

EKOLOGIA ŻYWNOŚCI, ŚRODOWISKA I ZDROWIA CZŁOWIEKA

Międzynarodowe Seminarium Kół
Naukowych w Olsztynie

tom 1



Poznań 2020

Redakcja tomu

prof. dr hab. inż. Marzena Mogielnicka-Brzozowska, prof. UWM

Recenzenci wydawniczy

prof. dr hab. Anita Franczak

dr hab. Dorota Górniak, prof. UWM

dr hab. inż. Jarosław Kowalik, prof. UWM

dr hab. inż. Katarzyna Kiełczewska, prof. UWM

dr hab. Stanisław Czachorowski, prof. UWM

dr hab. Anna Biedunkiewicz

dr hab. Dariusz Kubiak

dr hab. inż. Katarzyna Przybyłowicz

dr Elżbieta Ejdys

dr inż. Aneta Dąbrowska

dr inż. Anna Gątarska

dr inż. Beata Paszczyk

dr inż. Lucyna Kłębukowska

dr Janusz Najdzion

dr n. biol. Katarzyna Kubiak

dr n. med. Aleksandra Gutysz-Wojnicka

dr n. med. Anna Romaszko-Wojtowicz

dr n. med. Katarzyna Jezierska-Woźniak

dr Wioletta Pluskota

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe FNCE

Wydawnictwo Naukowe FNCE

ISBN 978-83-66264-54-0

Poznań 2020

SPIS TREŚCI

Wstęp	7
-------------	---

SEKCJA NAUK BIOLOGICZNYCH

Agnieszka Bachmura, Aleksandra Szybor

Optymalizacja procesu projektowania starterów do reakcji qPCR poprzez adaptację półautomatycznej metodyki bazującej na narzędziach <i>in silico</i>	11
---	----

Damian Brzeziński, Julia Choroszevska

Dynamika wiosennych migracji płazów do miejsc rozrodu oraz wpływ natężenia ruchu drogowego na śmiertelność płazów w Biebrzańskim Parku Narodowym.....	25
---	----

Martyna Buta

Elementy genetyczne odpowiedzialne za zjadliwość szczepów z rodzaju <i>Staphylococcus</i> izolowanych z żywności	38
--	----

Sandra Gąsiorowska

Immunoreaktywność kalbindyny w polu przedwzrokowym u kawii domowej (<i>Cavia porcellus</i>) w okresie płodowym	52
--	----

Natalia Gorczyca, Patrycja Bujalska, Paweł Podobiński

Behawioralne skutki ekspozycji rozdętki zaostrej <i>Physellaacuta</i> na nanosrebro.....	66
--	----

Katarzyna Anna Grosz, Julia Subda

Stan wiedzy mykologicznej na temat bezpiecznego grzybobrania wśród studentów Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie	77
--	----

Rafał Hryniewicz, Dominika Bębnowska, Mikołaj Wołaciewicz

Mieloperoksydaza (MPO) i lizozym (LZM) w neutrofilach królików (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) zakażonych eksperymentalnie szczepem Rossi wirusa <i>Lagovirus europaeus</i> GI.1a	89
--	----

Jakub Hubeny

Enterotoksyczność szczepów <i>Staphylococcus</i> sp. wyizolowanych z żywności	100
---	-----

<i>Klaudia Kurczaba, Weronika Kozłowiecka, Maria Szmidt</i> Grzyby keratynofilne i keratynolityczne zasiedlające place zabaw w wybranych parkach Wrocławia.....	113
<i>Klaudia Kurczaba, Weronika Salwińska, Maria Szmidt</i> Wyniki wstępnych badań nad grzybami mikroskopijnymi zasiedlającymi błony lotne nietoperzy wylatujących z podziemnego zimowiska.....	125
<i>Roksana Kruszakin, Aleksandra Marek, Paweł Podobiński</i> Preferencje pokarmowe i zachowanie drapieżnicze ślimaka <i>Anentome helena</i> w warunkach laboratoryjnych.....	137
<i>Angga Nofa Prasetyo</i> Selection of several <i>Aureobasidium pullans</i> isolates to determine their effectiveness in suppressing the development of <i>Fusarium graminearum</i>	150
<i>Barbara Irena Zarzecka, Alicja Komar, Magdalena Łyczewska</i> Mikrobiologiczna ocena wody w procesie produkcyjnym w mikrobrowarze..	158
SEKCJA NAUK MEDYCZNYCH	
<i>Maria Derkaczew, Ewelina Joniec</i> Studium przypadku pacjentki z ostrą białaczką limfoblastyczną z wczesnym zajęciem OUN.....	171
<i>Michał Gola, Hanna Snarska</i> Egzogenne lipidowe zapalenie płuc – trudności diagnostyczne. Opis przypadku.....	181
<i>Jan Maciej Kapala, Tomasz Maroszczuk</i> Porównanie wyników chirurgicznego leczenia otyłości u kobiet i mężczyzn..	194
<i>Kinga Kondrat</i> Porównanie wyników chirurgicznego leczenia otyłości u pacjentów w różnych grupach wiekowych	207
SEKCJA NAUK O ZDROWIU	
<i>Angelika Jankowska, Patrycja Jankowska, Kinga Żukowska</i> Wizerunek pielęgniarstwa w opinii społeczeństwa.....	221
<i>Beata Józwiak</i> Wiedza i zwyczaje żywieniowe oraz poglądy na temat mitów żywieniowych studentów polskich uczelni	233

Paulina Mencil

Edukacja zdrowotna jako kluczowy komponent profilaktyki chorób onkologicznych 245

SEKCJA NAUK O ŻYWNOŚCI

Bartłomiej Bielawa, Karina Zywar

Analiza zachowań nabywców produktów ekologicznych 259

Karolina Czyżun

Rola bakterii *Enterococcus* spp. w produkcji mięs fermentowanych 272

Szymon Dubiejko, Urszula Zarzecka

Występowanie wybranych czynników wirulencji u paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* izolowanych z żywności pochodzenia roślinnego 282

Joanna Gajewska, Patryk Wiśniewski

Jakość mikrobiologiczna niepasteryzowanych soków owocowych i warzywnych 292

Piotr Jakuć

Substancje słodzące w dostępnych na polskim rynku produktach cukierniczych dla diabetyków 303

Bogumił Kochański, Kamil Kruszewski

Oznaczanie zawartości laktozy w serach dojrzewających z informacją na etykiecie „bez laktozy” i bez takiej informacji 314

Aleksandra Małachwiej, Urszula Zarzecka, Arkadiusz Zakrzewski

Antybiotykooporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* izolowanych z ryb i krewetek dostępnych w handlu detalicznym 324

Klaudia Martynow

Właściwości zdrowotne lucumy i jej wpływ na cechy fizykochemiczne ciastek 335

Honorata Mederska

Analiza rynkowa probiotyków – suplementy czy leki 346

Aleksandra Purkiewicz

Spożycie polifenoli z diety, aktywność fizyczna a wartości parametrów kąta fazowego 358

inż. Martyna Rychta

Charakterystyka mleka koziego – właściwości funkcjonalne i możliwości wykorzystania w przemyśle spożywczym 369

Joanna Więckowska

Preferencje konsumentów odnośnie do spożycia pieczywa 381

Marcelina Wilczak

Charakterystyka produktów nisko przetworzonych na przykładzie jogurtów naturalnych. Porównanie polskiego i chorwackiego rynku jogurtów naturalnych..... 394

Patryk Wiśniewski, Arkadiusz Zakrzewski

Podobieństwo fenotypowe pałeczek *Listeria monocytogenes* izolowanych z mrożonych produktów przetwórstwa owocowo-warzywnego..... 405

Arkadiusz Zakrzewski

Gdzie czai się zło – stan mikrobiologiczny terminali w zakładach gastronomicznych 415

Kinga Zarębska

Wybrana mikroflora deserów przeznaczonych dla niemowląt i dzieci..... 425

Urszula Zarzecka

Występowanie oporności na antybiotyki i czynników wirulencji u szczepów *Enterococcus* izolowanych z żywności pochodzenia zwierzęcego 435

Julia Ziajka

Mleko modyfikowane dla niemowląt – świadomy wybór czy model karmienia powielany przez pokolenia?..... 446

Karina Zywar, Bartłomiej Bielawa, Michał Fiejdasz

Postrzeganie żywności wygodnej i funkcjonalnej przez regionalnych konsumentów..... 460

WSTĘP

Monografia została zredagowana na podstawie artykułów przygotowanych przez uczestników 49. Międzynarodowego Seminarium Kół Naukowych w Olsztynie „Koła Naukowe Szkołą Twórczego Działania”, które odbyło się w Uniwersytecie Warmińsko-Mazurskim w Olsztynie 24-25 września 2020 roku. Opracowanie zawiera prace z zakresu nauk biologicznych, medycznych, o żywności i o zdrowiu.

Jest to edycja wyjątkowa, ponieważ zarówno Organizatorom, jak i Uczestnikom przyszło zmierzyć się z pandemią koronawirusa COVID-19, która od marca do czerwca 2020 roku uniemożliwiała spotkania osobiste, pracę w laboratoriach badawczych uniwersytetów i wielokrotnie dokończenie badań będących podstawą wystąpień seminaryjnych. Nas, jako Organizatorów przedsięwzięcia, zaistniała sytuacja szczególnie dotknęła. Zmuszeni byliśmy do przesunięcia terminu Konferencji z 23-24 kwietnia na 24-25 września 2020 roku oraz przeprowadzenia jej w formie zdalnej. Jest to pierwsza edycja MSKN realizowana w ten sposób, co wymagało od nas przecierania ścieżek dotyczących przepisów, które umożliwiłyby przeprowadzenie obrad online rzetelnie i zadowalająco dla każdej ze stron.

Tematyka artykułów sekcji nauk biologicznych dotyczy głównie badań nad jakością mikrobiologiczną różnego typu środowisk, tj. żywności, powietrza, wody, pomieszczeń i urządzeń sanitarnych. Niektóre gatunki, które zostały poddane badaniom, są dosyć oryginalne, np. rozdętka zaostzona (ślimak), *anentome helena* (ślimak zabójca), mącznik młynarek, nietoperze czy świnka morska (kawia domowa).

Sekcja nauk medycznych podjęła problem chirurgicznego leczenia otyłości, która jest przewlekłą chorobą cywilizacyjną, mogącą prowadzić do licznych powikłań. W artykułach zajęto się również leczeniem ostrej białaczki limfoblastycznej i egzogenego lipidowego zapalenia płuc. Ważne jest uświadomienie społeczeństwu ścisłego powiązania wpływu współczesnego pożywienia na stan układu pokarmowych i zdrowia ogólnego.

Tematyka badań sekcji nauk o żywności dotyczyła analizy fizyko-chemicznej oraz mikrobiologicznej produktów żywnościowych, a także poszukiwania alternatywnych produktów żywnościowych. W nurcie zdrowego żywienia pojawiają się kwestie poszukiwania zamienników cukru – sacharozy, znaczenie produktów

fermentowanych (kombucha, produkty mleczne, mięso) czy poszukiwanie tzw. żywności alternatywnej typu owady jadalne.

Sekcja nauk o zdrowiu pod analizę wzięła mity żywieniowe, edukację zdrowotną oraz wizerunek pielęgniarstwa w opinii publicznej.

W powyższym tomie dominuje tematyka oscylująca wokół ekologii żywności, środowiska i zdrowia człowieka ogólnie pojętego. Podjęte problemy dowodzą, że młodzi ludzie zauważają potrzebę analizy czynników środowiskowych i żywieniowych wpływających bezpośrednio na organizm człowieka. Bez dogłębnej analizy i świadomości takich ścisłych powiązań nie możemy mówić o zdrowym społeczeństwie. Każdy z nas powinien prześledzić swoje nawyki żywieniowe oraz codzienne zachowania środowiskowe w celu wyeliminowania zagrożeń prowadzących do nabycia chorób cywilizacyjnych.

