Информация
за
проведено проучване на микробиологичното качество на ядки, сушени и захаросани плодове, включително и наличие на *Cronobacter* spp. в тях

Източник: Google

На 15 юли 2021 г., в издание 10 (7) на списание Pathogens 2021, екип от учени от Полша публикува свое проучване свързано с микробиологичното качество на ядки, сушени и захаросани плодове, които се предлагат за продажба в страната [1].

Резюме

Авторите посочват, че целта на настоящото проучване е да се определи микробиологичното качество на ядки, семена и сушени плодове със специален акцент върху наличието на *Cronobacter* spp. в тях. Те описват бактериите от род *Cronobacter* като патогени, които се пренасят с храната и поради това, храните замърсени с *Cronobacter* spp. може да представлява риск за кърмачета или възрастни с понижен имунитет. Извършени са анализи на 64 проби от ядки (20 проби), сушени плодове (24), захаросани плодове (8), семена (4) и смеси от семена, сушени плодове и ядки (8). Пробите са изследвани за общ брой на микроорганизмите (ОБМ)[2], брой на дрождите и на плесените, както и за наличие на *Cronobacter* spp. Изолатите на *Cronobacter* са идентифицирани и диференцирани чрез молекулярно – генетични методи за анализ - PCR-RFLP[3] и RAPD-PCR[4]. Изследванията извършени от полските експерти показват, че ОБМ, както и дрожди и плесени не са открити в 0,1 g от 23,4%, 89,1% и 32,8% от анализираните проби. В останалите проби ОБМ са в диапазона от 1,2-5,3 log CFU g^{-1}. [5]

---

[1] Berthold-Pluta A, Garbowska M, Stefańska I, Stasiak-Różańska L, Aleksandrzak-Piekarczyk T, Pluta A. Microbiological Quality of Nuts, Dried and Candied Fruits, Including the Prevalence of *Cronobacter* spp. *Pathogens*. 2021; 10(7):900. https://doi.org/10.3390/pathogens10070900
https://www.mdpi.com/2076-0817/10/7/900

[2] Общият брой микроорганизми (ОБМ) е метод за оценка на общия брой микроорганизми (плесени, дрожди, бактерии) в материал.

[3] PCR-RFLP - полимеразна верижна реакция - полиморфизъм в дължината на рестрикционните фрагменти

[4] RAPD-PCR - случайно амплифицирани ДНК полиморфизми - чрез PCR

[5] log CFU g – колонообразущащи единици в 1 грам

Наличието на видове *Cronobacter* е установено в 12 (18,8%) проби от: ядки (10 проби) и смеси (2 проби). Тези 12 щама *Cronobacter* spp. включват: C. *sakazakii* (3 щама), C. *malonaticus* (5) и C. *turicensis* (4). Резултатите от това проучване допринасят за определянето на наличието и видовата идентификация на *Cronobacter* spp. в продукти от растителен произход, предназначени за директна консумация.

1. Въведение

За целите на проучването авторите поясняват, че ядките и сушените плодове принадлежат към категорията храни с ниска влажност (ХНВ). Според определението на Организацията по прехрана и земеделие на ООН (ФАО) и Световната здравна организация (СЗО), тази категория храни включва хранителни продукти с естествено ниско съдържание на влага и продукти, в които съдържанието на влага е намалено чрез изсушаване или дехидратиране. Храните с ниска влажност се характеризират с дълъг срок на трайност, поради ниската си водна активност (aw)[6]. Според други автори - *Ntuli et al*. и *Danyluk et al.*, водната активност на предлаганите за продажба сушените плодове и ядки е приблизително 0,78-0,83, и по-малко от 0,70 съответно, което предотвратява растежа на много патогени и допринася за микробиологична безопасност на храните с ниска влажност. Както посочват учените, въпреки че бактериите от семейство Enterobacteriaceae (*Escherichia coli, Salmonella*) не могат да се размножават върху растителни продукти с ниска водна активност, те могат да останат живи върху/в такива продукти за дълго време (до 1 година), особено когато продуктите се съхраняват на хладно.

