojamų ar rekomenduojamų naudoti dezinfekavimo medžiagų efektyvumu, yra daug mažesnis.

9. Neautorizuotas biocidas ANK yra pakankamai stabilus laikant jį tamsoje. *L. monocytogenes* slopinimo zonų skersmuo po 30 parų išlaikymo buvo toks pat kaip ir šviežiai pagaminto biocido.
10. Nustatyta, kad neautorizuoto biocido ANK tirpalai, kurių koncentracija yra nuo 1 % iki 5 %, *L. monocytogenes* augimo neslopina.
11. Žuvies perdirbimo įmonėse šį biocidą būtų tikslinga naudoti tik kartu su efektyviais autorizuotais biocidais kaip papildomą, sąlyginai nebrangią dezinfekavimo priemonę.
12. Gautų tyrimų rezultatų, ES direktyvinių dokumentų bei literatūrinės informacijos pagrindu parengtos *L. monocytogenes* kontrolės bei prevencijos šaltai rūkytuose žuvies produktuose rekomendacijos.
13. Būtina tęsti tyrimus antimikrobinių medžiagų panaudojimo šaltai rūkytų žuvies produktų saugai užtikrinti srityje ir nustatyti technologinius parametrus, padedančius užtikrinti šaltai rūkytų žuvies produktų saugą, produktą laikant aukštesnėje nei 0 °C temperatūroje.

4. LITERATŪRA

1. Lovett J. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products// Journal of Association of Analytical Chemists. 1988. Vol. 71. P. 658–660.
2. Rorvik L. M., Indestad M. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway// International Journal of Food Microbiology. 1991. Vol. 13. P. 97–104.
3. Farber J. M., Peterkin P. I. *Listeria monocytogenes*// Lund B. M, Baird-Parker T. C, Gould G. W. The Microbiological Safety and Quality of Foods. Gaithersburg (MD): Aspen, 2000. P. 1178–1232.
4. Bacterial pathogen growth and inactivation// Fish and fisheries products hazards and controls guidance. 3rd ed. June 2001. U. S. Food and Drug Administration.
5. Broome C. V., Gellin B., Schwatz B. Epidemiology of listeriosis in the United States// Miller A. J., Smith J. L., Somkuti G. A. Foodborne Listeriosis. Elsevier Science Pub., New York, 1990. P. 61–65.
6. Pinner R. W. at all. Role of foods in sporadic listeriosis// Journal of the American Medical Association. 1992. Vol. 267. P. 2046–2050.
7. Nrung B., Andersen J. K., Schlundt J. Incidence and control of *Listeria monocytogenes* in foods. Denmark// International Journal of Food Microbiology. 1999. Vol. 53. P. 195–203.
8. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: interpretative summary. Microbiological risk assessment series, No. 4. WHO/FAO, 2004. 78 p.
9. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*. European Commission, Health and Consumer Protection Directorate-General (SANCO). 23 September 1999.
10. Quantitative assesment of the relative risk to public health from food-borne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. FDA/FSIS (U. S. Food and Drug Administration/ USDA Food Safety and Inspection Agency). 2003. www.foodsafety.gov/~dms/lmr2-toc.html.
11. Hood S. K., Zottola E. A. Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems// International Journal of Food Microbiology. 1997. Vol. 37. P. 145–153.
12. El-Kest S. E., Yousef A. E., Marth E. H. Fate of *Listeria monocytogenes* during freezing and frozen storage// Journal of Food Science. 1991. Vol. 56(4). P. 1068–1071.