SEKCJA NAUK BIOLOGICZNYCH

Agnieszka Bachmura, Aleksandra Sztybor
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Biologii i Biotechnologii
Koło Naukowe Bioinformatyków
Opiekun: dr Jan Paweł Jastrzębski

OPTIMALIZACJA PROCESU PROJEKTOWANIA STARTERÓW DO REAKCJI QPCR POPRZEZ ADAPTACJĘ PÓŁAUTOMATYCZNEJ METODYKI BAZUJĄCEJ NA NARZĘDZIACH *IN SILICO*

Wstęp

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) została stworzona i opublikowana w roku 1986 przez amerykańskiego biochemika Kary'ego B. Mullisa, wraz zespołem naukowym z Cetus Corporation w Emeryville (Mullis i in. 1986). PCR uważany jest obecnie za fundamentalną metodę biologii molekularnej i pozwala na amplifikację specyficznych fragmentów cząsteczek kwasów nukleinowych w cyklach temperaturowych składających się z trzech etapów: annelingu, elongacji i denaturacji (Jarczak, Ślaska 2011). Podstawą do zapoczątkowania procesu replikacji określonego fragmentu DNA lub cDNA (utworzonego na podstawie RNA) jest obecność pary specyficznych cząsteczek starterowych flankujących wybrany region. Każdy z pary starterów musi mieć sekwencję nukleotydów komplementarną do innej nici powielanej cząsteczki. Warunkiem odpowiedniego przebiegu PCR jest także obecność w środowisku reakcyjnym termostabilnej polimerazy DNA, niemodyfikującej replikowanej sekwencji. Za opracowanie metody PCR Kary Mullis otrzymał w 1993 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii. Podstawą pracy naukowca były badania opublikowane w 1971 roku przez Kjella Kleppe'go, opisujące przebieg replikacji naprawczej przy użyciu oligonukleotydów komplementarnych do naprawianej cząsteczki DNA przy użyciu polimerazy DNA.

Ilościowy PCR (qPCR) to metoda polegająca na powielaniu wybranego fragmentu DNA lub cDNA z jednoczesną analizą przebiegu reakcji w czasie

poprzez pomiar liczby cząsteczek o określonej sekwencji w każdym cyklu temperaturowym (Bal i in. 2007). Pomiar stężenia produkowanego amplikonu możliwy jest dzięki zastosowaniu specyficznych sond molekularnych posiadających znaczniki fluorescencyjne lub niespecyficznych cząsteczek fluoroforów wiążących się z dwuniciowym DNA. Aparatura umożliwiająca przeprowadzanie reakcji qPCR poza blokiem pozwalającym na szybką zmianę temperatury w probówkach musi także posiadać źródło promieniowania UV oraz detektor światła (spektrofluorymetr) z filtrami dającymi możliwość mierzenia pojedynczych długości fali elektromagnetycznej (Szweykowska-Kulińska i in. 2007).

Podstawową różnicą między metodami qPCR a klasycznym PCR jest krótszy przebieg poprzez eliminację etapu szacowania jakości i ilości produktu po zakończeniu reakcji, poprzez zastosowanie technik takich, jak elektroforeza w żelu agarozowym, test immunoenzymatyczny (ELISA) czy hybrydyzacja Southerna (Wyczałkowska-Tomasik i in. 2009). qPCR umożliwia oszacowanie ilości cząsteczek substratowego DNA lub cDNA poprzez wgląd w kinetykę reakcji. Ponadto, ilościowy PCR pozwala na zminimalizowanie zanieczyszczenia produktu dzięki amplifikacji kwasów nukleinowych i detekcji ich liczby w jednym zamkniętym naczyniu.

Jednym z pierwszych etapów qPCR i najważniejszym dla specyficzności przebiegu tej reakcji jest projektowanie i synteza pary specyficznych starterów flankujących wybrany fragment kwasu nukleinowego – DNA lub cDNA (Ye i in. 2012). Startery są krótkimi jednoniciowymi syntetycznymi oligonukleotydami DNA. Występują dwa typy starterów: starter przedni (ang. *forward*), którego sekwencja jest taka sama jak fragmentu powielanego oraz starter wsteczny (ang. *reverse*), który jest komplementarny do fragmentu powielanego (Barylski 2009). Metoda qPCR jest bardziej efektywna, ponieważ pozwala na uzyskanie precyzyjnych wyników przy stosunkowo prostym procesie przedanalizycznym. Wprowadzenie tej metody do wszystkich laboratoriów diagnostycznych nie jest możliwe, ponieważ nadal wymaga opracowania jednolitych procedur, które usystematyzują projektowanie specyficznych starterów i w dalszej perspektywie przyczynią się do ujednoczenia wyników badań wykorzystujących qPCR (Wyczałkowska-Tomasik i in. 2009).

Wraz z rozwojem metod biologii molekularnej, szybko wzrasta liczba dostępnych narzędzi bioinformatycznych, które według założeń mają zautomatyzować etapy badań naukowych oraz analiz diagnostycznych, szczególnie wrażliwych na błędy popełnione przez badacza. Obecnie stały się one niezbędne do zwiększenia produktywności testów molekularnych (a co za tym idzie skrócenie czasu uzyskania wyników) oraz wzrostu ilości i jakości uzyskiwanych wyników (Stockinger i in. 2008). Odpowiedni dobór narzędzi bioinformatycznych oraz

metod i założeń statystycznych jest newralgicznym etapem analizy *in silico* danych pochodzących z wysokoprzepustowych metod biologii molekularnej. W wyniku ciągle rosnącej złożoności i braku ustalonych zasad inżynierii oprogramowania kolejnych narzędzi kompilowanie, instalowanie i konfiguracja dedykowanych aplikacji bioinformatycznych stanowi coraz większy problem. Ponadto, coraz trudniejsze staje się zapewnienie kompatybilności formatów plików między poszczególnymi programami. Co więcej, wiele istniejących narzędzi posiada ograniczone wsparcie ze strony autorów, co także przysparza kolejne trudności w ich obsłudze. Efektem przytoczonych problemów związanych z oprogramowaniem przeznaczonym do analizy danych molekularnych jest konieczność szkolenia badaczy, którzy mają się nim posługiwać. Istnieją jednak narzędzia, które są wieloplatformowe, łatwe w instalacji oraz rozwiązują problemy komunikacyjne między narzędziami (Mangalam 2002). W niniejszej pracy zaproponowano procedurę mającą pomóc, ułatwić i ujednoczyć proces projektowania starterów do qPCR dla danych transkryptomicznych.

Cel pracy

Naukowcy od wielu lat stosowali ręczne projektowanie starterów. Po zebraniu szeregu narzędzi bioinformatycznych proponujemy częściową automatyzację tego procesu, przy zachowaniu podobnych efektów projektowania. Celem niniejszego projektu była optymalizacja procesu projektowania starterów qPCR pod kątem analiz transkryptomicznych, ułatwiająca i przyspieszająca uzyskanie sekwencji specyficznych dla badanego fragmentu mRNA, z uwzględnieniem połączeń egzon-egzon charakterystycznych dla tego rodzaju makromolekuł.

Materialy i metody

Podstawowymi wytycznymi projektowania starterów do reakcji qPCR, wynikającymi z dobrej praktyki laboratoryjnej, które także były brane pod uwagę w niniejszej pracy, są następujące zasady:

- długość sekwencji powinna wynosić od 18 do 30 par zasad,
- zawartość par G+C powinna mieścić się w przedziale 40-60%,
- należy unikać obszarów, w których występuje więcej niż 3 zasady G z rzędu,
- należy unikać zasady T na końcu 3',
- należy unikać komplementarnych nukleotydów w projektowanym starterze oraz pomiędzy starterami biorącymi udział w jednej reakcji,
- startery nie powinny mieć więcej niż 3 nukleotydy C i G w obrębie 5 ostatnich nukleotydów na końcu 3',

- według Yuen T. i in. (2002), długość amplikonu nie powinna przekraczać 200 par nukleotydów, gdyż powoduje to obniżenie wydajności przeprowadzanej reakcji.

Metodą wybarwiania, którą jest projektowane doświadczenie, nazywana jest „sybgrgreen”. Jest to bardzo popularna metoda wybarwienia cDNA w reakcjach qPCR. SYBR jest związkami fluorescencyjnym interkalującym do DNA, przez co jest używany do oznaczania ilości DNA w badanej próbce. (Studzińska in., 2008).

Do przetestowania działania kolejnych narzędzi wykorzystano sekwencje nukleotydowe trzech transkryptów organizmu modelowego – świni domowej (*Sus scrofa f.domestica*):

- dehydrogenazy 17-beta-hydroksysteroidowej typu 8 (numer akcesyjny National Center for Biotechnology Information – NM_001130730.1),
- interleukiny 15 (numer akcesyjny NCBI – NM_214390.1),
- interferonowego czynnika regulacyjnego 1 (numer akcesyjny NCBI – NM_001097413.1).

Dzięki życzliwości Koła Naukowego Biologii Medycznej EXON, pozyskano sekwencje starterów referencyjnych wymienionych transkryptów, które zostały wykorzystane w badaniach stosujących metodę qPCR opublikowanych w czasopismach naukowych o wysokim współczynniku ImpactFactor. Startery zostały wybrane na podstawie opublikowanych wyników badań, które świadczyły o ich sprawdzeniu przez innych autorów. Po przeglądzie dostępnej literatury mamy pewność, że są to sekwencje, które mogą być wykorzystywane do amplifikowania danych fragmentów w innych badaniach. W związku z czym zdecydowałyśmy się z nich korzystać.

Do zaprojektowania par starterów na podstawie wybranych sekwencji referencyjnych wykorzystano program Primer-BLAST (Ye 2012). Został on opracowany przez NCBI i umożliwia, między innymi, wyszukiwanie sekwencji potencjalnych starterów w miejscach charakterystycznych dla cząsteczek mRNA, czyli na połączeniach egzon-ezgon. Zaletą narzędzia Primer-BLAST jest sprzężenie z bazami danych Nucleotide i GenBank NCBI, które z kolei gromadzą i udostępniają wszystkie publiczne sekwencje DNA wraz z adnotacją bibliograficzną i biologiczną (Benson i in. 2000). Parametry działania programu Primer-BLAST zestawiono na ryc. 1, 2 i 3. Dodatkowo narzędzie to pozwala także na uzyskiwanie podstawowych informacji o cechach fizykochemicznych przewidzianych starterów (ryc. 4), takich jak: temperatura topnienia (T_m), długość produktu (Length), lokalizacja (Start i Stop), procentowa ilość zasad guaniny i cytozyny (GC%), a także współczynnik komplementarności do tego samego startera w dwóch kierunkach (Selfcomplementarity). Baza danych

Ryc. 1. Program Primer-BLAST – pierwsza część parametrów. W oknie pod tytułem „Enter accession, gi, or FASTA sequence” wpisywano numer akcesyjny transkryptu (z bazy Nucleotide NCBI) lub znaną sekwencję nukleotydową danego fragmentu mRNA. W polach „forwardprimer” oraz „reverseprimer” opcjonalnie podawano zakres lokalizacji obszaru wyszukiwania. Pola oznaczone jako „PCR productsize” pozwalają na zmianę zakresu długości produktu. Okienka pod nazwą „Primermeltingtemperatures (Tm)” służą do wprowadzenia odpowiedniego zakresu temperatury topnienia starterów, co jest ważne w procesie dysocjacji dupleksu starter-matryca.

Primer-BLAST A tool for finding specific primers

Finding primers specific to your PCR template (using Primer3 and BLAST).