Известно е широкото приложение на ядките в хранително-вкусовата промишленост, тъй като те се считат за здравословна, подходяща и питателна закуска. Поради това, те са важен елемент от развитието на хлебопроизводството и сладкарството, добавят авторите. Данните, публикувани от ФАО (FAOSTAT), показват, че най-големите производители на орехи през 2019 г. са били Китай, САЩ и Иран (общото световно производство през 2019 г. възлиза на 4,5 милиона тона). Световното производство на лешници и бадеми през 2019 г. е било съответно 1,1 милиона тона и 3,5 милиона тона. От своя страна, производството на бразилски орехи в света е значително по-малко (70,2 хил. тона), а най-големите им производители са страните от Южна Америка (Бразилия, Боливия и Перу).

В своята работа авторите също посочват, че плодовете са носители на непатогенна и патогенна микрофлора и могат да бъдат зъмърсени в началните етапи на придобиването им (растеж, събиране на реколтата), по време на тяхната преработка и разпространение, както и при неправилно боравене с тях. За разлика от широко разпространяваната информация за наличие на патогени върху пресни плодове и хранителни отравяния, причинени от консумацията на замърсени пресни плодове, наличието на патогени върху сушени или захаросани плодове не е добре документирано. Рядко свързвани с хранителни заболявания, няколко вида ядки са свързани с огнища на салмонелоза или гастроентерит, причинен от *E. coli* O157: H7.

[6] водна активност (aw) - единица показваща наличието на вода (свободна вода) в храните. По-високите стойности на aw, означават повече достъпна налична вода за растеж на бактериите.

Учените отбелязват също, че бактериите от род *Cronobacter* spp. се свързват с редки, но животозастрашаващи заболявания на новородени и кърмачета (некротизиращ ентероколит, менингит и сепсис), но също така и на възрастни и имунокомпрометирани възрастни (септицемия, пневмония, остеомиелит, абсцеси на далака и инфекции на рани). Към род *Cronobacter* принадлежат седем вида: C. *sakazakii*, C. *turicensis*, C. *malonaticus* (които най - често се изолират от инфекции при хората), C. *condimenti*, C. *dublinensis*, C. *muytjensii* и C. *universalis*.

Много изследователи са се фокусирали върху контрола на *Cronobacter* spp. в сухи храни за кърмачета. Тези микроорганизми също са изолирани и от различни хранителни продукти: зърнени храни, плодове и зеленчуци, билки и подправки, млечни продукти, месо, риба и рибни продукти и готови за консумация продукти (ГКХ).

Според полските експерти, литературните данни показват, че източникът на замърсяване на храните с *Cronobacter* spp. може да бъде суровината (особено в растителните продукти) и производствената среда за храни. Бактериите от род *Cronobacter* демонстрират цял набор от свойства, които им позволяват да оцеляват в различни хранителни продукти и определят високата им способност за адаптация към променящата се среда по време на производствения процес. Сред основните характеристики на *Cronobacter* spp. е преди всичко устойчивостта им на изсушаване (ниска aw). Учените считат, че тази висока устойчивост на изсушаване се дължи най-вероятно на концентрацията на трехалоза[7] в клетките на *Cronobacter* (по-специално тези в стационарна фаза), която действа като защитен фактор. Смята се също, че механизмът на системата за отговор на хиперосмотичен стрес може да включва заместване на водния слой, който се натрупва около биомолекулите с трехалоза, което позволява поддържането на триизмерната структура на тези молекули („теория за заместване на водата“). Друга особеност, позволяваща на бактериите от род *Cronobacter* да се колонизират в производствената среда (което също е важен признак, свързан с тяхната вирулентност), е способността им да образуват биофилми, които осигуряват защита срещу стресовите фактори на околната среда, а също и срещу факторите на имунния отговор на гостоприемника. Многобройни проучвания показват, че C. *sakazakii* е способен да се прикрепва към повърхността на материали, използвани в хранително-вкусовата промишленост в контакт с храни, като силиций, латекс, поликарбонат, неръждаема стомана, стъкло, поливинилхлорид, които може да бъдат засегнати от производството на извънклетъчни полизахариди (EPS) от този вид *Cronobacter*. Способността на C. *sakazakii* да образува биофилми върху различни повърхности улеснява замърсяването на храните в производствената среда. Според авторите, това се отнася за цялата верига за преработка на храни. Биофилмите са трудни за отстраняване, замърсяват храната и представляват потенциален риск за здравето на потребителите.

