

Dr hab. inż. Marek SELWET¹

Dr inż. Mariola GALBAS²

Dr Andrzej BORKOWSKI³

Mgr. inż. Tomasz CŁAPA¹

Mgr. inż. Filip PORZUCEK²

Mgr. inż. Marta AUGUŚCIK-LIPKA¹

¹Katedra Mikrobiologii Ogólnej i Środowiskowej, ²Katedra Biochemii i Biotechnologii

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

³Pracownia Geomikrobiologiczna, Uniwersytet Warszawski

WPŁYW SCHŁADZANIA MIĘSA DROBIOWEGO NA WYSTĘPOWANIE *CAMPYLOBACTER COLI*[®]

The effect of chilling of poultry meat in the presence of *Campylobacter coli*[®]

Celem prezentowanych badań była kontrola wpływu niskich temperatur 4°C na częstotliwość występowania bakterii Campylobacter coli na mięsie drobiowym. Próbkę mięsa drobiowego (n=300) były pobierane losowo z wybranych ubojni. Identyfikacji C. coli dokonano przy zastosowaniu testu Api Camy i reakcji PCR. Stwierdzono, że schładzanie spowodowało obniżenie występowania C. coli w surowym mięsie drobiowym o 81,8%. Podsumowując można stwierdzić, że chłodzenie mięsa nie daje gwarancji całkowitej eliminacji bakterii Campylobacter coli.

The aim of this study was to check the influence of low temperatures 4° C on the frequency of occurrence of these bacteria in poultry meat. Samples of poultry meat (n = 300) were collected randomly from selected slaughterhouses. Identification of C. coli was performed using an API test and PCR reaction. It was found that the chilling effect of reducing the occurrence of C. coli in raw poultry meat by 81.8%. In summary it can be said that the chilling of meat does not guarantee the total elimination of Campylobacter coli.

WSTĘP

Campylobacter coli jest odpowiedzialny za 20-30% zakażeń wśród ludzi [5], dlatego produkty mięsne przeznaczone do spożycia przez ludzi powinny być bezpieczne w stosowaniu. Pomimo stałej poprawy ich jakości, nadal ilość zatruc i zakażeń spowodowanych bakteriami utrzymuje się na wysokim poziomie. Przyczyną może być brak zasad higieny praktyki produkcyjnej i nieprzestrzeganie systemu HACCP [7]. Jak podaje Zakład Epidemiologii Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego w roku 2013 liczba zachorowań wywołanych przez *Campylobacter coli* wynosiła 570 przypadków. Stanowi to wzrost w stosunku do roku 2012, w którym stwierdzono 431 zachorowań [15]. W mięsie surowym mogą być obecne zarówno drobnoustroje saprofityczne jak i chorobotwórcze, a ich występowanie wynika z zanieczyszczeń pierwotnych lub wtórnych [2]. Mięso drobiowe niewłaściwie przechowywane może zostać zanieczyszczone bakteriami *Campylobacter coli*. Powszechność występowania *C. coli* np. w mięsie drobiowym spowodowane jest faktem obecności tych bakterii w przewodzie pokarmowym zwierząt [3]. Dobrym sposobem na ograniczenie tych patogenów jest schładzanie lub zamrażanie mięsa nawet do temperatury minus 18°C [4]. Należy pamiętać, że rozwój mikroorganizmów w żywności przechowywanej w warunkach chłodniczych, w których wystąpiły wahania temperatury, następuje szybciej niż w przypadku żywności mrożonej [8].

Celem artykułu jest przedstawienie wyników badań dotyczących wpływu schładzania mięsa drobiowego pozyskiwanego z ubojni na częstotliwość występowania w produkcie bakterii *C. coli*. Analiza dotyczyła całych tusz drobiowych i jej poszczególnych części przeznaczonych do obrotu handlowego.

MATERIAŁY I METODY

Mięso drobiowe. Próbkę mięsa drobiowego (n=300) były pobierane z wybranej ubojni znajdującej się na terenie województwa mazowieckiego. Próbkę mięsa pochodziły z jednego stada drobiu poddanego badaniu przedubojowemu, które zostało dopuszczone do uboju. Badaniom poddano całe tusze drobiowe, a następnie po rozbiórce badano poszczególne elementy danej tuszy. Kontrolę stanowiło mięso świeże nie poddane po uboju schłodzeniu wodnemu, ani zamrożeniu (przechowywane w temperaturze 20°C). Pozostałe próbki mięsa transportowano w pojemnikach utrzymujących temperaturę 4°C.