PCR Template Reset page Save search parameters Retrieve recent results Publication Tips for finding specific primers

Enter accession, gi, or FASTA sequence (A refseq record is preferred) Clear

Or, upload FASTA file Nie wybrano pliku

Range

Forward primer Clear

Reverse primer

Primer Parameters

Use my own forward primer (5'->3' on plus strand) Clear

Use my own reverse primer (5'->3' on minus strand) Clear

PCR product size Min Max

of primers to return

Primer melting temperatures (Tm) Min Opt Max Max Tm difference

Źródło: Opracowanie własne

Ryc. 2. Program Primer-BLAST – druga część parametrów. W ukazanej rycinie znajdują się pola, które nie są niezbędne do projektowania starterów, lecz mogą pomóc w ich odszukaniu. Powyższa ilustracja ukazuje możliwość projektowania, uwzględniając połączenia egzon-egzon charakterystycznych dla opisywanych makromolekuł. Dodatkowym ułatwieniem w obsłudze tego programu jest ikona ze znakiem zapytania, która w sposób dokładniejszy wyjaśnia zastosowanie danych pól.

Exon/intron selection A refseq mRNA sequence as PCR template input is required for options in the section

Exon junction span

Exon junction match Exon at 5' side Exon at 3' side

Minimal number of bases that must anneal to exons at the 5' or 3' side of the junction

Intron inclusion Primer pair must be separated by at least one intron on the corresponding genomic DNA

Intron length range Min Max

Źródło: Opracowanie własne

Ryc. 3. Program Primer-BLAST – trzecia część parametrów. Ważnym polem na ukazanej rycinie jest „Organizm”. W tym miejscu należy wpisać nazwę organizmu lub grupy organizmów. Ikona w lewym dolnym rogu opisana jako „Get Primers” służy do rozpoczęcia wyszukiwania przykładowych starterów.

Źródło: Opracowanie własne

NCBI daje możliwość zapisania naszych genów w postaci plików FASTA oraz GenBank, które wykorzystujemy do dalszej pracy.

Kolejnym programem zastosowanym w niniejszej pracy było narzędzie dostępne z poziomu przeglądarki internetowej – OligoCalc wer 3.26 (Kibbe 2007). Ma ono możliwość obliczania parametrów fizykochemicznych par starterów na podstawie ich sekwencji. Jak wynika z praktyki laboratoryjnej, OligoCalc, wykorzystuje inne algorytmy niż Primer-BLAST, w tym model termodynamiczny najbliższego nukleotydu dla temperatury topnienia, dzięki czemu daje wyniki znacznie bardziej zbliżone do obserwowanego w rzeczywistości.

Ryc. 4. Program Primer-BLAST – wstępne wyniki. Informacje przedstawione wyżej są potrzebne do odpowiedniej selekcji starterów. Rycina ukazuje m.in. dane, takie jak: miejsce początku i końca starterów, długość produktu, procentową ilość zasad guaniny i cytozyny, wartość różnicy stopni temperatury topnienia.

Primer pair 1									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTGGCGCTGATCAAGTCCAGG	Plus	20	106	125	60.04	55.00	4.00	1.00
Reverse primer	GACGCGTAAGTCCAGGAGAA	Minus	20	291	272	59.48	55.00	7.00	3.00
Product length	186								
Primer pair 2									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGCGCTGATCAAGTCCAGGTC	Plus	20	108	127	60.46	60.00	4.00	1.00
Reverse primer	ACGCGTAAGTCCAGGAGAAAG	Minus	21	290	270	60.07	52.38	7.00	3.00
Product length	183								
Primer pair 3									
	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGCGTATCAAGTCCAGGTC	Plus	20	109	128	59.46	55.00	4.00	2.00
Reverse primer	GCAAAATGACGCGTAAGTCCA	Minus	21	298	278	59.80	47.62	6.00	0.00
Product length	190								

Źródło: Opracowanie własne

stości zachowania starterów (przede wszystkim podaje dokładniejsze wartości temperatury topnienia).

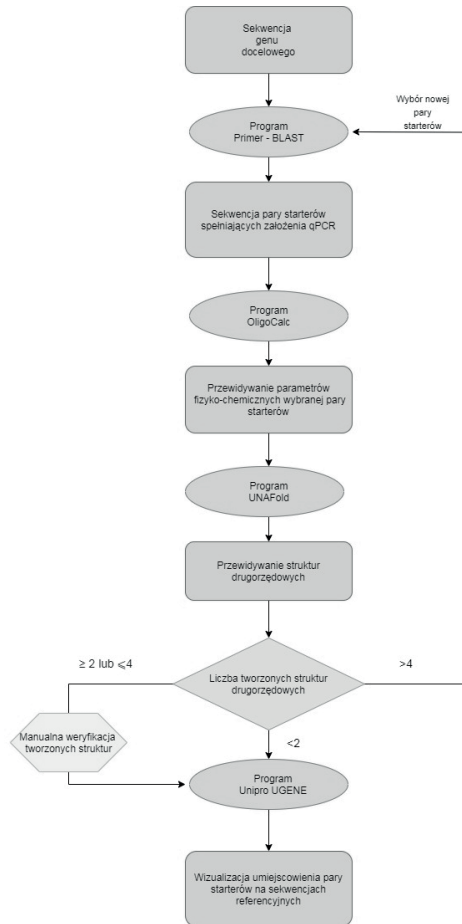
Następnym etapem sprawdzania jakości uzyskanych par starterów jest analiza struktur drugorzędowych, przeprowadzana z zastosowaniem narzędzia Mfold lub UNAFoldwer 3.9 dla oligonukleotydów DNA (Markham, Zuker 2008). Danymi niezbędnymi do uruchomienia programu są sekwencje nukleotydowe uzyskane z programu Primer-BLAST oraz temperatura topnienia uzyskana z narzędzia Mfold. Poza generowaniem schematów struktur drugorzędowych, których liczba zależna jest od występowania komplementarnych układów nukleotydów wewnątrz pojedynczego startera, oblicza on energię tworzenia każdej z przewidzianych struktur. Podczas oceny wizualnych wyników z programu Mfold kierowano się następującymi zasadami:

- występowanie 1 lub 0 struktur drugorzędowych pozwala wnioskować, że prawdopodobieństwo ich tworzenia jest niewielkie i taki starter może być zaakceptowany do następnego etapu,
- w przypadku gdy starter może tworzyć między 2 a 4 struktur drugorzędowych, należy wizualnie sprawdzić, czy taki starter może być użyty w qPCR, poprzez analizę energii tworzenia (im wyższe ΔG , tym mniejsze prawdopodobieństwo utworzenia danej struktury) oraz sprawdzenie liczby wiązań między parami GC (występowanie trzech par GC obok siebie uniemożliwia użycie takiego startera),
- w przypadku gdy starter może tworzyć 5 lub więcej struktur drugorzędowych, należy go wyłączyć z kolejnych etapów przygotowania reakcji qPCR.

Unipro UGENE wer.1.33.0 jest programem szeroko stosowanym do wizualizacji, analizy i przetwarzania danych sekwencyjnych oraz ich adnotowania (Golosoza i in. 2015). Jest programem wieloplatformowym typu *open source*, możliwym do zainstalowania na najpopularniejszych obecnie systemach operacyjnych: Windows, Linux (większość dystrybucji), a także macOS (Okonechnikov i in. 2012). UGENE umożliwia w miarę intuicyjną wizualizację wyników, między innymi uzyskanych sekwencji par starterów, dzięki prostemu w obsłudze interfejsowi graficznemu. Narzędzie to także pozwala pracować na plikach zapisanych w formacie FASTA oraz GenBank, a następnie łączyć je z danymi przechowywanymi w pamięci programu. Zapisane dane mogą być przechowywane zarówno lokalnie (w pamięci lokalnego komputera), jak i w pamięci współdzielonej, przykładowo laboratoryjnej bazy danych.

Na ryc. 5 zestawiono wszystkie opisane powyżej programy i narzędzia bioinformatyczne, usystematyzowano zaproponowany przebieg procesu projektowania starterów do qPCR.

Ryc. 5. Schemat blokowy zawierający opracowaną procedurę projektowania starterów do zastosowania w reakcji ilościowego PCR. Pola owalne przedstawiają zastosowane programy, prostokąty symbolizują procesy przeprowadzane w tych programach. Romb symbolizuje etap decyzyjny, a sześciokąt manualną weryfikację wyników.

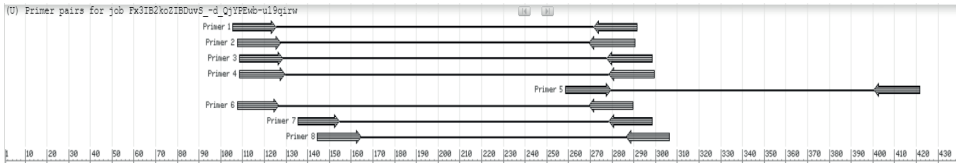


Źródło: Opracowanie własne

Wyniki

W efekcie użycia programu Primer-BLAST uzyskano zestawy par starterów dla każdej z trzech badanych sekwencji transkryptów. Przykład takiego zestawu dla interleukiny 15 zwizualizowano na ryc. 6. Uzyskaną pulę par starterów następnie zawężono, stosując zalecenia dobrej praktyki projektowania starterów

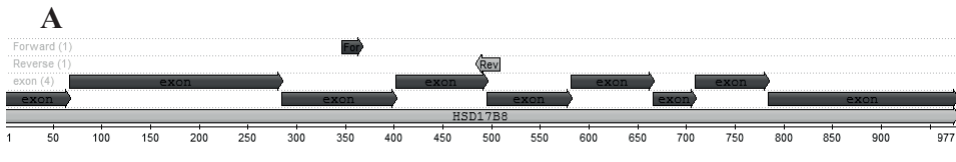
Ryc. 6. Wynik wyszukiwania starterów dla genu o numerze akcesyjnym NM_214390.1 przy użyciu programu Primer-BLAST działającym na ustawionych parametrach (długość produktu 50-200).



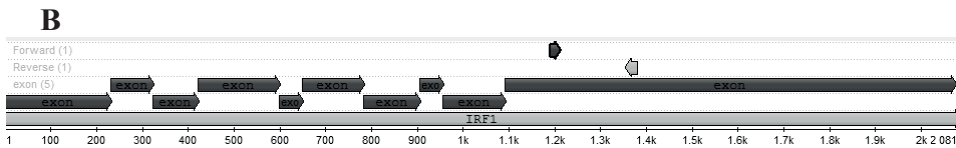
Źródło: Opracowanie własne

dotyczące ich sekwencji oraz sprawdzając liczbę struktur drugorzędowych tworzonych przez każdą cząsteczkę przy użyciu narzędzia Mfold. Wizualizacje umiejscowienia zaprojektowanych starterów przygotowane w programie UGENE przedstawiono na ryc. 7. Można zaobserwować, że dla dwóch sekwencji referencyjnych udało się zaprojektować przynajmniej jeden starter z pary, który

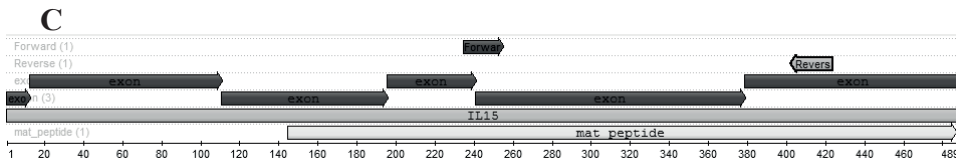
Ryc. 7. Program UGENE. Zestawienie wizualizacji umiejscowienia zaprojektowanych starterów na sekwencjach referencyjnych: (A) NM_001130730.1, (B) NM_214390.1, (C) NM_001097413.1. Strzałka z opisem „Forward” przedstawia starter przedni, natomiast strzałka z opisem „Reverse” przedstawia starter wsteczny. Strzałki poniżej podpisane „exon” reprezentują zakresy egzonów występujących w genie kodującym transkrypt. Najdłuższe strzałki symbolizują część kodującą cząsteczek mRNA.