13. Nedziela J. C. et al. Control of *Listeria monocytogenes* in salmon-antimicrobial effect of salting, smoking and specific smoke compounds// *Lebensmittel Wissenschaft Technol.* 1998. Vol. 31(2). P. 155–161.
14. Poysky F. T. et al. Inactivation of *Listeria monocytogenes* on hot smoked salmon by the interaction of heat and smoke or liquid smoke// *Journal of Food Protection.* 1997. Vol. 60(6). P. 649–654.
15. Ben Embarek P. K., Huss H. H. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in vacuum packaged pasteurized fish fillets// *International Journal of Food Microbiology.* 1993. Vol. 20. P. 85–95.
16. Eklund M. W., Poysky F. T., Paranjpye R. N., Lashbrook L. C., Peterson M. E., Pelroy G. A. Incidence and sources of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked fishery products and processing plants// *Journal of Food Protection.* 1995. Vol. 58(5). P. 502–508.
17. Sunen E. Minimum inhibitory concentration of smoke wood extracts against spoilage and pathogenic microorganisms associated with foods// *Letters of Applied Microbiology.* 1998. Vol. 27. P. 45–48.
18. Бахира В.М. Электрохимическая активация: история, состояние, перспективы. Москва, 1999. 253 с.
19. Паничева С.А. Новые технологии дезинфекции и стерилизации сложных изделий медицинского назначения. - Москва: ВНИИИМТ, 1997. 122 с.
20. Šalomskienė J., Mačionienė I., Narkevičius R. Plovimo ir dezinfekavimo medžiagų poveikis *Listeria monocytogenes* augimui // „Maisto chemija ir technologija“. Mokslo darbai. 2008, 42 t., Nr. 1, p. 91-96.
21. Nilsson L., Huss H. H., Gram L. Inhibition of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon by nisin and carbon dioxide atmosphere// *International Journal of Food Microbiology.* 1997. Vol. 38. P. 217–227.
22. Philips C. A. Review: Modified atmosphere packing and its effects on the microbiological quality and safety of produce// *International Journal of Food Science and Technology.* 1996. Vol. 31(6). P. 463–479.
23. Pelroy G. A., Peterson M. E., Paranjpye R., Almond J., Eklund M. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-process (smoked) salmon by sodium nitrite and packaging method// *Journal of Food Protection.* 1994. Vol. 57(2). P. 114–119.
24. Moir C. J., Eyles M. J. Inhibition, injury and inactivation of four psychrotrophic foodborne bacteria by the preservatives methyl p-hydroxybenzoate and potassium sorbate// *Journal of Food Protection.* 1992. Vol. 55(5). P. 360–366.

25. Barefoot S. F., Nettles C. G. Antibiosis revisited: Bacteriocins produced by dairy starters cultures// *Journal of Dairy Science*. 1993. Vol. 76. P. 2366–2379.
26. Nilsson L., Chen Y., Chikindas M. L., Huss H. H., Gram L., Montville T. J. Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*// *Applied Environmental Microbiology*. 2000. Vol. 6(2). P. 769–774.
27. Ming X. T., Weber G. H., Ayres J. W., Sandine W. E. Bacteriocins applied to food packing materials to inhibit *Listeria monocytogenes* on meats// *Journal of Food Science*. 1997. Vol. 62(2). P. 413–415.
28. Schilinger U., Kaya M., Lucke F. K. Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*// *Journal of Applied Bacteriology*. 1981. Vol. 70(6). P. 473–478.
29. Vilani F. et al. Portal characterization of an antagonistic substance produced by *Staphylococcus xylosus* IE and determination of the effectiveness of the producer strain to inhibit *Listeria monocytogenes* in Italian sausages// *Food Microbiology*. 1997. Vol. 14(6). P. 555–566.
30. Jeppesen V., Huss H. H. Antagonistic activity of two strains of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5 °C// *International Journal of Food Microbiology*. 1993. Vol. 19. P. 179–186.
31. Duffes F., Corre C., Leroi F., Dousset X., Boyaval P. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by in situ produced and semipurified bacteriocins on *Carnobacterium* spp. on vacuum-packed, refrigerated cold-smoked salmon. // *Journal of Food Protection*. 1999. Vol. 62(12). P. 1394–1403.
32. Vasseur C., Baverel L., Hebraud M., Labadie J. Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on the growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*// *Journal of Applied Microbiology*. 1999. Vol. 86(3). P. 469–476.
33. Podolack R. K., Zayas J. F., Kastner C. L., Fung D.Y.C. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157-H7 on beef by application of organic acids// *Journal of Food Protection*. 1996. Vol. 59(4). P. 370–373.

34. Pelroy G. A., Peterson M. E., Holland P. J., Eklund M. W. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-processed (smoked) salmon by sodium lactate// Journal of Food Protection. 1994. Vol. 57(2). P. 108–113.