Izolacja *Campylobacter coli* [13]. Wymazy z mięsa świeżego umieszczano na podłożach transportowych (Euro Tubo Collection Swab Rubi, Spain). Po przewiezieniu do laboratorium, próbki umieszczono w 100 ml płynnego podłoża namnażającego Prestona (dodatek krwi baraniej i *Campylobacter* Selective Supplement Preston firmy Oxoid). Hodowle inkubowano w warunkach mikroaerofilnych (8% O₂, 7% CO₂).

Następnie 100 µl hodowli nanoszono na filtr bakteriologiczny (średnica porów 0,65 µm). Filtr umieszczony został na powierzchni agaru Karmali (Oxoid) i agaru CCDA (Oxoid).

Po 24 h inkubacji w temp. 37°C w warunkach mikroaerofilnych (Anaerocult C, Merck) filtry usuwano, a podłoże inkubowano przez okres 48 h w identycznych warunkach.

Wstępnej identyfikacji *Campylobacter coli* dokonano z kolonii Gram-ujemnych bakterii katalazododatnich. Zastosowano test API Camy (Bio Merieux).

Reakcję PCR przeprowadzono według procedury podanej przez Szczepańską i wsp. [13] oraz Wang i wsp. [14]. Do identyfikacji użyto 25 µl mieszaniny reakcyjnej o składzie: 2,5 µl 10 x PCR bufor, 200 µM dNTP Mix, 20 mM MgCl₂, stężenie starterów: 0,5 µM *C. jejuni*, 1 µM *C. coli*, 0,2 µM 23S rRNA, 1,25 U *Taq* Polimeraza DNA, 2,5 µl DNA.

Sekwencja starterów dla *C. jejuni* (wielkość produktu 323 pz): CJF 5'-ACTTCTTTATTGCTTGCTGC-3', CJR 5'-GCCACAACAAGTAAAGAAGC-3'. *C. coli* (wielkość produktu 126 pz): CCF 5'-GTAAAACCAAAGCT-TATCGTG-3', CCR 5'-TCCAGCAATGTGTGCAATG-3'. 23S rRNA (wielkość produktu 650 pz): 23SF 5'-TATACCG-GTAAGGAGTGCTGGAG-3', 23SR 5'-ATCAATTAAC-CTTCGAGCACCG-3'.

Reakcję prowadzono w termocyklerze Perkin-Elmer: wstępna denaturacja 95°C przez 6 min. Następnie 30 cykli z których każdy składał się z: wstępnej denaturacji w 95°C przez 0,5 min., przyłączania starterów w 59°C przez 0,5 min., wydłużania w 72°C przez 0,5 min.

Uzyskane produkty analizowano metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym z bromkiem etydyny. Jako szczepu referencyjnego użyto *C. coli* ATCC 43478 oraz *C. jejuni* ATCC 33560 (DSMZ Germany).

Analogicznie badano wymazy pobrane z mięsa poddane go 24 h schładzaniu w temperaturze 4°C.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Tabela 1. Liczba analizowanych próbek

Table 1. Number of samples analysed

Próbka Sample	Liczba próbek Number of samples	Liczba próbek pozytywnych Number of positive samples
Surowe mięso drobiowe (świeże) Raw chicken meat (fresh)	150	72
Surowe mięso drobiowe (schłodzone) Raw chicken meat (chilled)	150	7
Suma Total	300	79

Źródło: Badania własne

Source: The own study

Łącznie analizie poddano 300 próbek mięsa drobiowego, z czego 79 (26,3%) okazało się zanieczyszczonych *Campylobacter coli* (tab. 1). Nur Ilida i Faridach [6] uzyskali wyższy poziom zanieczyszczenia tuszek drobiowych (świeżych, schłodzonych i zamrożonych) przez *Campylobacter coli*. Wynosił on 57 izolatów pozyskanych z 151 próbek, co stanowiło 37,7%. W badaniach własnych największą ilość próbek pozytywnych oznaczono dla tuszek świeżych nie poddanych schłodzeniu. Może to być uwarunkowane fizjologią *Campylobacter coli*, która jako bakteria termofilna posiada optymalną temperaturę wzrostu w granicach 37-42°C, a jej rozwój może być zahamowany przy temperaturze poniżej 30°C [12].