Źródło: Opracowanie własne



Źródło: Opracowanie własne



Źródło: Opracowanie własne

znajdowałyby się na charakterystycznym dla cząsteczek mRNA połączeniu egzon-egzon. W przypadku transkryptu o numerze referencyjnym NM_214390.1 udało się odnaleźć parę użytecznych starterów wyłącznie na długim ostatnim egzonie. Zestawienie sekwencji, właściwości fizykochemicznych oraz parametrów umiejscowienia na sekwencji referencyjnej par starterów zaprojektowanych przy użyciu opracowanej procedury z parami referencyjnymi przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Porównanie właściwości starterów referencyjnych z zaprojektowanymi przy wykorzystaniu opisanej w niniejszej pracy procedury. Gen o numerze akcesyjnym NM_214390.1 jest na nici antysensownej, więc startery zaprezentowane w tabeli są „reversecomplement”.

Numer akcesyjny	Startery	Kierunek	Długość produktu [pz]				Tm	GC%	Referencje
			start	stop					
NM_001130730.1	Startery	TTC TGC TCC GCA TGT CTG AAG	+	346	366	60.67	52.38	Smolinska N. i in. 2019	
	referencyjne	CCA TGT TTC CCA CCT TCC CTA	-	162	507	487	59.36		
	Startery	TTCTGCTCCGCATGCTGAA	+	346	365	59.68	50.00		
	zaprojektowane	CCATGTTCCACCTCCCT	-	162	507	488	59.59		
NM_214390.1	Startery	GCT CAT CCC AAT TGC AAA GT	+	235	254	56.96	45.00	Fu Y. i in. 2012	
	referencyjne	TTC CTC CAG CTC CTC ACA TT	-	189	423	404	58.34		
	Startery	GCTCATCCCAATGCAAAGT	+	235	254	56.96	45.00		
	zaprojektowane	CCTCCAGCTCCTCACATTCT	-	187	421	402	58.80		
NM_001097413.1	Startery	CCT TGT GCA CCG TAG GCG GG	+	1189	1208	65.83	70.00	Lin H. i in. 2015	
	referencyjne	GGC TTG CCA GGC CCC AAG AG	-	191	1379	1360	65.91		
	Startery	TTCTTGTGCACCGTAGGC	+	1187	1205	60.30	57.89		
	zaprojektowane	GCTTGCCAGGCCCAA	-	192	1378	1363	59.88		

Źródło: Opracowanie własne

Dyskusja i podsumowanie

W metodzie qPCR niezbędna jest umiejętność odpowiedniego zaprojektowania starterów o określonych właściwościach. Metoda ilościowego PCR jest wrażliwa na wiele czynników mogących wpływać na przebieg reakcji, przez co etap wyszukiwania i tworzenia specyficznych sekwencji starterowych jest niezbędny do prawidłowego przebiegu zaplanowanej reakcji.

Efektom powyższych badań było zaproponowanie stosunkowo nieskomplikowanej i prostej do zaimplementowania procedury do optymalizacji projektowania starterów, a następnie wykorzystania ich w późniejszej pracy laboratoryjnej. W oparciu o sekwencje sprawdzonych laboratoryjnie starterów referencyjnych transkryptów znajdujących się w bazie danych Nucleotide NCBI podjęto próbę znalezienia sekwencji optymalnych starterów i następnie porównania ich do starterów referencyjnych. Kolejne rygorystyczne etapy procedury mają na celu

jak najdokładniejsze zawężenie liczby par starterów uzyskanych w programie Primer-BLAST.

W przypadku narzędzia Primer-BLAST zauważono specyficzną specyfikację programu w wykrywaniu jednego miejsca i znajdowania wielu par starterów różniących się jedynie przesunięciem o kilka nukleotydów na sekwencji referencyjnej. W większości przypadków Primer-BLAST znajdował startery referencyjne albo sekwencje bardzo do nich zbliżone. Na podstawie uzyskanych danych zauważyć można, jak wiele zmienia przesunięcie pojedynczego startera nawet o jedną zasadę nukleotydową, co udowadnia, że ważna jest umiejętność projektowania sekwencji starterowych qPCR w celu uzyskania wyników badania wiernie odwzorowującego liczbę cząsteczek mRNA w badanych próbkach.

OligoCalc umożliwia uzyskanie temperatury topnienia starterów, która znajduje zastosowanie zarówno na dalszych etapach procedury projektowania, jak i w trakcie optymalizacji warunków temperaturowych reakcji qPCR.

Pakiet oprogramowania UNAFold umożliwia przewidzenie struktur drugorzędowych tworzonych przez startery. Jest to krytyczny etap opisanej procedury, gdyż warunkuje on, czy wybrana para starterów może znaleźć zastosowanie w reakcji qPCR i czy uzyskane wyniki będą specyficzne dla cząsteczki matrycowej. Im mniejsza ilość tworzonych struktur, tym tworzona sekwencja nukleotydowa daje efektywniejsze wyniki. Ważnym celem użycia tego narzędzia było przewidzenie liczby tak zwanych struktur „hairclips”, które zatrzymują działanie danej specyficznej sekwencji starterowej prowadząc do tworzenia „ciasnych kątów”. Po porównaniu struktur drugorzędowych tworzonych przez startery zaprojektowane względem starterów referencyjnych, teoretycznie pierwsze z nich tworzą struktury dające efektywniejsze wyniki.

Program UGENE dzięki bogatej szacie graficznej daje możliwość wizualizacji genów. Umożliwia to na łatwiejszą dalszą pracę z badanym fragmentem cDNA (oraz mRNA), poprzez możliwość nanoszenia na niego zaprojektowanych starterów i dając informację o amplifikowanym regionie. Ten etap pozwala także na zweryfikowanie, czy któryś z pary zaprojektowanych starterów znajduje się na charakterystycznym dla mRNA połączeniu egzon-egzon. Dzięki temu, w sytuacji gdy uzyskano więcej niż jedną parę specyficznych sekwencji starterowych, możliwe jest wybranie najlepszej pary zdaniem badacza.

Według opinii autorek, utworzona procedura jest szczególnie prosta w zaimplementowaniu do pracy laboratoryjnej ze względu na fakt, że wszystkie zastosowane programy są ogólnodostępne i darmowe w przypadku zastosowań niekomercyjnych oraz dostęp do 3 z 4 narzędzi może się odbywać z poziomu przeglądarki internetowej. Natomiast ostatni program jest prosty w obsłudze i jest możliwość zainstalowania go na wielu popularnych systemach operacyj-

nych. Przewidujemy, iż procedura projektowania może być wykorzystywana w kryminalistyce, analizach środowiskowych, w laboratoryjnych badaniach biologii molekularnej oraz w genetyce wszystkich organizmów.

Literatura:

- Bal J., Mazurczak T. 2007. *Biologia molekularna w medycynie. Elementy genetyki klinicznej. Zakres zastosowań diagnostyki molekularnej w medycynie*. PWN, Warszawa, s. 11-15.
- Barylski J. 2009. PCR – najpopularniejsza metoda badania DNA. IGM Internetowa Gazeta Medyczna. <https://hylostet.pl/igm/artukul/pcr-najpopularniejsza-metoda-badania-dna/> (dostęp 11 marca 2020r.).
- Benson D., Karsch-Mizrachi I., Lipman D., Ostell J., Rapp B., Wheeler D. 2000. Genbank Oxford University Press. *Nucleic Acids Res.*, 28(1): 15-18.
- Fu Y., Quan R., Zhang H., Jun H., Jun T., Wen-hai F. 2012 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Induces Interleukin-15 through the NF- κ B Signaling Pathway *J. Virol.*, 86(14): 7625-7636.
- Golosova O., Grekhov G., Gabrielian A., Oler A., Rosenthal A., Vaskin Y., Algaer Y, Nagarajan V., Quiñones M. 2015. NGS Data Analysis with Unipro UGENE.
- Jarczak J., Ślaska B. 2011. Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR) przegląd hollywoody nr 3/2011, s. 4-8.
- Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R., Molineux I., Khorana H. G. 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalysed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.*, 56: 341-361.
- Lin H., Wang Y., Wang Ch., Wang H., Liu Ch., Guo J. 2015 Transcriptomic Analysis of the Porcine Endometrium during Embryo Implantation. *Genes*, 6(4):1330-1346
- Mangalam H. 2002, The Bio* Toolkits—a brief overview, *Brief. Bioinform.* 3(3): 296-302
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 51(1): 263–273.
- Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. 2012. Unipro UGENE: A Unified Bioinformatics Toolkit. *Bioinformatics applications note*, 28(8): 1166-1167.
- Kibbe W. 2007. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.*, 35: 43-46.
- Stockinger H., Attwood T., Chohan S., Côté R., Cudré-Mauroux P., Falquet L., Fernandes P., Finn R., Hupponen T., Korpelainen E., Labarga A., Laugraud A., Lima

- T., Pafilis E., Pagni M., Pettifer S., Phan I., Rahman N. 2008. Experience using web services for biological sequence analysis. *Brief. Bioinform.*, 9(6): 493-505.
- Smolinska N., Szeszko K., Dobrzyn K., Kiezun M., Rytelawska E., Kisielewska K., Gudelska M., Bors K., Wyrebek J., Kopij G., Kaminska B., Kaminski T. 2019. Transcriptomic Analysis of Porcine Endometrium during Implantation after In Vitro Stimulation by Adiponectin. *Int. J. Mol. Sci.*, 20(6): 1335.
- Studzińska A., Tyburski J., Daca P., Tretyn A. 2008. PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategie monitorowania przebiegu reakcji. *Prace przeglądowe, Biotechnologia*, (80): 71-73.
- Szweykowska-Kulińska Z. 2007 *Biologia molekularna. Krótkie wykłady. Analiza i zastosowanie klonowanego DNA. Łączuchowa reakcja polimeryzacji*. PWN, Warszawa, s. 197.
- Wyczałkowska-Tomasik A., Żegarska J. 2009. Łączuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym – zastosowanie w badaniach naukowych i diagnostyce medycznej. *Prz. Lek.*, 66(4): 209-212.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S, Madden T. 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, USA, 13: 134.
- Yuen T., Zhang W., Ebersole B., Sealfon S. 2002. Monitoring G-Protein- Coupled Receptor Signaling with DNA Microarrays and Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Methods in Enzymology*. Academic Press, Stany Zjednoczone, 345: 556-569.

ABSTRACT

OPTIMIZATION OF THE PRIMERS DESIGN PROCESS FOR QPCR REACTION BY ADAPTING SEMI-AUTOMATIC METHODOLOGY BASED ON *IN SILICO* TOOLS

Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) uses fluorescent techniques, which allow to monitor the amount of emergent product in real time throughout the process of the reaction. The advantage of the qPCR method is considerably reduced analysis time and eliminating the essential stage of quantity and quality visual estimation of the product after the reaction completing with the use of gel electrophoresis. The goal of this project was the optimization of the designing process of qPCR starters with a view to transcriptomic analyses, that will fasten obtaining the sequences specific to the researched mRNA fragment,

also taking into account the exon–exon combinations characteristic of this type of macromolecules. As a part of this project a procedure was designed, by using widely accessible bioinformatics tools as well as databases containing nucleic sequences, that allows to obtain specific starters sequences meeting the assumptions of the research project.

