

MAGDALENA MICHALCZYK, JOANNA KOWALIŃSKA

ZANIECZYSZCZENIE MIKROBIOLOGICZNE KIEŁKOWANYCH NASION DOSTĘPNYCH W HANDLU

Streszczenie

W pracy określono poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego skielkowanych nasion dostępnych w handlu oraz wpływ dwóch metod mycia na możliwość redukcji ilości wykrywanej mikroflory. Stwierdzona ogólna liczba bakterii mieściła się w większości przypadków w zakresie od 10^8 do 10^{10} jtk/g, liczba bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* i bakterii fermentacji mlekowej od 10^6 do 10^8 jtk/g, a drożdży i pleśni od 10^3 do 10^5 jtk/g. Wśród *Enterobacteriaceae* zidentyfikowano *Klebsiella*, typowe *Enterobacter*, typowe *Escherichia coli* nietypowe *Escherichia coli* oraz *Serratia*. Mycie pod bieżącą wodą (30 s) oraz mycie poprzedzone moczeniem przez 5 min w solance (5 %) w większości przypadków nie wpłynęło w znaczący sposób na zmniejszenie zanieczyszczenia mikrobiologicznego badanych produktów. Redukcja wszystkich badanych grup drobnoustrojów wynosiła nie więcej niż 1 cykl logarytmiczny. W związku z tym, że konsumenci nie mają możliwości efektywnego obniżenia poziomu zanieczyszczenia mikrobiologicznego, konieczne jest osiągnięcie tego celu już na etapie produkcji.

Słowa kluczowe: skielkowane nasiona, zanieczyszczenie mikrobiologiczne, mycie

Wprowadzenie

Skielkowane nasiona stanowią podstawę diety wegetariańskiej oraz cenny dodatek do diety tradycyjnej, m.in. jako składnik kanapek, sałatek, zup i koktajli. Można je kupić w supermarketach, w sklepach z żywnością ekologiczną i kioskach warzywnych. Część konsumentów hoduje je samodzielnie w domu. Ich wartość odżywcza i pewne walory prozdrowotne są dość szeroko znane. Ocena żywieniową dostępnych w naszym kraju produktów należących do tej grupy przeprowadzili Rutkowska i wsp. [15]. Stwierdzili oni, że 100 g skielkowanych nasion może m.in. dostarczyć do około 23 % zalecanego dziennego spożycia żelaza, do 19 % magnezu i miedzi, do 60 % manganu, 100 % witaminy C, 27 % tiaminy i 19 % niacyny. W trakcie kiełkowania wzrasta zawartość witamin oraz biodostępność mikroelementów, zmniejsza się zawartość kwasu

fitynowego, tanin, fitaz, oligosacharydów stachiozy i rafinozy oraz poprawia się strawność białek, a także zmniejsza aktywność inhibitorów trypsyny [7, 10]. W trakcie tego procesu stwierdzono również wzrost zawartości substancji o właściwościach przeciwutleniających, takich jak β -karoten, kwas ferulowy i kwas wanilinowy [20]. Gawlik-Dziki i Kowalczyk [6] wykazali, że zdolność do neutralizacji H_2O_2 przez ekstrakty z kiełków rzodkiewki była wyraźnie wyższa niż Troloxu i BHA. Jednak porównując aktywność przeciwrodnikową z użyciem wolnego rodnika DPPH uzyskano odwrotne rezultaty. W trakcie kiełkowania nasion gryki stwierdzono istotny wzrost zawartości kwasu linolowego (z 38,1 % w nasionach do 51,1 % po 8 dniach hodowli) i linolenowego (z 2,7 do 18,9 %). Systematycznie rosła też zawartość rutyny i kwercytryny, których ilości po 7 dniach kiełkowania były odpowiednio 35 i 65 razy większe niż w nasionach [17]. Prozdrowotne właściwości udowodniono m.in. w odniesieniu do kiełków brokułów, w których zawarte sulforafany umożliwiły przy regularnej konsumpcji eliminację bakterii *Helicobacter pylori* u części leczonych w ten sposób pacjentów [5]. Duży wpływ na zawartość istotnych z żywieniowego punktu widzenia składników ma nie tylko gatunek stosowanych nasion, ale także warunki w jakich prowadzone jest kiełkowanie (m.in. czas i rodzaj oświetlenia) [7, 10].