SUDERINTA:

Maisto ūkio tyrimų priežiūros komisijos
pirmininkė

Nijolė Maksimavičienė

2008 m.mėn.d.

TVIRTINU:

KTU Maisto instituto direktorius

Antanas Šarkinas

2008 m. lapkričio mėn. 18 d.

***Listeria monocytogenes* kontrolės bei prevencijos šaltai rūkytuose žuvies produktuose rekomendacijos**

1. *Listeria monocytogenes* yra vienas iš pavojingiausių šaltai rūkytoje žuvyje aptinkamų patogeninių mikroorganizmų, jos sukelta listeriozė yra potencialiai mirtinas susirgimas. Todėl šio mikroorganizmo kontrolei bei prevencijai šaltai rūkytuose žuvies produktuose turi būti kreipiamas ypatingas dėmesys.
2. Šiuo metu realiai nėra įmanoma užtikrinti, kad pagamintame šaltai rūkytos žuvies produkte nebus *L. monocytogenes*, nes gamybos procese nėra listericidinių operacijų, o mikroorganizmas yra visuotinai paplitęs, stebėtinai atsparus ir gali užkrėsti produktą pakartotinai. Geros higienos praktikos ir RVASVT sistemos taikymas įgalina tik minimizuoti šio mikroorganizmo koncentraciją produkte. Todėl įmonėms gamintojoms rekomenduojama užtikrinti sąlygas, kad *L. monocytogenes* nesidaugintų per visą produkto tinkamumo vartoti laikotarpį, nes yra manoma, kad žmonių sveikatai pavojinga šio mikroorganizmo koncentracija yra daugiau kaip 100 ksv/g produkto.
3. Efektyviai *L. monocytogenes* augimą šaltai rūkytoje žuvyje stabdo organinių rūgščių natrio druskos (natrio laktatas, natrio diacetatas) bei jų mišiniai. Rekomenduojama šias medžiagas naudoti *L. monocytogenes* augimo šaltai rūkytoje žuvyje prevencijai.
4. Įrengimų bei gamybos aplinkos dezinfekavimui rekomenduojama naudoti dezinfekavimo medžiagas, kurių efektyvumas *L. monocytogenes* atžvilgiu yra patvirtintas eksperimentiniu būdu.
5. Parenkant dezinfekavimo medžiagas, būtina įvertinti, kad efektyviausiai *L. monocytogenes* augimą slopina preparatai, kurių veikliosios medžiagos yra peroksiacto rūgštis, peroksidai arba

ketvirtiniai amonio junginiai. Mažiausią antibakterinį poveikį listerijoms turi dezinfekavimo preparatai, kurių veikliosios medžiagos yra alkoholiai.

6. Neautorizuotas biocidas ANK pasižymi antilisteriniu poveikiu, tačiau, jo efektyvumas, lyginant su daugeliu šiuo metu maisto pramonėje naudojamų ar rekomenduojamų naudoti dezinfekavimo medžiagų efektyvumu, yra daug mažesnis.
7. Žuvies perdirbimo įmonėse biocidą ANK būtų tikslinga naudoti tik kartu su efektyviais autorizuotais biocidais kaip papildomą, sąlyginai nebrangią dezinfekavimo priemonę.

Parengė

dr. Raimondas Narkevičius

***Listeria monocytogenes* dauginimosi prevencija šaltai rūkytoje žuvyje**

Dr. Raimondas Narkevičius, KTU Maisto institutas

Listeria monocytogenes yra labai plačiai paplitęs gamtoje mikroorganizmas. Ji aptinkama žmogaus ir gyvūnų virškinamajame trakte, dirvoje, užterštuose vandenyse, augaluose, įvairiose maisto žaliavose bei produktuose. *L. monocytogenes* yra vienas iš pavojingiausių maisto produktuose galinčių būti mikroorganizmų. *L. monocytogenes* sukelta liga listeriozė yra potencialiai mirtina (mirtingumas 20–30 %) ir labiausiai pavojinga žmonėms su nusilpusia imunine sistema (pagyvenusiems, sergantiems ŽIV, kepenų ciroze ir t. t.), nėščioms moterims, naujagimiams, vaikams. Listeriozė sudaro tik apie 0.02 % maisto sukeltų susirgimų, tačiau iššaukia net 28 % apsinuodijimo maistu sukeltų mirčių.