Първите учени, които формулират хипотезата, че естествената екосистема на бактериите от род *Cronobacter* са растенията, са *Iversen* и *Forsythe*. Тя се основава на няколко физиологични особености на тези микроорганизми: производство на извънклетъчни

[7] трехалозата е дизахарид, съставен от две α-D-глюкози, който се намира в много насекоми, гъбички и микроорганизми, но не може да бъде синтезиран от гръбначни животни. Подобно на захарозата, тя е нередуциращ се дизахарид и може да образува прости кристали.

полизахариди, производство на жълт пигмент (каротеноиди) и изключителната им устойчивост на изсушаване. Тези особености могат да позволят на бактериите да колонизират растителната среда, да предлагат защита срещу кислородните радикали, генерирани от слънчевата светлина, и да помагат за оцеляването в сухи периоди, както посочват учените.

Към момента, не съществуват разпоредби за *Cronobacter* spp. в храните, с изключение на сухите храни за кърмачета [8]. Също така няма публикувани доказателства за причиняване на заболявания, предавани по хранителен път, от тази група бактерии от други видове храни. Въпреки това, полските учени посочват появата на някои данни, които предполагат, че напоследък може да има други хранителни източници на инфекции с *Cronobacter* при възрастни хора, поради което не могат да се изключат хранителните продукти от растителен произход. Според някои предположения, трудното идентифициране на тези патогени поради липсата на подходящи диагностични методи в много лаборатории, води до подценяване на броя на случаите на инфекция с *Cronobacter* spp. (например при възрастни хора).

Както подчертават експертите, целта на тяхната работа е да се проучи микробиологичното качество на готовите за консумация храни от растителен произход (ядки, семена, сушени и захаросани плодове) и да се определи разпространението на *Cronobacter* spp. в тези продукти, чрез молекулярно-генетични анализи.

2. Резултати и обсъждане - основни акценти:

- **Разпространение на общия брой на микроорганизмите в изследваните проби**

Резултатите от разпространението на общия брой на бактериите, дрождите и плесените в изследваните проби са обобщени в таблицата по-долу:

Вид хранителен продукт (брой анализирани проби)	Брой проби							
	Общ брой микроорганизми (log - колонообразуващи единици в 1 грам (CFU g^{-1})							
	Не се откриват в 0,1 грам	>1-2	>2-3	>3-4	>4-5	>5-6	Граници	Средно ± стандартно отклонение
Ядки (20)	4	5	4	5	2	0	1,2 - 4,4	2,8 ab ± 1,03
Сушени плодове (24)	10	2	6	4	0	2	1,9 - 5,3	3,07 b ± 1,06
Захаросани плодове (8)	0	3	5	0	0	0	1,5 - 2,8	2,20 a ± 0,46
Семена (4)	0	0	2	1	1	0	2,4 - 4,4	3,17 b ± 0,80
Миксове от сушени плодове, семена и ядки (8)	1	2	3	2	0	0	1,4 - 3,2	2,47 ab ± 0,62
Общо (64)	15	12	20	12	3	2	1,2 - 5,3	2,26 ± 1, 37

Забележка: a, b – означение с различни букви в колоната, показва значителни разлики ($p < 0,05$, $n = 6$).