W przypadku mięsa świeżego (n=150), aż 29,3% próbek było zanieczyszczonych przez *C. coli* (tab. 2). Odnotowano zanieczyszczenie zarówno całych tuszek drobiowych jak i jej poszczególnych porcjowanych części. Najbardziej zanieczyszczone okazały się pozostałości po rozbiórce mięsa, oraz całe tuszki. Rodrigo i in. [10] stwierdzili zanieczyszczenie bakteriami *C. coli* u 84% tuszek po uboju, a Bagherpour i wsp. [1] na poziomie 68%, co jest wyższym odsetkiem niż uzyskany w naszych badaniach własnych. Jednocześnie Rodrigo i wsp. [10] badali tuszki przed ubojem na nosicielstwo *Campylobacter coli*. Okazało się, że 80% wymazów z kloak było zanieczyszczone tymi bakteriami. Dowodzi to faktu, że proces ubojowy wpływa na zwiększenie zanieczyszczenia tuszek tymi bakteriami.

Tabela 2. Występowanie *C. coli* na świeżym mięsie drobiowym

Table 2. The presence of *C. coli* on fresh raw poultry meat

Próbka Sample	Liczba próbek pozytywnych <i>C. coli</i> /ogólna liczba próbek <i>C. coli</i> positive samples / total no of samples	% próbek pozytywnych <i>C. coli</i> % of <i>C. coli</i> positive samples
Cały kurczak Whole chicken	15/49	30,6%
Filet Fillet	2/17	11,8%
Skrzydółka Wings	4/19	21,0%
Uda Thighs	4/10	40,0%
Wątróbka Liver	5/25	20,0%
Żołądki Gizzards	4/10	40,0%
Pozostałości Residues	10/20	50,0%
Suma Total	44/150	

Źródło: Badania własne

Source: The own study

Po schłodzeniu mięsa drobiowego do temperatury 4°C odnotowano obniżenie liczebności próbek zanieczyszczonych *C. coli* w porównaniu z tuszkami nie poddanymi procesowi schłodzenia z 29,3% do poziomu 6,7% (tab. 3). Istnieją jednak doniesienia, że schładzanie mięsa nie ma wpływu na zmniejszenie zanieczyszczenia tuszek drobiowych przez *Campylobacter coli* Rob i wsp. [9] wskazali, że samo schłodzenie nie jest gwarantem bezpiecznego przechowywania mięsa drobiowego. Zaobserwowali, że *Campylobacter coli* wykazywał większą przeżywalność w lodówce w temp. 2°C niż w temp. pokojowej (20°C). Piekarska [8] podaje jednak, że najkorzystniejszą dla przechowywania i transportu mięsa drobiowego oraz podrobów jest temperatura od 0°C do 4°C. Danyluk i Pyrcz [2] zauważają, że surowiec magazynowany w temp. 0°C trzykrotnie wolniej ulega zepsuciu niż przy 5°C. Wyniki badań własnych wskazują na niewielki stopień zanieczyszczenia mięsa drobiowego tymi bakteriami, ale jednak występują one. Może to być potwierdzeniem badań cytowanych przez Nur Ilida i Faridach [6] stwierdzających utrzymywanie przez kilka tygodni aktywności fizjologicznej przez *Campylobacter coli* nawet przy temp. 4°C. Ponownie najsilniej skażone bakteriami okazały się pozostałości po rozbiórce tuszek oraz uda drobiowe. Zgodnie z wytycznymi podanymi przez Rywotyckiego [11], idealnym zakresem temperatur do przechowywania mięsa drobiowego i podrobów jest od -18°C do -33°C.

Tabela 3. Występowanie *C. coli* na schłodzonym mięsie drobiowym

Table 3. The presence of *C. coli* on chilled raw poultry meat

Próbka Sample	Liczba próbek pozytywnych <i>C. coli</i> /ogólna liczba próbek <i>C. coli</i> positive samples / total no of samples	% próbek pozytywnych <i>C. coli</i> % of <i>C. coli</i> positive samples
Cały kurczak Whole chicken	1/50	0,5%
Filet Fillet	1/30	3,3%
Skrzydółka Wings	1/25	4,0%
Uda Thighs	1/10	10%
Wątróbka Liver	1/10	10,0%
Żółtąki Gizzards	2/10	20,0%
Pozostałości Residues	3/15	20,0%
Suma Total	10/150	

Źródło: Badania własne

Source: The own study

PODSUMOWANIE

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że bakterie z rodzaju *Campylobacter coli* mogą stanowić powszechne zagrożenie wynikające z ich obecności na mięsie drobiowym.