Kiełki charakteryzują się równocześnie bardzo wysokim zanieczyszczeniem mikrobiologicznym [12]. W badaniach Leszczyńskiej-Fik i Fika [8] ogólna liczba bakterii w analizowanych przez tych autorów kiełkach, pochodzących od jednego producenta, przekraczała 10^9 jtk/g. W większości prób miano mikroorganizmów z grupy coli wynosiło 10^9 , a zanieczyszczenie drożdżami i pleśniami kształtowało się na poziomie 10^4 - 10^5 jtk/g. Również w badaniach Michalczyk i Macury [11] stwierdzona ogólna liczba bakterii w kiełkach słonecznika, lucerny i rzodkiewki kształtowała się na poziomie od 10^7 do 10^9 jtk/g, a bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* od 10^6 do 10^8 jtk/g. Wielu producentów skiełkowanych nasion umieszcza na opakowaniach informację, że wyrób przed spożyciem należy opłukać.

W związku z powyższym celem pracy była analiza zanieczyszczenia mikrobiologicznego kiełkowanych nasion dostępnych w handlu oraz ocena wpływu domowych sposobów mycia na możliwość jego zmniejszenia.

Material i metody badań

Material badawczy stanowiło 12 rodzajów skiełkowanych nasion. Zostały one zakupione w sklepach w Krakowie i były poddawane analizom w różnych dniach deklarowanego przez producentów okresu przydatności do spożycia. Były to kiełki rzodkiewki, soczewicy, fasoli mung, lucerny, brokuła, soi, słonecznika oraz cztery mieszanki. Produkty analizowano w trzech powtórzeniach bezpośrednio po wyjęciu z oryginalnych opakowań oraz po umyciu w strumieniu bieżącej wody (30 s). Ponadto, analizom poddawano także kiełki moczone przez 5 min w 5 % roztworze soli i następnie

płukane w strumieniu bieżącej wody (30 s). Drugą z metod zastosowano, ponieważ znanym tradycyjnym sposobem praktykowanym w gospodarstwach domowych w celu łatwiejszego usunięcia zanieczyszczeń, w tym pasożytów, jest kilkuminutowe moczenie warzyw liściowych w roztworze soli kuchennej poprzedzające właściwe płukanie.

Ogólną liczbę bakterii tlenowych oznaczano na podłożu PCA firmy Merck, inkubując próby w temp. 30 °C przez 72 h [2]. Drożdże i pleśnie izolowano stosując posiewy na agar maltozowy (Oxiod) o pH 3,5 i 4-dniową inkubację w temp. pokojowej (25 ± 1 °C) [19]. Bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* oznaczano metodą płytkową na podłożu VRBG po 24-godzinnej inkubacji w temp. 37 °C. Ich identyfikację przeprowadzono zgodnie z Polską Normą [13]. Bakterie fermentacji mlekowej oznaczano metodą płytkową na podłożu MRS po 72-godzinnej inkubacji w temp. 30 °C [14].