[8] Изискванията към сухи храни за кърмачета и сухи диетични храни за специални медицински цели, предназначени за кърмачета на възраст под шест месеца – са разписани в глава 1, точка 1.24 на Регламент (ЕО) № 2073/2005 на Комисията от 15 ноември 2005 година, относно микробиологични критерии за храните (ОВ L 338, 22.12.2005 г., стр. 1)

Описание на резултатите в таблицата:

Данните показват, че в 23,4% от пробите ОБМ е под 1 log CFU(колонообразуващи единици) g^{-1} (ОБМ не са открити в 0,1 g от 20,0%, 41,7% и 12,5% от пробите от ядки, сушени плодове и смеси, съответно, и в нито една от пробите от семена и захаросани плодове). В около 18,8% от пробите броят на тези бактерии варира от > 1 до 2 и в същия процент от пробите е от > 3 до 4 CFU g^{-1}, но в повечето проби (31,3%) ОБМ е в диапазона от > 2 до 3 log CFU g^{-1}. Само в 2 проби от сушени плодове общият брой на микроорганизмите надвишава 5 log CFU g^{-1}. В пробите от ядки и семена броят ОБМ не надвишава 5 log CFU g^{-1} в нито една от пробите, докато в пробите от захаросани плодове той не надвишава 3 log CFU g^{-1}. Най-ниската средна стойност на ОБМ е установена в пробите от захаросани плодове (2,20 log CFU g^{-1}), а най-високата - в пробите от сушени плодове и семена (съответно 3,07 и 3,17 log CFU g^{-1}).

Според авторите, тези резултати са съпоставими с резултатите, докладвани от *Danyluk et al., Eglezos et al., Davidson et al.* и *Harris et al.* за ядки, но са малко по - високи от тези, предоставени от *Ntuli et al*. за сушени плодове.

Както посочват полските учени, нивото на общия брой микроорганизми в ядките е индикатор за замърсяване на тези продукти след прибиране на реколтата (например, с почва) и косвено за наличието на вредни липолитични бактерии. Други автори - *Davidson et al.*, съобщават, че ОБМ варират от 1,0 до 5,4 log CFU g^{-1} в орехи, но най-големият процент от пробите (37%) са тези с общ брой на микроорганизмите 3-4 log $CFUg^{-1}$. Налични са и данни, които сочат, че в 45-87% от пробите от различни видове предварително изпечени ядки, постъпили в австралийски предприятия за преработка на ядки, средният брой аеробни микроорганизми е от 2,5 до 4,5 log CFU g^{-1}.

В нито една от предлаганите за продажба проби от различни видове ядки броят на аеробните микроорганизми не е по-висок от 4 log $CFUg^{-1}$. От своя страна, ОБМ в суров шамфъстък варира от 2 до 5,4 log CFU g^{-1}.

Полските учените обобщават, че в процеса на тяхната работа дрожди и плесени не са открити в 0,1 g при 89,1% и 32,8% от пробите, съответно. **Дрожди** не са открити в нито една проба от семена и захаросани плодове (в 0,1 g). Няма статистически значими разлики в броя на дрождите в пробите от различни групи продукти. От своя страна, замърсяването на пробите с **плесени** е значително по-голямо, отколкото с дрожди и достига > 3-4 log CFU g^{-1} в 2 проби от сушени плодове (годжи бери и сушени сини сливи), 1 проба от семена (тиквени семки) и 2 проби от „смеси“. Най-високото средно количество плесени е установено в пробите от „смеси“ (3,22 log CFU g^{-1}), а най-ниското при ядки (1,99 log $CFUg^{-1}$) и захаросани плодове (1,5 log CFU g^{-1}). Докато в полското проучване гъбичките са определени в по-малко от 67% от пробите от сушени плодове, други автори - *Witthuhn et al*. съобщават за наличието им в почти всички проби от сушени плодове, изследвани в Африка.