Reikia pažymėti, kad nėra tiksliai nustatyta, koks *L. monocytogenes* skaičius yra pavojingas žmogui ir sukelia susirgimą. Šiuo metu manoma, kad minimalus žmogui pavojingas *L. monocytogenes* skaičius yra nuo 100 iki 1000 KSV/1g ar 1 ml produkto.

Dažniausiai listeriozė sukelia paruošti vartoti maisto produktai, kurie:

- 4) palaiko *L. monocytogenes* augimą;
- 5) rekomenduojami laikyti atšaldyti ilgą laiką;
- 6) vartojami papildomai listericidiskai neapdoroti (pvz. nevirti).

Pavojingiausiems, dažniausiai listeriozė sukeliantiems produktams priskiriami rūkyti žuvies ir mėsos produktai, daržovės ir mišrainės, kulinariniai mėsos gaminiai, dešrainiai, nepasterizuotas ir pasterizuotas pienas, sūriai (ypač minkšti ir pelėsiniai). Paskutinis listeriozės protrūkis Kanadoje (2008 m. liepos - rugsėjo mėn.), kurio metu mirė 20 žmonių, buvo sukeltas delikatesinių mėsos produktų.

Listeria monocytogenes yra fakultatyvinis anaerobas, geriausiai augantis mikroaerofilinėmis sąlygomis, bet gerai auga ir aerobinėmis, ir anaerobinėmis sąlygomis. Tai stebėtinai atspari bakterija. Minimalus augimą užtikrinantis vandens aktyvumas $a_w=0,92$. Gali augti terpėje, kurioje NaCl koncentracija 10 %, o apie metus išgyventi terpėje, kurioje NaCl koncentracija – 16 %. Priklausomai nuo rūgšties tipo, gali augti terpėje, kurios pH yra nuo 4,0 iki 9,5. Optimali *L. monocytogenes* augimo temperatūra yra 37 °C, bet gali augti esant temperatūrai nuo minus 0,4 iki

plius 45 °C. Todėl net ir mažai užterštus maisto produktus laikant šaldytuve, *L. monocytogenes* gali dauginis ir jos koncentracija gali pasidaryti pavojinga žmonių sveikatai.

Vienas pagrindinių *L. monocytogenes* šaltinių maisto pramonės įmonėse yra žaliava. Patekusi su žaliava, *L. monocytogenes* gali paplisti maisto pramonės įmonėje, užteršti įrenginius, gamybos aplinką, sūrymą, darbuotojų pirštines, peilius ir t. t. Reikia pažymėti, kad *L. monocytogenes* ant nerūdijančio plieno įrenginių, plastikinių ar keramikinių paviršių gali sudaryti taip vadinamą „bioplėvelę“, dėl ko mikroorganizmas tampa daug atsparesnis plovimo bei dezinfekavimo medžiagoms. *L. monocytogenes* labai dažnai yra aptinkama gamybos aplinkoje ir įrengimuose, todėl net ir perdirbant žaliavą be *L. monocytogenes*, paties gamybos proceso metu ji gali būti užkrėsta šiuo mikroorganizmu. Todėl, norint užtikrinti gaminamos produkcijos saugą, yra būtina kontroliuoti *L. monocytogenes* ne tik gatavuose maisto produktuose, bet ir gamybos aplinkoje bei įrengimuose. Tie patys *L. monocytogenes* atskiri sub – tipai daugelio gamyklų aplinkoje yra aptinkami metai iš metų, jie gali būti pastovus produkto užkratas. Todėl ypač svarbu nustatyti galimas nišas, kuriose įmonėje taikomas plovimo ir dezinfekcijos režimas yra nepakankamai efektyvus ir kurios gali tapti *L. monocytogenes* taršos šaltiniu įmonėje. Technologinių įrengimų bei gamybos aplinkos dezinfekcijai žuvų perdirbimo įmonėse turi būti naudojamos efektyviausios *Listeria monocytogenes* inaktyvavimo požiūriu plovimo ir dezinfekavimo medžiagos. Parenkant dezinfekavimo medžiagas, būtina įvertinti tai, kad efektyviausiai *L. monocytogenes* augimą slopina preparatai, kurių veikliosios medžiagos yra peroksiacto rūgštis, peroksidai arba ketvirtiniai amonio junginiai. Mažiausią antibakterinį poveikį listerijoms turi dezinfekavimo preparatai, kurių veikliosios medžiagos yra alkoholiai.