Słowa kluczowe: łańcuchowa reakcja polimerazy, qPCR, projektowanie starterów

Keywords: polymerase chain reaction, qPCR, primers design

Dane do kontaktu z autorkami:

Agnieszka Bachmura:

e-mail: bachmura.agnieszka@gmail.com

tel: +48 500 782 940

Aleksandra Szybor:

e-mail: olasztybor1999@gmail.com

tel: +48 722 337 339

Damian Brzeziński, Julia Choroszevska

Uniwersytet w Białymstoku

Wydział Biologii

Koło Naukowe Biologów im. dr. Włodzimierza Chętnickiego

Opiekun: dr Agata Kostro-Ambroziak

DYNAMIKA WIOSENNYCH MIGRACJI PŁAZÓW DO MIEJSC ROZRODU ORAZ WPŁYW NATĘŻENIA RUCHU DROGOWEGO NA ŚMIERTELNOŚĆ PŁAZÓW W BIEBRZAŃSKIM PARKU NARODOWYM

Wstęp

Obecne zainteresowanie dynamiką liczebności populacji płazów związane jest ze zmniejszaniem się światowej populacji tej grupy kręgowców. Ten negatywny trend został po raz pierwszy zasygnalizowany w 1989 roku podczas I Światowego Kongresu Herpetologicznego (Baringa 1990). Do 1993 roku ponad 500 populacji płazów na pięciu kontynentach zostało określone, jako zmniejszające się lub wymagające ochrony (Vial, Saylor 1993). Aktualnie na świecie panuje powszechna zgoda co do tego, że niepokojące spadki liczebności płazów stały się faktem (Wake, Koo 2018), a wśród żyjących na świecie kręgowców to właśnie płazy są najbardziej narażone na wyginięcie (Stuart i in. 2004).

Zmniejszenie się populacji płazów na świecie nie ma pojedynczej przyczyny (D'Amén, Bombi 2009). Większość gatunków płazów, zwłaszcza na etapie życia larwalnego, uzależniona jest od wody. Może to powodować większą wrażliwością na toksyny środowiskowe (Blaustein, Wake 1990). Ze względu na wilgotną, wysoce przepuszczalną skórę dorosłe płazy narażone są na wysychanie, co może być szczególnie groźne w dobie aktualnych zmian klimatycznych przyczyniających się do globalnego wzrostu temperatury, czy spadku poziomu opadów (Blaustein, Wake 1990; Vitt i in. 1990). Kolejnymi czynnikami wpływającymi na spadek liczebności płazów są: promieniowanie UV, utrata siedlisk, ich frag-

mentacja oraz degradacja (Blaustein i in. 2003; Budzik i in. 2013). Śmiertelność spowodowana przez drapieżniki, jak również wpływ gatunków inwazyjnych, które często wypierają gatunki rodzime zwierząt oraz różne choroby, należą do głównych czynników redukujących populację (Peachmann i in. 1991; Yap i in. 2018).

Ważnym czynnikiem wpływającym na globalny spadek liczebności płazów jest również śmiertelność zwierząt na drogach w wyniku kolizji z pojazdami (Zhang i in. 2018). Zjawisko to dotyczy wielu gatunków, szczególnie w miejscach, gdzie arterie komunikacyjne krzyżują się z trwałymi szlakami migracji zwierząt (Jędrzejewski i in. 2004). W wielu częściach świata obserwuje się negatywny wpływ wzrostu natężenia ruchu drogowego na lokalne populacje płazów (Elzanowski i in. 2009). Znaczący wpływ na śmiertelność płazów na drogach ma rodzaj siedliska oraz odległość od terenów podmokłych (Clevenger i in. 2003; Glista i in. 2007; Hermaniuk, Ołdakowski 2016). Udokumentowano, że płazy najczęściej giną na drogach przebiegających przez miejsca bogate w zbiorniki oraz cieki wodne, co przyczynia się to do istotnej redukcji bogactwa gatunkowego tych zwierząt, nawet w odległości do 2 km od drogi (Findlay, Houlahan 1997). Liczba martwych płazów na drogach jest również związana z porą roku, a dokładnie ze zmienną aktywnością tej grupy kręgowców (Langton 1989; Gryz, Krauze 2008).

Celem przeprowadzonych badań było zbadanie wpływu warunków pogodowych na dynamikę migracji płazów do miejsc rozrodu na wybranym fragmencie Carskiej Drogi w Biebrzańskim Parku Narodowym. Dodatkowym celem było zbadanie wpływu natężenia ruchu drogowego na śmiertelność migrujących płazów.

Material i metody

Teren badań

Badania przeprowadzono na 4-kilometrowym odcinku drogi powiatowej pomiędzy Laskowcem a Osowcem Twierdzą, określanej jako Carska Droga. Opisywany fragment drogi przecina ols naturalnego pochodzenia, znajdujący się w obszarze ochrony ścisłej Biebrzańskiego Parku Narodowego. Siedlisko to charakteryzuje się dominacją olszy czarnej w drzewostanie tworzącym wysokie kępy. W tzw. dolinkach, często zalanych wodą, występują rzadkie gatunki mchów, turzyc oraz innych roślin zielnych. Wiosną, ze względu na obfitość wody, teren ten jest szczególnie atrakcyjny dla płazów wykorzystujących dolinki jako miejsca rozrodu.

Metodyka

Badania wykonano w latach 2015-2019. Do oceny skali i dynamiki migracji wybrano jeden reprezentatywny 400-metrowy odcinek drogi, wzdłuż którego po obu stronach jezdni ustawiono tymczasowe bariery herpetologiczne (płatki). Wysokość płatków wynosiła około 50 cm, aby uniemożliwić płazom przedostanie się na jezdnię. Wędrujące płazy odławiano do wiader wkopanych wzdłuż płatków, w odległości ok. 10 m od siebie. Na dnie każdego wiadra wykonano kilka otworów w celu swobodnego wypływania wody opadowej. Płatki kontrolowano dwa razy dziennie w godzinach porannych i wieczornych. Odłowione płazy oznaczano do gatunku, przypisywano stadium rozwojowe, w przypadku osobników dorosłych ustalano płeć, następnie przenoszono na drugą stronę jezdni. Moment rozpoczęcia monitoringu w kolejnych latach uzależniony był od warunków pogodowych w danym roku, a moment zakończenia od liczby odłowionych płazów w kolejnych dniach migracji (tab. 1).

Tabela 1. Dаты rozpoczęcia oraz zakończenia kontroli płatków w poszczególnych latach prowadzonych badań.

Rok	Okres kontroli płatków	
	Data rozpoczęcia kontroli	Data zakończenia kontroli
2015	14 marca	29 marca
2016	15 marca	13 kwietnia
2017	13 marca	11 kwietnia
2018	5 kwietnia	27 kwietnia
2019	20 marca	15 kwietnia

Źródło: Opracowanie własne

Analizę wpływu warunków pogodowych na intensywność migracji płazów w poszczególnych dniach wykonano w oparciu o dane meteorologiczne pozyskane z serwisu tutiempo (Global Climate Data, Tutiempo Network. Available from <https://en.tutiempo.net/climate/poland.html>, dostęp 22 lutego 2020) dla stacji Białystok reprezentującej warunki klimatyczne dla naszego obszaru badań. Czynniki uwzględnionymi w analizie były: dobowe temperatury minimalne oraz maksymalne, dobowe sumy opadów atmosferycznych oraz dobowa wilgotność powietrza. Liczbę płazów migrujących w poszczególnych dniach wyrażono jako procent złowionych osobników w poszczególnych latach. Roczna suma opadów dla zimy i wiosny została policzona na podstawie dat rozpoczynających i kończących kalendarzowe pory roku (zima: 22 grudnia do 20 marca, wiosna: 21 marca do 21 czerwca, dane pozyskano z serwisu tutiempo).

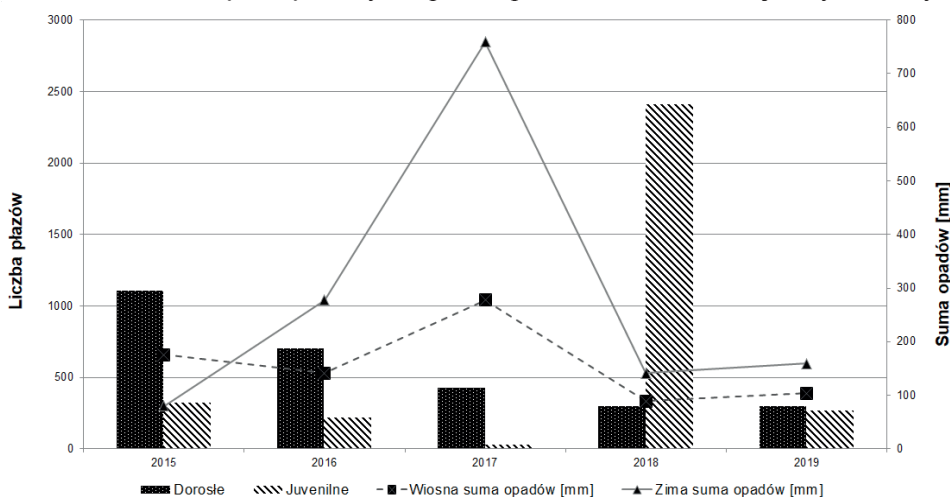
Równolegle do prowadzonej akcji wiosennego monitoringu migracji w latach 2015 i 2018 w tym samym siedlisku dokonano jednorazowego liczenia martwych płazów rozjechanych przez pojazdy. Drogę kontrolowano pieszo w trzyosobowych zespołach. Przy pomocy urządzenia GPS (Garmin GPS-map 62s) badany fragment drogi podzielono na kilkusetmetrowe odcinki. Podczas kontroli liczone wszystkie martwe płazy leżące na jezdni i na poboczach. Zwierzęta oznaczano do gatunku lub do wyższej grupy systematycznej w przypadku wątpliwości. Martwe osobniki usuwano z jezdni, żeby uniknąć ich ponownego policzenia podczas następnych kontroli. W trakcie oceny śmiertelności mierzono również natężenie ruchu wyrażone ilością przejeżdżających pojazdów w konkretnym przedziale czasowym.

Zależności pomiędzy czynnikami pogodowymi a liczbą migrujących płazów w ciągu doby określano przy pomocy korelacji r Pearsona. Analizy statystyczne wykonano w programie Rndom Pro 3.14.

Wyniki badań

W miejscu zamontowania barier herpetologicznych w kolejnych latach przeniesiono łącznie 6103 osobniki. Liczba migrujących płazów różniła się znacznie pomiędzy latami (ryc. 1). Najmniej osobników przeniesiono w 2017 roku (459), najwięcej w 2018 (2713). Wyraźne różnice pomiędzy latami zaobserwowano

Rycina 1. Liczebność migrujących płazów (dorosłych i juvenilnych) w latach 2015-2019 z zaznaczoną sumą rocznych opadów podczas kalendarzowej zimy i wiosny



Źródło: Opracowanie własne

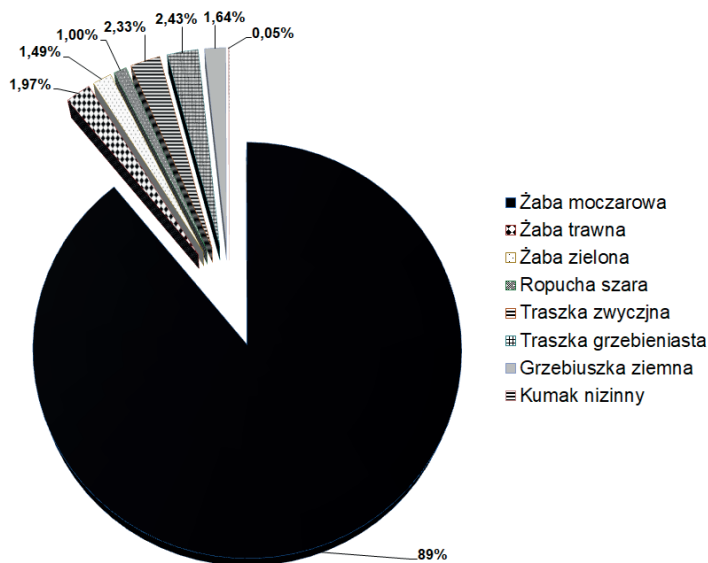
w liczbie migrujących osobników juvenilnych. Liczba młodych płazów wyraźnie wzrosła w 2018 roku, co było skorelowane z wysokim poziomem zimowych i wiosennych opadów na przełomie lat 2016 i 2017 (ryc. 1).