Резултатите показват още, че дрожди и плесени са открити в 6,7% и 100% от пробите от **орехи,** като броят им варира съответно от 1,0 до 5,2 и от 1,0 до 5,0 log CFU g^{-1}. В **суровите бадеми** дрожди не са открити (<10 CFU g^{-1}) в 89% от пробите, а нивата на плесени варират от 1,0 до > 5,2 log CFU g^{-1}, като средното количество е 3,5 log CFU g^{-1}.

По подобен начин броят на дрождите е под границата на откриване (<1 log CFU g^{-1}), а броят на плесените варира от <1 до 4,1 log CFU g^{-1} в 96% от пробите от **суров шамфъстък**, анализирани от *Harris et al.*

Съгласно препоръките за сушени плодове, общото количество дрожди и плесени не трябва да надвишава 3 log CFUg^{-1}. Всички проби, анализирани в полското проучване, отговарят на тези препоръки по отношение замърсяването с дрожди, докато пет проби (7.8%) не отговарят на тях по отношение на замърсяването с плесени, обобщават учените.

- **Наличие на *Cronobacter* spp. в тестваните хранителни продукти и фенотипна идентификация на предполагаемите изолати**

В хода на своето проучване, експертите установяват, че 12 от 64-те изпитвани проби (18,8%), класифицирани като **ядки** и **смеси от семена, сушени плодове и ядки**, въз основа на фенотипните характеристики, са счетени за замърсени с бактерии от род *Cronobacter* и от тях са изолирани 12 изолата (по един изолат от всяка проба: бадеми, лешници, бразилски орехи, кашу, кедрови ядки, ядки макадамия и смес от сушени плодове, семена и ядки). Причинителят *Cronobacter* spp. не е открит в нито една от анализираните проби от сушени плодове, захаросани плодове и семена. Учените посочват също, че всички 12 изолата показват типичния биохимичен профил съгласно ISO-22964:2017 и образуват жълтопигментирани колонии на триптонов соев агар (TSA) при 25 °C за 48 часа.

- **Идентификация на изолатите от род *Cronobacter***

В обобщение относно идентификацията на изолатите от рода *Cronobacter*, авторите посочват, че наличието на бактерията C. *sakazakii* е потвърдено в 10,0% от пробите от ядки (бразилски орехи) и в 12,5% от пробите от смеси от сушени плодове, семена и ядки; на свой ред C. *turicensis* е открит в 20,0% от пробите от ядки (бадеми и лешници); докато C. *malonaticus* в 20,0% от пробите от ядки (лешници, кашу, кедрови ядки, ядки макадамия) и в 12,5% от пробите от смеси от сушени плодове, семена и ядки *(виж Таблица 6).* Според учените, литературните данни относно разпространението на *Cronobacter* spp. в ядки, семена и сушени или захаросани плодове са оскъдни. Някои автори - *Freire* и *Offord* изолират *Cronobacter* spp. (по-рано наричан *Enterobacter sakazakii*) от кашу и бразилски ядки. Получените резултати показващи липсата на *Cronobacter* spp. в семена, са в противоречие с данните, публикувани от други автори *Hochel et al.*, които ги откриват в 41,2% от 34-те анализирани проби от семена и изолират C. *sakazakii*, C. *turicensis* и C. *malonaticus*.

3. Материали и методи

- **Събиране на проби**

Изследователският материал, използван за целите на проучването се състои от 64 проби от предлагани на пазара хранителни продукти, както следва:

- проби от различни видове ядки: италиански и бразилски орех, лешници, бадеми, пекан[9], кашу, кедрови ядки и макадамия (20 проби);
- проби от сушени плодове: сушени сини сливи, стафиди, череши, вишни, смокини, банан, фурми, кайсии, касис, червена боровинка, годжи и чиа (24 проби);
- проби от захаросани плодове: манго, ананас, джакфрут[10], сливи и маракуя (8 проби);
- проби от семена: слънчогледови и тиквени семки (4 проби);
- проби от смеси от семена, сушени плодове и ядки (смеси в различни пропорции: стафиди, сушени боровинки, орехи, лешници, кашу, бадеми и слънчогледови семки) (8 проби).