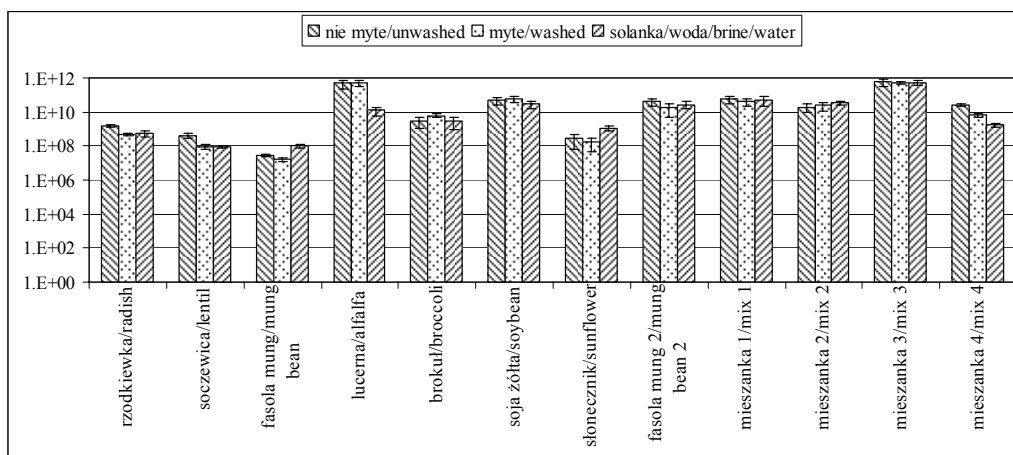
Obliczenia statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu Statistica (wersja 8). Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji na poziomie istotności $\alpha < 0,05$.

Wyniki i dyskusja

Wyniki oznaczenia ogólnej liczby bakterii w analizowanych skiełkowanych nasionach przedstawiono na rys. 1. Odnotowane wartości były wysokie i zawierały się w większości przypadków w zakresie od 10^8 do 10^{10} jtk/g. Największą liczbę drobnoustrojów oznaczono w kiełkach lucerny i w jednej z mieszanek. Przyjmuje się, że zanieczyszczenie bakteriami powyżej 5×10^6 jtk/g może być przyczyną obecności znaczących ilości produktów ich metabolizmu, wpływających na bezpieczeństwo wyrobów [9]. Bardzo istotne znaczenie ma poziom zanieczyszczenia nasion użytych do kiełkowania, ponieważ warunki w jakich odbywa się hodowla, obejmujące stosunkowo wysoką temperaturę i wilgotność, sprzyjają zarówno intensywnemu namnażaniu się mikroorganizmów saprofitycznych, jak i patogenów. Za najważniejsze źródło chorób wywołanych spożyciem kiełków uważa się zanieczyszczone nasiona. [12]. Nie stwierdzono istotnego wpływu mycia czy mycia po uprzednim moczeniu w roztworze soli na oznaczane wartości. Jedynie w czterech przypadkach (rzodkiewka, soczewica, fasola mung i mieszanka 4.) zaobserwowano statystycznie istotną różnicę pomiędzy ogólną liczbą bakterii produktów mytych i niemytych. Zastosowanie moczenia w solance przyniosło największy efekt w przypadku kiełków lucerny.

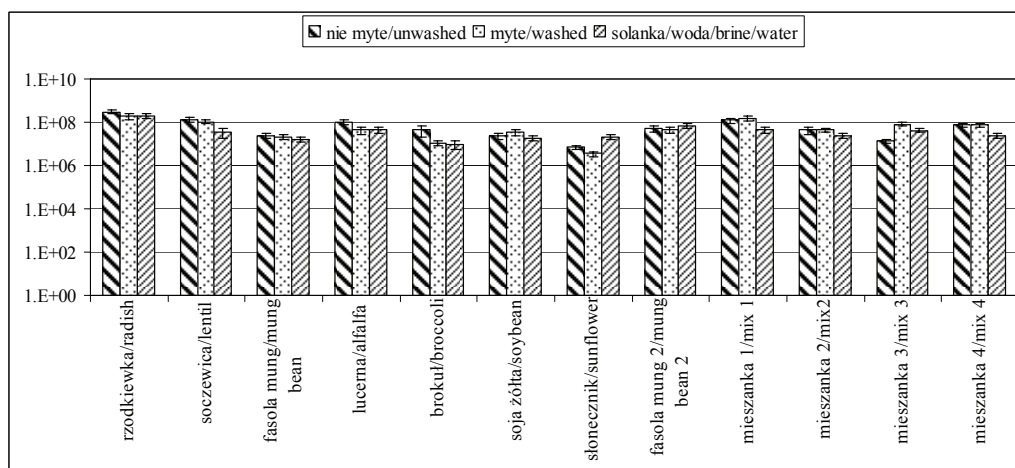
Na rys. 2. przedstawiono wyniki zanieczyszczenia bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae*, a na rys. 3. bakteriami kwasu mlekowego. Odnotowane wartości w obu przypadkach mieściły się w zakresie od 10^6 do 10^8 jtk/g. Należące do rodziny *Enterobacteriaceae* *Escherichia coli* O157:H7 czy *Salmonella* były przyczyną zatruc po spożyciu kiełków w krajach takich, jak: Stany Zjednoczone, Szwecja, Wielka Brytania czy Japonia [4, 12, 18]. W badanych w tej pracy kiełkach zidentyfikowano bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae*: *Klebsiella*, typowe *Enterobacter*, typowe *Escherichia coli*, nietypowe *Escherichia coli* i *Serratia*. Również w przypadku bakterii z ro-