W ciągu pięciu lat badań odłowiono łącznie 8 gatunków płazów, z 13 gatunków występujących na nizinnych obszarach Polski. Wśród złapanych płazów dominowała żaba moczarowa *Rana arvalis*, która stanowiła około 89% wszystkich migrujących osobników. Mniej licznie występowały traszka grzebieniasta *Triturus cristatus* (2,43%), traszka zwyczajna *Lissotriton vulgaris* (2,33%), żaba trawna *Rana temporaria* (1,97%), grzebiuszka ziemna *Pelobates fuscus* (1,64%), żaby zielone *Rana esculenta complex* (1,49%), ropucha szara *Bufo bufo* (1,00%) oraz kumak nizinny *Bombina bombina* (0,05%) (ryc. 2).

Analiza badanych czynników pogodowych wykazała, że migracje płazów są istotnie skorelowane z wilgotnością powietrza ($r=0.20$, $p=0.033$). Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności między liczebnością migrujących płazów a opadami oraz temperaturą minimalną i maksymalną ($r=0.12$, $p=0.211$; $r=0.15$, $p=0.115$; $r=0.16$, $p=0.096$; odpowiednio) (ryc. 3).

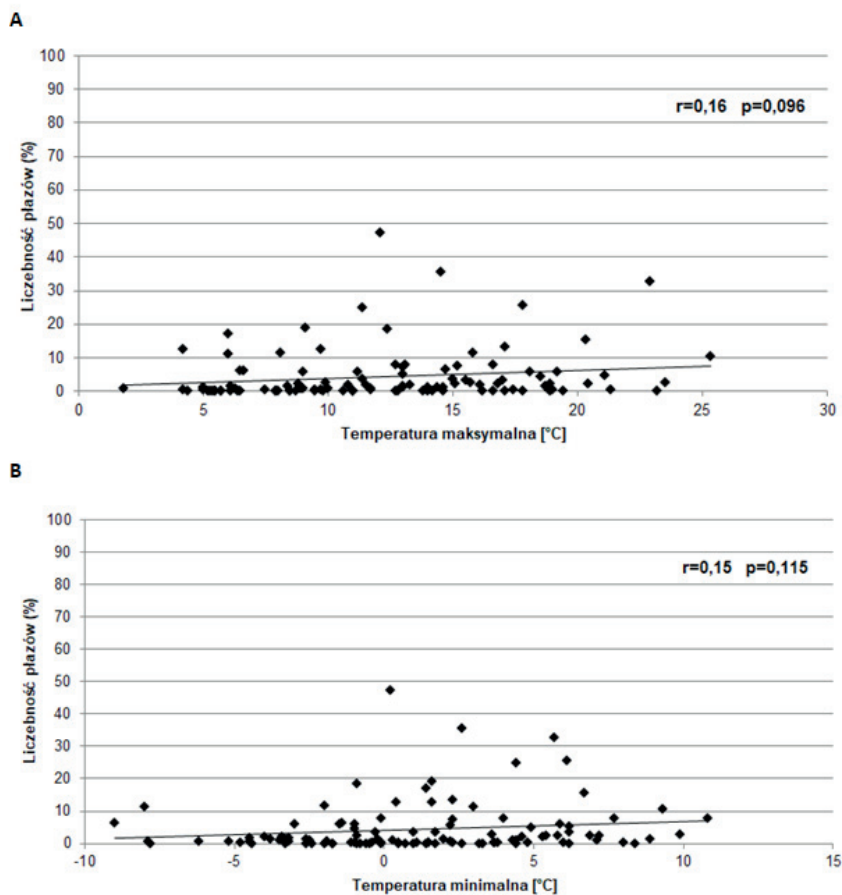
Nasze badania wykazały, że w 2018 roku natężenie ruchu zwiększyło się ponad półtorakrotnie (30 pojazdów na godzinę) w stosunku do roku 2015 (19 pojazdów na godzinę). Średnia śmiertelność płazów na analizowanych kilkuset-

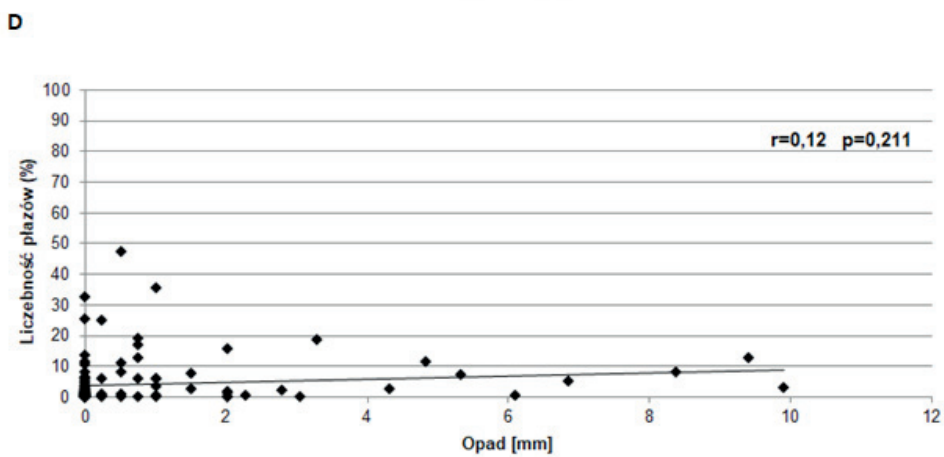
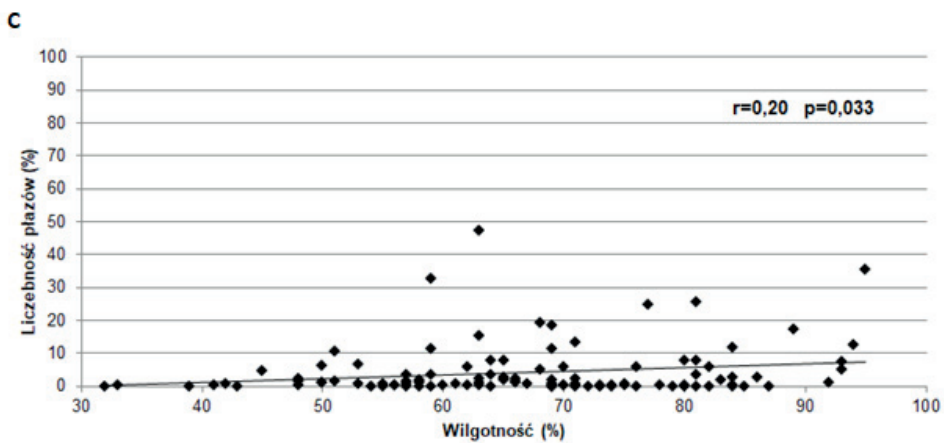
Rycina 2. Udział procentowy poszczególnych gatunków płazów odłowionych w latach 2015-2019.



Źródło: Opracowanie własne

Rycina 3. Liczebność migrujących płazów w ciągu doby wyrażona jako procent złowionych osobników w poszczególnych latach (2015-2019) w zależności od dobowej temperatury maksymalnej (A) oraz minimalnej (B), jak również od wilgotności powietrza (C) i dobowej sumy opadów (D).

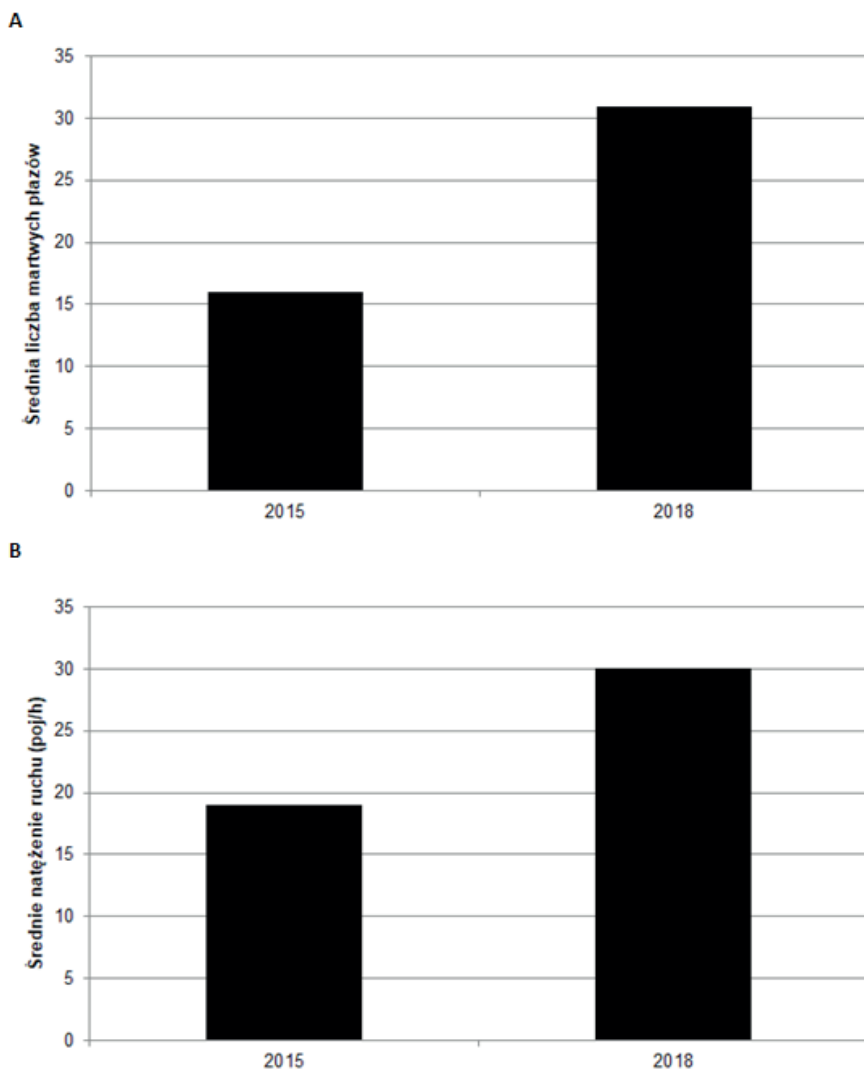




Źródło: Opracowanie własne

metrowych odcinkach wyniosła 16 osobników w 2015 roku oraz 30 w 2018 roku (ryc. 4). Średnia śmiertelność płazów na poszczególnych odcinkach, w stosunku do liczby migrujących zwierząt w tym samym siedlisku wynosiła od 1,12% (2015) do 1,14% (2018). Wynik ten z pewnością jest zaniżony, ponieważ badania śmiertelności wykonywano jednokrotnie w ciągu całego okresu migracji.

Rycina 4. Średnia śmiertelność płazów (A) na kilkusetmetrowych odcinkach oraz natężenie ruchu (B) w tym samym siedlisku, w którym przeprowadzono monitoring migracji płazów (lata 2015 i 2018).



Źródło: Opracowanie własne

Dyskusja

Podczas badań trwających nieprzerwanie od pięciu lat przeniesiono łącznie 6103 dorosłych oraz juvenilnych osobników reprezentujących 8 gatunków płazów. Nasze wyniki pozwalają stwierdzić, że migracja płazów w badanym siedlisku jest bardzo intensywna. Najczęściej migrującym płazem była żaba moczarowa, co jest zgodne z wynikami badań przeprowadzonych w Biebrzańskim Parku Narodowym oraz w północno-wschodniej Polsce wykazującymi, że gatunek ten jest jednym z najpospolitszych płazów na badanych obszarach (Hermaniuk i in. 2004; Łupiński i in. 2014). Nasze badania wykazały wyraźne fluktuacje liczebności migrujących płazów w analizowanym okresie. Wpływ na to mogą mieć duże wahania poziomu zimowo-wiosennych opadów w poszczególnych latach, co może być związane z globalnymi zmianami klimatycznymi obserwowanymi w ostatnich latach (Adedeji i in. 2014). Na przełomie lat 2016 i 2017 zanotowano wyraźny wzrost sumy zimowych i wiosennych opadów, co spowodowało wzrost migracji w płazów w roku 2018, w szczególności osobników juvenilnych. Deoniziak i in. (2017) sugerują, że podwyższony poziom wody wiosną wydłuża hydroperiod (okres, w którym teren podmokły jest pokryty wodą), co przyczynia się do zwiększenia sukcesu rozrodczego gatunków takich jak żaba moczarowa, czy żaba trawna, wykorzystujących okresowe rozlewiska do rozrodu. Wyniki innych badań również potwierdzają, że hydroperiod jest jedną z podstawowych cech wpływających na bogactwo gatunkowe płazów oraz ich sukces rozrodczy na terenach podmokłych (Beja, Alcazar 2003; Baldwin i in. 2006).