Atlikus tyrimus KTU Maisto institute nustatyta, kad neautorizuoto biocido ANK, gaminamo elektrolizuojant mažos koncentracijos natrio chlorido vandeninius tirpalus, poveikis *L. monocytogenes* augimui nėra didelis. Aukščiau minėtas biocidas pasižymi antilisteriniu poveikiu, tačiau, jo efektyvumas, lyginant su daugeliu šiuo metu maisto pramonėje naudojamų ar rekomenduojamų naudoti dezinfekavimo medžiagų efektyvumu, yra daug mažesnis. Žuvų perdirbimo įmonėse šį biocidą būtų tikslinga naudoti tik kartu su efektyviais autorizuotais biocidais kaip papildomą, sąlyginai nebrangią dezinfekavimo priemonę.

L. monocytogenes kontrolės ir prevencijos klausimai tapo labai aktualūs įsigaliojus Komisijos Reglamentui (EB) No 2073/2005 „Dėl mikrobiologinių maisto produktų kriterijų“, kur keliami griežti *L. monocytogenes* kontrolės maisto produktuose ir maisto pramonės įmonėse reikalavimai. Šiame dokumente reglamentuojama *L. monocytogenes* paruoštuose vartoti maisto produktuose. Be to šiame reglamente nurodoma:

„Maisto verslo operatoriams, gaminantiems gatavus maisto produktus, kurie gali kelti *Listeria monocytogenes* riziką visuomenės sveikatai, *Listeria monocytogenes* mėginių ėmimas iš perdirbimo vietų ir įrangos yra jų mėginių ėmimo schemos dalis.“Taigi, paruoštus vartoti maisto produktus gaminančiose įmonėse gamybos aplinkos ir įrangos kontrolė dėl *L. monocytogenes* yra būtina.

Šiuo metu praktiškai neįmanoma pagaminti šaltai rūkytos žuvies, kurioje visiškai nebūtų *L. monocytogenes*, kadangi gamybos procesas nepakankamai efektyvus listericidiniu požiūriu, o mikroorganizmas yra nepaprastai gyvybingas, gali augti gamybos aplinkoje bei pakartotinai užkrėsti produktą. Visuotinai yra manoma, jog minimali žmogui pavojinga *L. monocytogenes* koncentracija produkto vartojimo metu yra 100 KSV/g. Todėl yra būtina kontroliuoti jos augimą produkte, kad per visą produkto galiojimo laiką *L. monocytogenes* koncentracija jame neviršytų 100 KSV/g. Šaltai rūkytų žuvies produktų gamyboje perspektyvūs *L. monocytogenes* augimo slopinimo produkte metodai yra organinių rūgščių druskų panaudojimas. KTU maisto institute atlikti tyrimai parodė, kad į šaltai rūkytos žuvies faršą, užkrėtą *L. monocytogenes* pridėjus organinės rūgšties natrio druskos (natrio laktato), arba organinių rūgščių natrio druskų mišinio (natrio laktato ir natrio diacetato), *L. monocytogenes* augimas buvo visiškai sustabdomas. Kadangi minėtos druskos įtrauktos į Lietuvos higienos normos HN 53:2003 „Maisto priedų, leidžiamų vartoti pagal *quantum satis* principą“ sąrašą, jos be jokių apribojimų gali būti naudojamos šaltai rūkytos žuvies produktų gamyboje.

Dėl išsamesnės informacijos ir konsultacijų apie *L. monocytogenes* kontrolę ir prevenciją žuvies perdirbimo įmonėse prašome kreiptis į KTU Maisto instituto technologijos laboratoriją.