dziny *Enterobacteriaceae* mycie nie powodowało zauważalnego efektu. Większe zróżnicowanie można zaobserwować w odniesieniu do bakterii kwasu mlekowego. Mycie kielków pod bieżącą wodą w większości przypadków obniżyło ilość wykrywanych mikroorganizmów o mniej niż 1 cykl logarytmiczny. Jednak mycie poprzedzone moczeniem w solance w kilku produktach nieznacznie zwiększyło liczbę oznaczanych



Rys. 1. Ogólna liczba bakterii w kiełkowanych nasionach, przed i po procesie mycia.

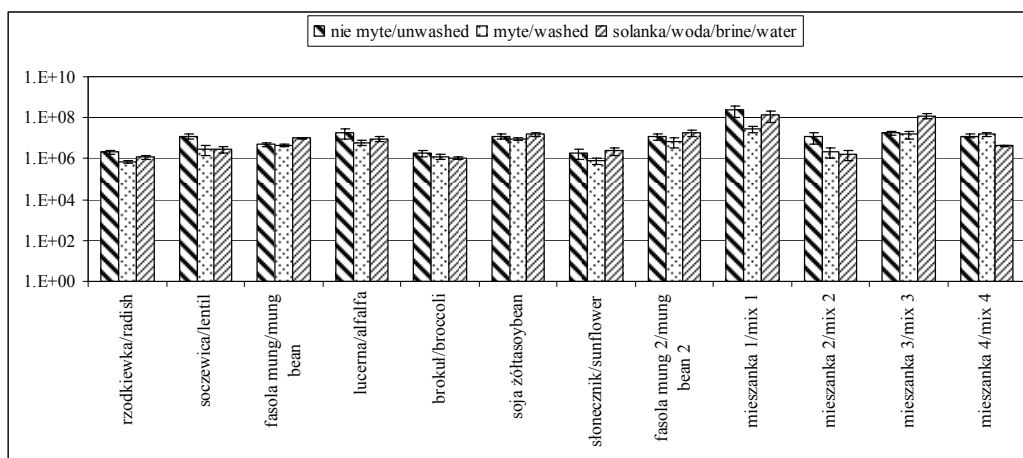
Fig. 1. Aerobic colony count in sprouted seeds prior to and after the washing process.



Rys. 2. Liczba bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* w kiełkowanych nasionach, przed i po procesie mycia.

Fig. 2. *Enterobacteriaceae* count in sprouted seeds prior to and after the washing process.

drobnoustrojów w stosunku do wyrobu niemytego lub mytego samą wodą. Być może było to efektem tego, że moczenie w roztworze soli pozwoliło na lepsze rozdzielanie bakterii na poszczególne komórki w następujących później etapach analizy. W analizowanych kielkach oznaczona liczba drożdży i pleśni zawierała się w zakresie od 10^3 do 10^5 jtk/g (rys. 4). W przypadku tych mikroorganizmów korzystny efekt mycia był najwyraźniejszy, ale w żadnej próbie nie przekroczył progu jednego cyklu logarytmicznego.