Płazy należą do zwierząt zmiennocieplnych, a wszystkie aspekty życia tej gromady są silnie uzależnione od środowiska zewnętrznego, w tym pogody oraz klimatu (Corn 2005). Temperatura oraz wilgotność należą do czynników o istotnym znaczeniu dla fizjologii i zachowania płazów podczas migracji reprodukcyjnych (Beebee 1995; Todd, Winne 2006). Badania terenowe wykonane w Narwiańskim Parku Narodowym potwierdzają, że wzrost temperatury oraz wilgotności powietrza w okresie wiosennym są skorelowane z nasilonymi migracjami płazów do miejsc rozrodu (Hermaniuk i in. 2002; Sidoruk i in. 2004; Sidoruk i in. 2006). Nasze badania potwierdziły, że wilgotność istotnie wpływa na liczebność migrujących płazów przy nieistotnym wpływie pozostałych badanych czynników pogodowych. Zauważyliśmy jednak, że pomimo nieistotnego wpływu dobowej temperatury maksymalnej, nasilenie migracji występowało podczas równoczesnego wzrostu temperatury oraz wilgotności, co także podkreślono w pracy Sidoruk i in. (2004). Trzeba podkreślić, że wyniki naszych badań mogą być obarczone pewnym błędem wynikającym ze znacznej odległości stacji meteorologicznej od terenu badań.

Kontrole śmiertelności wykonane równoległe do prowadzonej akcji wiosennego monitoringu migracji wykazały wysoką śmiertelność płazów na badanym odcinku drogi. Dodatkowo nasze badania wykazały wyraźny wzrost natężenia ruchu drogowego w roku 2018, trzy lata po przeprowadzeniu pierwszej kontroli w roku 2015. Zaobserwowaliśmy, że wraz ze wzrostem natężenia ruchu wzrosła również śmiertelność płazów.

Liczne badania potwierdzają, że wzrost ruchu drogowego przyczynia się do globalnego spadku liczebności płazów (Baringa 1990; Fahrig i in. 1995; Pounds i in. 2006). Również na Carskiej Drodze wzrastające natężenie ruchu drogowego wydaje się być jedną z bezpośrednich przyczyn wzrostu śmiertelności kręgowców notowanego w ostatnich latach (Hermaniuk, Ołdakowski 2016). Wykazano, że na drodze, gdzie natężenie ruchu wynosi jedynie 20 samochodów na godzinę, istnieje realne zagrożenie śmierci nawet 30-50% młodych płazów (Każmierczakowa 1997).

Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały, że wysoki poziom wiosennych, a szczególnie zimowych opadów wyraźnie wpływa na liczebność osobników juwenilnych prawdopodobnie poprzez zwiększenie liczby siedlisk do rozrodu płazów. Wynik ten pokazuje, jak ważne dla rozrodu płazów są warunki hydrologiczne. Globalne zmiany klimatu, objawiające się w naszej strefie klimatycznej zmniejszeniem ilości opadów, mogą zatem wyraźnie wpływać na sukces reprodukcyjny płazów. Wykazano również, że migracje płazów na analizowanym fragmencie drogi są bardzo intensywne, więc obserwowany narastający wzrost natężenia ruchu drogowego może wpływać negatywnie na lokalną populację płazów na Carskiej Drodze w Biebrzańskim Parku Narodowym. Taka sytuacja wymaga wdrożenia długofalowych rozwiązań, mających na celu ograniczenie śmiertelności płazów w wyniku kolizji z pojazdami. Do ochrony płazów podczas sezonowych wędrówek można wykorzystywać tymczasowe bariery herpetologiczne, które pozwalają zwiększyć szanse przeżycia płazów, a co za tym idzie mogą również ograniczyć spadek ich liczebności. Rozwiązanie to jest jednak tylko tymczasowe i nie może stanowić alternatywy dla wybudowania stałego systemu przepustów pod jezdnią wraz z ogrodzeniami ochronno-naprowadzającymi.

Literatura:

- Adedeji O., Reuben O., Olatoye O. 2014. Global Climate Change. *J. Geosci. Environ. Protect.*, 2: 114-122.
- Baldwin R. F., Calhoun A. J. K., de Maynadier P. G. 2006. The significance of hydroperiod and stand maturity for pool breeding amphibians in forested landscapes. *Can. J. Zool.*, 84: 1604-1615.
- Baringa M. 1990. Where have all frogs gone? *Science*, 247:1033-34.
- Beebe T. J. 1995. Amphibian breeding and climate. *Nature*, 374(6519): 219-220.
- Beja P., Alcazar R. 2003. Conservation of Mediterranean temporary ponds under agricultural intensification: and evaluation using amphibians. *Biol. Conserv.*, 114: 317-326.
- Blaustein A.R., Wake DB. 1990. Declining amphibian populations: a global phenomenon? *Trends Ecol. Evol.*, 5:203-204.
- Blaustein A.R., Romansic J.M., Kiesecker J.M., Hatch A.C. 2003. Ultraviolet radiation, toxic chemicals and amphibian population declines. *Divers. Distrib.*, 9: 123-140.
- Budzik A.K., Budzik K.M., Żuwała K. 2013. Amphibian situation in urban environment – history of the common toad *Bufo bufo* in Kraków (Poland) *Ecological Questions*, 18: 73-77.
- Clevenger A.P., Chruszcz B., Gunson K. 2003. Spatial patterns and factors influencing small vertebrate fauna road-kill aggregations. *Biol. Conserv.*, 109: 15-26.
- Corn P. S. 2005. Climate change and amphibians. *Anim. Biodivers. Conserv.*, 28.1: 59-67.
- D'Amen M., Bombi P. 2009. Global warming and biodiversity: Evidence of climate-linked amphibian declines in Italy. *Biol. Conserv.*, 142: 3060-3067.
- Deoniziak K., Hermaniuk A., Wereszczuk A. 2017. Effects of wetland restoration on the amphibian community in the Narew River Valley (Northeast Poland). *Salamandra*, 53: 50-58.
- Elzanowski A., Ciesiołkiewicz J., Kaczor M., Radwańska J., Urban R. 2009. Amphibian road mortality in Europe: a meta-analysis with new data from Poland. *Eur. J. Wildl. Res.*, 55:33-43.
- Fahrig L., Pedlar J.H., Shealag E.P., Taylor P.D., Wegner J.F. 1995. Effects of road traffic on amphibian density. *Biol. Conserv.*, 73: 177-182.
- Findlay C.S., Houlahan J. 1997. Anthropogenic correlates of species richness in southeastern Ontario wetlands. *Conserv. Bio.*, 11: 1000-1009.
- Glista D.J., DeVault T.L., DeWoody J.A. 2007. Vertebrate road mortality predominantly impacts amphibians. *Herpetol. Conserv. Bio.*, 3: 77-87.
- Gryz J., Krauze D. 2008. Mortality of vertebrates on a road crossing the Biebrza Valley (NE Poland). *Eur. J. Wildl. Res.*, 54:709-714.

- Hermaniuk A., Łoban A., Chętnicki W. 2002. Dynamika wędrówek płazów do miejsc rozrodu. Materiały VI Ogólnopolskiego Przeglądu Działalności Studenckich Kół Naukowych Przyrodników. Wydawnictwo Naukowe AP, Kraków, s. 96-99.
- Hermaniuk A., Sidoruk K., Chętnicki W. 2004. Płazy północno-wschodniej Polski. Biologia płazów i gadów – ochrona herpetofauny. Materiały VII Ogólnopolskiej Konferencji Herpetologicznej, Kraków, 28–29 września, s. 39-42.
- Hermaniuk A., Ołdakowski Ł. 2016. Śmiertelność zwierząt kręgowych na Carskiej Drodze w Biebrzańskim Parku Narodowym. *Chrońmy Przyr. Ojcz.*, 72(1): 42-48.
- Jędrzejewski W., Nowak S., Kurek R., Mysłajek R. W., Stachura K. 2004. Zwierzęta a drogi. Metody ograniczania negatywnego wpływu dróg na populacje dzikich zwierząt. Zakł. Bad. Ssaków PAN, Białowieża.
- Kaźmierczakowa R., Dyduch-Falniowska A., Makomaska-Juchiewicz M., Perzanowska J. 1997. Autostrady a ochrona przyrody – źródła konfliktu i możliwości jego ograniczenia. *Chrońmy Przyr. Ojcz.*, 53(5): 26-45.
- Langton T. E. S. 1989. *Amphibians and Roads*. Shefford, Bedfordshire, UK, ACO Polymer Products.
- Łupiński S. Ł., Prończyk T., Chętnicki W. 2014. Płazy bezogonowe Biebrzańskiego Parku Narodowego i jego otuliny. *Parki Narodowe i Rezerваты Przyrody*, 33(3): 33-47.
- Peachmann J. H., Scott D. E., Semlitsch R. D., Caldwell J. P., Vitt L. J., Gibson W. 1991. Declining amphibian populations: The problem of separating human impacts for natural fluctuations. *Science*, 253: 892-895.
- Pounds J. A., Bustamante M. R., Coloma L. A., Consuegra J. A., Fogden M. P. L., Foster P. N., Marca E. L., Masters K. L., Merino-Viteri A., Puschendorf R., Santiago R. R., Sánchez-Azofeifa G. A., Still C. J., Young B. E. 2006. Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature*, 439: 161-167.
- Stuart S. N., Chanson J. S., Cox N. A., Young B. E., Rodrigues A. S. L., Fischman D. L., Waller R. W. 2004. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, 306:1783-1786.
- Sidoruk K., Czerwiec A., Chętnicki W. 2004. Dynamika wiosennych wędrówek płazów w Narwiańskim Parku Narodowym. VII Ogólnopolska Konferencja Herpetologiczna: Biologia płazów i gadów – Ochrona herpetofauny. Kraków, 28-29 IX: 105-108.
- Sidoruk K., Czerwiec A., Siwak P. 2006. Wpływ wybranych czynników pogodowych na dynamikę wiosennych wędrówek płazów. VIII Ogólnopolska Konferencja Herpetologiczna: Biologia płazów i gadów – ochrona herpetofauny. Kraków, 27-28 IX: 109-114.
- Todd B. D., Winne C. T. 2006. Ontogenetic and interspecific variation in timing of movement and responses to climatic factors during migrations by pond-breeding amphibians. *Can. J. Zool.*, 84(5): 715-722.

- Vial J. L., Saylor L. 1993. The Status of Amphibian Populations: a Compilation and Analysis. IUCN/SSC Declining Amphibian Populations Taskforce. Work. Doc. No. 1.
- Vitt L. J., Caldwell J. P., Wilbur H. M., Smith D. C. 1990. Amphibians as harbingers of decay. *BioSci.*, 40(6): 418-418.
- Wake David B., Koo M.S. 2018. Amphibians. *Curr. Biol.*, 28.21: R1237-R1241.
- Yap T. A., Koo M. S., Ambrose R. F., Vredenburg V. T. 2018. Introduced bullfrog facilitates pathogen invasion in the western United States. *PloS one*, 13(4).
- Zhang W., Shu G., Li Y., Xiong S., Liang C., Li C. 2018. Daytime driving decreases amphibian roadkill. *PeerJ.*, 6:e5385.