Авторите посочват, че пробите са били закупени в магазини във Варшава (Полша) в различни супермаркети, от септември 2018 г. до февруари 2019 г. Те произхождат от седем производители. Всички проби са били опаковани в единични опаковки с тегло от 50 g до 250 g. Авторите пояснява, че в това проучване не са анализирани продукти „продавани на тегло“. Пробите са транспортирани при стайна температура и незабавно тествани в лабораторията. Всички проби са изследвани в рамките на срока им на минимална трайност и са анализирани чрез три повторения.

- **Статистически анализ на резултатите**

Учените посочват, че получените резултати от лабораторните изпитвания са подложени на статистически анализ с помощта на софтуер Statistica версия 13 (TIBCO Software Inc., Краков, Полша, 2017). Проведен е еднопосочен дисперсионен анализ (ANOVA). Тестът на *Tukey* е приложен за сравняване на значимостта на разликите между средните стойности при ниво на значимост от $\alpha = 0{,}05$.

4. Заключения

Авторите обобщават, че в това проучване почти **8%** от анализираните проби, включително проби от **сушени плодове, семена и смеси от сушени плодове, ядки и семена**, са категоризирани като негодни за консумация от човека поради прекомерно количество плесени (> 3 log CFU g^{-1}), което не отговаря на насоките за продукти от този тип, приети и прилагани на международни форуми.

Това ниво на замърсяване може да представлява риск за здравето на потребителите поради потенциалното наличие на микотоксини, поясняват учените.

[9] Пеканът - *(Carya illinoinensi)* представлява орех, които е част от голямото семейство Орехови *(Juglandaceae)*. Пеканът е познат още като пеканов орех, американски орех или маслен орех. За негова родина се считат няколко района в южните части на САЩ.

[10] Джакфрут - *(Artocarpus heterophyllus)* - Индийско хлебно дърво

Резултатите показват също, че в нито една от анализираните проби от **сушени плодове, захаросани плодове и семена** не са открити видове *Cronobacter*.

Разпространението на *Cronobacter* spp. в **ядки предлагани за продажба на дребно и в смеси от сушени плодове, семена и ядки** представлява съответно **50,0% и 25,0%.** Три вида *Cronobacter*: C. *malonaticus*, C. *turicensis* и C. *sakazakii*, са изолирани от проби ядки (бадеми, лешници, кашу, кедрови ядки, макадамия и бразилски орех) и смеси от ядки, сушени плодове и семена.

Според полските учени, наличието на тези три вида, които са единствените патогени от рода *Cronobacter*, в готови за консумация храни може да представлява потенциален риск за човешкото здраве, особено за възрастни хора или лица с предшестващи заболявания.

В заключение, оценката на риска, произтичащ от консумацията на готови за консумация храни от растителен произход от тези групи потребители, трябва да бъде анализирана от съответните агенции за епидемиологичен надзор.

Източник:

Berthold-Pluta A, Garbowska M, Stefańska I, Stasiak-Różańska L, Aleksandrzak-Piekarczyk T, Pluta A. Microbiological Quality of Nuts, Dried and Candied Fruits, Including the Prevalence of *Cronobacter* spp. *Pathogens*. 2021; 10(7):900. https://doi.org/10.3390/pathogens10070900
https://www.mdpi.com/2076-0817/10/7/900

ИЗГОТВИЛ:

Д-р Дора Петлова, главен експерт
Дирекция „Оценка на риска по хранителна верига“, ЦОРХВ, 16.09.2021 г.