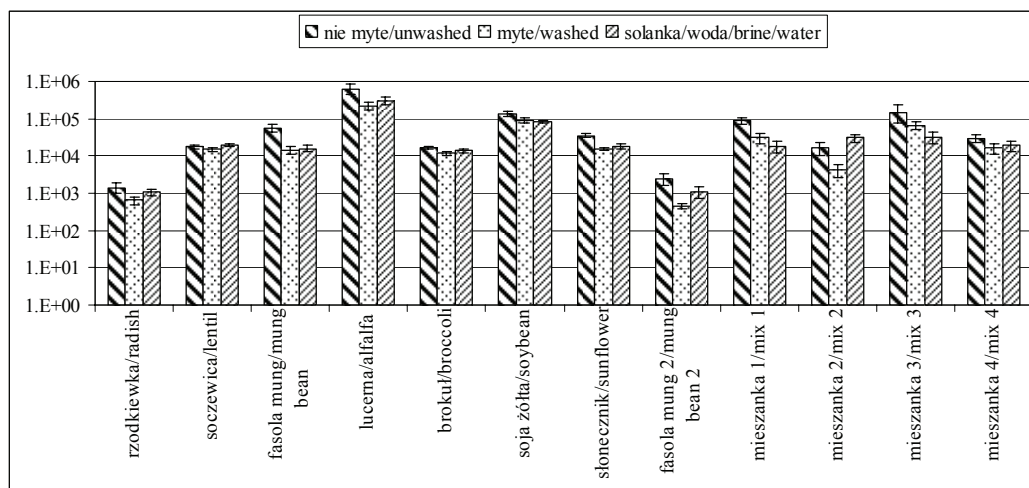


Rys. 3. Liczba bakterii kwasu mlekowego w skielkowanych nasionach, przed i po procesie mycia.

Fig. 3. Lactic acid bacteria count in sprouted seeds prior to and after the washing process.

Poziom zanieczyszczenia zarówno dostępnych w handlu warzyw mało przetworzonych, jak i sałatek serwowanych w restauracjach i kantynach jest ciągle nierozwiązanym w zadawalającym stopniu problemem. Soriano i wsp. [16] analizując 144 próby sałaty z 16 restauracji stwierdzili, że produkty pozyskane z sześciu z nich charakteryzowały się zanieczyszczeniem aerobowymi mezofilami powyżej zalecanego poziomu $5,0 \log$ jtk/g.

Wyniki takie uzyskano pomimo, że 11 restauracji deklarowało stosowanie nadmanganianu potasu, a pozostałe 6 podchlorynu sodu jako środków dezynfekcyjnych. Autorzy ci stwierdzili, że płukanie sałaty w roztworze podchlorynu sodu w stężeniu 70 ppm przez 2 min lub nadmanganianiu potasu (25 ppm, 7 min) powoduje redukcję o co najmniej dwa cykle logarytmiczne mikroorganizmów tlenowych. Natomiast zastosowanie wody destylowanej do płukania sałaty nie spowodowało znaczącego zmniejszenia liczby mikroorganizmów tlenowych ani coliformów.



Rys. 4. Liczba drożdży i pleśni w skielkowanych nasionach, przed i po procesie mycia.

Fig. 4. Yeast and mould count in sprouted seeds prior to and after the washing process.

Allende i wsp. [1] zwracają uwagę, że efektywność mycia zależna jest m.in. od rodzaju zasiedlających mikroorganizmów, charakterystyki powierzchni produktu, sposobu zasiedlenia tej powierzchni przez mikroorganizmy m.in. tworzenia przez nie biofilmów oraz samego sposobu mycia (czasu, temp, pH, proporcji wody do produktu i innych).