Podczas rozbioru tuszek drobiowych dochodziło do zanieczyszczenia mięsa bakteriami *C. coli*. Schłodzenie mięsa do temperatury 4°C było czynnikiem ograniczającym lub eliminującym występowanie *C. coli* na powierzchni mięsa drobiowego.

Należy zauważyć, że stale rosnące zapotrzebowanie na mięso drobiowe sprzyja również wzrostowi zakażeń wywołanych przez *Campylobacter coli*. Uzyskanie mięsa o odpowiedniej jakości mikrobiologicznej w dużej mierze warunkowane jest temperaturą jego przechowywania oraz stanem higienicznym w jakim jest ono pozyskiwane. Prowadzenie stałego monitoringu na każdym z etapów obróbki mięsa powinno przyczynić się do zwiększenia bezpieczeństwa potencjalnych konsumentów, których świadomość odnośnie jakości spożywanego produktów stale rośnie.

LITERATURA

- [1] BAGHERPOUR A., A. AHMADI, M. SOLTANIALVAR. 2014. „Survey of campylobacter contamination in poultry meat and by-products in Dezful province”. *WALIA Journal*. 30: 115-118.
- [2] DANYLUK B., J. PYRCZ. 2012. „Bezpieczeństwo zdrowotne mięsa i wyrobów mięsnych”. *Gospodarka Mięsna* 1: 12-14.
- [3] HABIB I., D BERKVEN, L. DE ZUTTER, K. DIERIC, X. VAN HUFFEL, N. SPEYBROECK, A.H. GEERAERD, M. UYTENDALE. 2012. „*Campylobacter* contamination in broiler carcasses and correlation with slaughterhouses operational hygiene inspection”. *Food Microbiol.* 20: 105-112.
- [4] HAĆ-SZYMAŃCZUK E. 2012. „Nowe patogeny w surowcach oraz produktach mięsnych”. *Gospodarka Mięsna* 7: 22-23.
- [5] The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. *EFSA Journal* 2015;13(12):4329. 191 pp.
- [6] NUR ILIDA M., FARIDAH. 2012. „Prevalence of *Campylobacter jejuni* in chicken meat and chicken-based products”. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc.* 40: 63-69.
- [7] PAŁKOWSKA A. 2013. „Wpływ kontroli monitorowania warunków przechowywania i dostaw na optymalizację jakości mikrobiologicznej mięsa”. *Zeszyty Naukowe Akademii Morskiej w Gdyni*. 80: 43-50.
- [8] PIEKARSKA J. 2012. „Transport żywności – kluczowe ogniwo łańcucha chłodniczego”. *Chłodnictwo* 5: 18-22.
- [9] ROB L., H. ANDREW, C. PETER, N. GERHARD. 2003. “Risk profile: *Campylobacter jejuni/ coli* in poultry (whole and pieces)”. Report of New Zealand Food Safety Authority.

- [10] **RODRIGO S., A. ADESIYUN, Z. ASGARALI, W. SWANSTON. 2005.** "Prevalence of *Campylobacter* spp. on chicken from selected reail processoris in Trinidad". *Food Microb.* 22: 125-131.
- [11] **RYWOTYCKI R. 2011.** „Czynniki kształtujące jakość technologiczną i trwałościową oraz wartości żywieniowe produktów mięsnych”. *Chłodnictwo* 5: 40–43.
- [12] **SAUMYA B., C. BRYAN C. 2004.** "Survival of cold-stressed *Campylobacter jejuni* on ground chicken and chicken skin during frozen storage". *J. Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7103–7109.
- [13] **SZCZEPAŃSKA B., J.J. KLAWE, M. SZADYGRAD, A. JURGOŃSKI, M. ANDRZEJEWSKA. 2007.** „Występowanie bakterii z rodzaju *Campylobacter* u drobiu w trakcie procesu ubojowego”. *Probl. Hig. Epidemiol.* 88: 78-83.
- [14] **WANG G., C. G. CLARK, T. M. TAYLOR, C. PUCKNELL, C. BARTON, L. PRICE. 2002.** "Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*". *J. Clin. Microbiol.* 12: 4744-4747.
- [15] **WYSOCKA B., M. PASTUSZCZAK-FRĄK, J. URADZIŃSKI, M. GOMÓŁKA-PAWLICKA, J. DZISKO, M. DZIEDZIECH, A. MARKO. 2015.** „Występowanie i antybiotykooporność szczepów *Campylobacter* spp. wyizolowanych od zwierząt i rzeźnych i ludzi”. *Med. Wet.* 71: 801-806.