Stosowanie środków dezynfekujących może być jednak niebezpieczne ze względu na ograniczenie wzrostu konkurencyjnej mikroflory saprofitycznej, co może sprzyjać rozwojowi patogenów takich, jak *Listeria monocytogenes* [3]. Problemem przy stosowaniu chloru jako środka dezynfekującego jest też możliwość formowania się chlorowanych związków organicznych o właściwościach rakotwórczych oraz pojawianie się nowych bardziej odpornych na te środki bakterii chorobotwórczych [1]. Allende i wsp. [1] po wypłukaniu świeżo pociętej eskaroli wodą z kranu (1 min) stwierdzili redukcję mezofili o 1 cykl logarytmiczny, coliformów o około 1 log i drożdży oraz pleśni o 0,5 log. Po wypłukaniu świeżo pociętej sałaty wartości dla poszczególnych grup drobnoustrojów wynosiły odpowiednio <1,0 log, <1,0 log i około 2 log. Efektywniejsze okazały się roztwory niektórych stosowanych przez autorów handlowych środków odkażających używanych w przemyśle spożywczym takich, jak: Sanova, Purac czy Citrox. Jednak po 8 dniach przechowywania poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego prób był bardzo zbliżony, niezależnie od sposobu mycia z lub bez środków dezynfekujących. Jedynie w przypadku prób mytych roztworem chloru poziom ten był niższy również po okresie przechowywania.

Reasumując, nie można uznać, zarówno na podstawie danych literaturowych, jak i badań własnych, że zalecenie umieszczane przez producentów na opakowaniach

skielkowanych nasion, a dotyczące ich mycia przed spożyciem, jest wystarczającym zabezpieczeniem dla konsumentów.

Wnioski

1. Dostępne w handlu skielkowane nasiona charakteryzują się wysokim ogólnym zanieczyszczeniem mikrobiologicznym. Stwierdzona ogólna liczba bakterii zawierała się w większości przypadków w zakresie od 10^8 do 10^{10} jtk/g.
2. W badanych kielkach zidentyfikowano następujące bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae*: *Klebsiella*, typowe *Enterobacter*, typowe *Escherichia coli*, nietypowe *Escherichia coli* i *Serratia*.
3. Mycie w warunkach domowych, również poprzedzone moczeniem w solance, najczęściej nie wpływa w znaczący sposób na obniżenie zanieczyszczenia mikrobiologicznego badanych produktów. Uzyskana redukcja liczby badanych drobnoustrojów nie była większa niż 1 log.
4. W związku z tym, że konsument nie ma możliwości efektywnego obniżenia poziomu zanieczyszczenia mikrobiologicznego, konieczne jest osiągnięcie tego już na etapie produkcji.

Literatura

- [1] Allende A., Selma M.V., López-Gálvez F., Villaescusa R., Gil M.I.: Role of commercial sanitizers and washing systems on epiphytic microorganisms and sensory quality of fresh-cut escarole and lettuce. *Postharvest Biology and Technology*, 2008, **49**, 155-163.
- [2] Burbińska M., Pliszka A., Burzyńska H.: Mikrobiologia żywności. PZWL. Warszawa 1983.
- [3] Carlin F., Nguyen-the C., Morris C.E.: Influence of background microflora on *Listeria monocytogenes* on minimally processed fresh broad-leaved endive (*Cichorium endivia* var. *latifolia*). *J. Food Prot.*, 1996, **59**, 698-703.
- [4] Ferguson D.D., Scheftel J., Cronquist A., Smith K., Woo-Ming A., Anderson E., Knutsen J., De A.K., Gershman K.: Temporally distinct *Escherichia coli* O157 outbreaks associated with alfalfa sprouts linked to common seed source-Colorado and Minnesota, 2003. *Epidemiology and Infection.*, 2005, **133** (3), 439-447.
- [5] Galan M.V., Arfana A., Kishan A., Silverman A.L.: Oral broccoli sprouts eradicate *Helicobacter pylori* infection. *Amer. J. Gastro.*, 2003, **98** (9) Suppl, 57.
- [6] Gawlik-Dziki U., Kowalczyk D.: Wpływ warunków ekstrakcji na aktywność przeciwutleniającą ekstraktów z kielków rzodkiewki. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2007, **14** (1), 132-139.
- [7] Khattak A.B., Zeb A., Bibi N.: Impact of germination time and type of illumination on carotenoid content, protein solubility and in vitro digestibility of chickpea (*Cicer arietinum* L.) sprouts. *Food Chem.*, 2008, **109**, 797-801.
- [8] Leszczyńska-Fik A., Fik M.: Kielki roślinne. Jakość mikrobiologiczna skielkowanych nasion. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2003, **12**, 29-31.
- [9] Martínez-Villaluenga C., Frías J., Gulewicz P., Gulewicz K., Vidal-Valverde C.: Food safety evaluation of broccoli and radish sprouts. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, **46**, 1635-1644.

- [10] Mbithi-Mwikya S., Van Camp J., Yiru Y., Huyghebaert A.: Nutrient and Antinutrient Changes in Finger Millet (*Eleusine coracana*) during sprouting. *Lebensm.-Wiss. u-Technol.*, 2000, **33**, 9-14.
- [11] Michalczyk M., Macura R.: Wpływ warunków przechowywania na jakość wybranych, dostępnych w obrocie handlowym, mało przetworzonych produktów warzywnych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2008, **3 (58)**, 96-107.
- [12] National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods: Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. *Int. J. Food Microbiol.*, 1999, **52**, 123-153.
- [13] PN-A-04023: 2001. Mikrobiologia żywności. Wykrywanie i identyfikacja drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae*
- [14] PN-ISO 15214:2002. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30 °C.
- [15] Rutkowska U., Kunachowicz H., Ivanow K., Nadolna I., Karłowski K., Gajda J., Marzec Z.: Skiełkowane nasiona. *Przem. Spoż.*, 1993, **3**, 150-152.
- [16] Soriano J.M., Rico H., Moltó J.C., Mañes J.: Assessment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, **58**, 123-128.
- [17] Sun-Lim Kim, Sung-Kook Kim, Cheol-Ho Park: Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable. *Food Res. Int.*, 2004, **37**, 319-327.
- [18] Taormina P.J., Beuchat L.R., Slutsker L.: Infections associated with eating seed sprouts: An international concern. *Emerg. Infect. Dis.*, 1999, **5 (5)**, 626-634.
- [19] The oxoid manual of culture media, ingredients and other laboratory services. (3rd ed.). Published by Oxoid Limited, Hampshire 1976.
- [20] Yang F., Basu T.K., Ooraikul B.: Studies on germination conditions and antioxidant contents of wheat grain. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 2001, **52 (4)**, 319-330.

MICROBIAL CONTAMINATION OF COMMERCIALY AVAILABLE SPROUTED SEEDS

S u m m a r y

In the present paper, the level of microbiological contamination of commercially available sprouted seeds was determined, as well as the effect of two washing methods on the possibility of reducing the quantity of detected microflora. In the majority of cases, the aerobic colony count determined was within the range from 10^8 to 10^{10} cfu/g, *Enterobacteriaceae* and lactic acid bacteria counts ranged from 10^6 to 10^8 cfu/g, while yeasts and moulds counts were between 10^3 and 10^5 cfu/g. Among *Enterobacteriaceae*, the following were isolated: *Klebsiella*, typical *Enterobacter*, typical *Escherichia coli*, atypical *Escherichia coli*, and *Serratia*. In the most cases, neither washing with tap water (30 s) nor washing with 5-minute dipping in brine (5 %) prior to washing significantly affected the reduction in the microbial contamination of the products studied. In all the bacterial groups under analysis, this reduction did not exceed 1 log cycle. Since the consumers are not able to effectively decrease the level of microbial contamination, it is necessary to do it as early as at the stage of production.

Key words: sprouted seeds, microbial contamination, washing ☒