ABSTRACT

AMPHIBIANS ACTIVE PROTECTION DURING MIGRATION TO BREEDING SITES IN THE BIEBRZA NATIONAL PARK

Amphibians are currently the most endangered class of vertebrates, their abundance is constantly decreasing. Causes for this declines are mortality on roads and climate change. The goals of this study were active protection and population monitoring during migration in 2015-2019. We also quantify the impact of traffic on amphibians mortality. The study was carried out on a 4-kilometre section of Tsar's Road that crosses natural alder forest located in the strict protection area in the Biebrza National Park. Amphibians were caught to buckets set along the herpetological barriers. At the same time in 2015 and 2018 dead animals were counted and traffic was measured. A total of 6103 amphibians were moved in following years. The most abundant species was moor frog. Migrations were closely related to air humidity. The number of juvenile amphibians was strongly affected by the level of winter and spring precipitation. Traffic considerably increased between comparing years that was coincided with the increased level of road mortality. We conclude that further increase of traffic may threaten local populations of amphibians.

Słowa kluczowe: płazy, wiosenne migracje, zmiany klimatyczne, Carska Droga, śmiertelność na drogach

Keywords: Amphibians, migrations to breeding sites, climate change, Tsar's Road, road mortality

Dane do kontaktu z autorem:

Koło Naukowe Biologów im. dr. Włodzimierza Chętnickiego,
Uniwersytet w Białymstoku,
Wydział Biologii, 15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1J
e-mail: damianbrzezinski96@gmail.com

Martyna Buta

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Geoinżynierii

Koło Naukowe Mikrobiologów Molekularnych „Coccus»

Opiekun koła: dr hab. inż. Monika Harnisz, prof. UWM

ELEMENTY GENETYCZNE ODPOWIEDZIALNE ZA ZJADLIWOŚĆ SZCZEPÓW Z RODZAJU *STAPHYLOCOCCUS* IZOLOWANYCH Z ŻYWNOŚCI

Wstęp

Gronkowce występują na szeroką skalę w środowisku ludzi oraz zwierząt, przez co bardzo często kolonizują ich skórę oraz błony śluzowe. W przypadku ludzi kolonizacja dróg oddechowych oraz przewodu pokarmowego często ma charakter bezobjawowy, jednak na przestrzeni ostatnich lat gronkowce stały się drobnoustrojami zaliczanymi do najczęstszych czynników etiologicznych powodujących choroby przewodu pokarmowego mające swoje źródło w żywności, a patogenny charakter tych drobnoustrojów determinowany jest indywidualnym dla każdego szczepu genotypem zjadliwości (Otto 2010).

Gronkowce charakteryzują się szerokim spektrum czynników wirulencji głównie dzięki zdolności omijania mechanizmów obronnych gospodarza, ekspresji zewnątrzkomórkowych białek oraz szerokiemu zakresowi antybiotykooporności (Podkowik 2013).

Jednym z wyjątkowo istotnych czynników wirulencji bakterii jest zdolność do tworzenia biofilmu, która po raz pierwszy została odkryta oraz opisana u szczepów *Staphylococcus epidermidis* (Podkowik 2013). Znanych jest kilka elementów genetycznych ściśle związanych z produkcją biofilmów przez bakterie. Należą do nich m.in. operon *ica* – zbiór genów odpowiedzialnych za produkcję polimerów cukrowych złożonych z glukozaminoglukozy (PIA – Polysaccharide Intercellular Adhesin) (de Silva i in. 2002), gen *bap* (Biofilm Associated Protein) – kodujący białko ściany komórkowej bakterii umożliwiające im silną adhezję do powierzchni oraz tworzenie biofilmu (Salaberry i in. 2015; Cucarella

i in. 2001) czy gen *eno* kodujący białko wiążące lamininę (Tristan i in. 2003). Carneiro i współpracownicy (2004) zidentyfikowali oraz opisali enolazę, jako białko wiążące lamininę, znajdujące się na powierzchni komórki bakteryjnej *Staphylococcus aureus*. Inne badania wykazały, że aktywność stafylokinazy jest regulowana przez pewne białko powierzchniowe *S. aureus*, którym okazała się być enolaza. Czynniki te stanowią o bardzo inwazyjnym fenotypie gronkowców. Ekspresja enolazy na powierzchni komórki bakteryjnej stała się powszechnym mechanizmem, dzięki któremu dochodzi do niszczenia zewnątrzkomórkowej macierzy komórek gospodarza, co sprzyja inwazji i rozprzestrzenianiu się tych drobnoustrojów (Carneiro i in. 2004).

Specyficzne matrix, jakim jest biofilm, chroni drobnoustroje m.in. przed wmywaniem związanym z przepływem wody, krwi czy innych substancji z powierzchni, do której adherują. Antybiotykoterapia staje się nieskuteczna, gdyż utrudnione jest dotarcie substancji czynnych antybiotyku do wnętrza biofilmu (Goetz i in. 2017; Lister, Horswill 2014). Docieranie substancji aktywnych w głąb konsorcjum biofilmu staje się również problematyczne w przemyśle spożywczym oraz gastronomii. Drobnoustroje mogą adherować do różnych powierzchni mających następnie kontakt z żywnością (Vrinda, Menon 2016). Formując biofilm, stają się trudne do usunięcia zarówno w wyniku mechanicznego czy chemicznego czyszczenia przy pomocy detergentów i dezynfektantów (Watnick, Kolter 2000).

Elementy ACME (Arginine Catabolic Mobile Elements) są strukturami zaliczanymi do mobilnych wysp patogeniczności gronkowców. Po raz pierwszy zostały wykryte w genomie *S. aureus* USA 300, metycylinoopornego szczepu związanego ze środowiskiem pozaszpitalnym (Podkowik 2013). Szczepy koagulazo-ujemne uważane są za rezerwuar ACME (Tong i in. 2018). Wśród elementów ACME wyróżnia się dwie grupy genów: *arcA* oraz *opp-3*. Uważa się, że ACME mają korzystny wpływ na przeżywalność i wzrost drobnoustrojów w środowisku, co decyduje o ich wirulencji. ACME stanowią także o adaptacji *S. epidermidis* do niekorzystnych dla niego warunków mikroaerofilnych (Diep i in. 2006). Odkryto również, że istnieje fizyczne powiązanie między gronkowcowymi elementami ACME a *SCCmec* – chromosomową kasetą genową posiadającą geny warunkujące oporność na antybiotyki należące do klasy β -laktamów.

Szczególnie podkreślanym w literaturze problemem jest wciąż rosnąca oporność na metycylinę i związany z nią gen *mecA*, który utożsamiany jest już ściśle z gronkowcami. Oporny na metycylinę *S. aureus* produkuje specyficzne białko wiążące penicylinę, warunkujące obniżenie wrażliwości bakterii na wiele półsyntetycznych antybiotyków z grupy penicylin. Białko to kodowane jest przez wspomniany wyżej gen *mecA*, który stanowi element składowy gronkowcowej kasety chromosomowej *mec* (*SCCmec*) (Lakhundi i Zhang 2018). Oprócz

oporności na metycylinę, gen *mecA* występuje także jako czynnik warunkujący oporność na inne penicyliny przeciwgronkowcowe oraz cefalosporyny (Podkowiak 2013; Aarestrup i in. 2008).

Kolejnym genetycznym elementem świadczącym o wirulencji drobnoustrojów są transpozony zaliczane do MGEs (Mobile Genetic Elements). Aktywowane transpozony posiadają zdolność zmiany miejsca w genomie. Transpozony bakteryjne należące do tzw. transpozonów DNA i rodziny Tn niosą zwykle dodatkowe geny odpowiedzialne za oporność na antybiotyki (Babakhani i Oloomi 2018). Dobrze znanym przykładem takiego transpozonu jest element Tn1545, który niesie geny oporności na kanamycynę, aminoglikozydy, a także tetracykliny (Poyart-Salmeron i in. 1991). Głównym elementem koniugacyjnych transpozonów jest integraza – enzym należący do rodziny rekombinaz (Gillings 2014). Tn1545 jest spokrewniony pod kątem struktury i funkcji z Tn916, Tn918 oraz Tn 925 charakterystycznymi dla *Enterococcus faecalis*, a także Tn919 zidentyfikowanym wcześniej u *Streptococcus sanguis*. Wszystkie z wymienionych transpozonów, występując samodzielnie, są w stanie nieść geny oporności na tetracyklinę – *tet(M)*, jednak w połączeniu z Tn1545 warunkują także oporność na inne antybiotyki (Poyart-Salmeron i in. 1991). Chajęcka-Wierzchowska ze współpracownikami (2015) również zauważyła korelację potwierdzoną badaniami pomiędzy występowaniem genu oporności na tetracyklinę a obecnością w genomie bakteryjnym genu integrazy charakterystycznego dla rodziny koniugacyjnych transpozonów Tn916 – Tn1545, która dotyczyła bakterii *Staphylococcus* izolowanych z produktów żywnościowych gotowych do spożycia (RTE – ready to eat).

Mikrobiologiczne zanieczyszczenia żywności szczególnie zjadliwymi drobnoustrojami gronkowców wpływają na jej jakość oraz bezpieczeństwo, a co za tym idzie mogą one być przyczyną zatruc pokarmowych. Zatrucia wywołane spożyciem zanieczyszczonych produktów spożywczych wciąż stanowią ogromny problem. Zgodnie z danymi Światowej Organizacji Zdrowia każdego roku notuje się około 2 miliony zgonów powodowanych zatruciami pokarmowymi, wśród których głównym czynnikiem etiologicznym są właśnie gronkowce (Ścieżyńska i in. 2012).

Cel

Celem niniejszej pracy było oznaczenie obecności wybranych czynników wirulencji gronkowców wyizolowanych z produktów spożywczych gotowych do spożycia, produktów surowych pochodzenia roślinnego, zwierzęcego oraz roślinno-zwierzęcego, do których należały geny *int* (Tn1545/916), *icaA*, *icaD*, *eno*, *arcA*, *nuc* oraz *mecA*.

Materiały i metody

Przedmiot badań

Materiał do badań stanowiły wybrane produkty gotowe do spożycia w postaci sushi i sałatek pochodzące ze strefy gastronomicznej jednego z centrów handlowych w Olsztynie oraz nabiał, mięso i podroby wieprzowe, wołowe, drobiowe, a także warzywa i sałatki zakupione w sklepach i marketach znajdujących się na terenie Olsztyna. Do produktów pozyskanych ze strefy gastronomicznej w centrum handlowym należały: sushi z łososiem surowym, sushi z łososiem pieczonym, sushi z krewetkami oraz dwie sałatki (główne składniki sałatki nr 1: tuńczyk, jaja, sałata; główne składniki sałatki nr 2: szynka, ser, fasola czerwona) z dressingiem majonezowo-śmietanowym. Sushi pochodziło z lokalu, w którym poszczególne dania przygotowywane są z półproduktów bezpośrednio po zamówieniu przez klienta. Wybrane do badań sałatki pochodziły z kolei ze strefy gastronomicznej, gdzie wszystkie produkty wystawione były w otwartej ladzie, niezabezpieczonej szybą, do której klienci mają bezpośredni dostęp. Do produktów uzyskanych z marketu spożywczego należały: twaróg swojski, twaróg solankowy, ser kozi oraz serek Capri, które znajdowały się w dedykowanych przez producenta opakowaniach. Łącznie przebadano 30 różnych produktów spożywczych. Wszystkie pozyskane do badań produkty nie budziły zastrzeżeń pod kątem walorów sensorycznych i organoleptycznych. Materiał został przetransportowany do laboratorium w przeciągu 30 minut, po czym bezpośrednio przystąpiono do analiz.

Izolacja szczepów z rodzaju *Staphylococcus* z wybranych produktów spożywczych

Pierwszym etapem izolacji gronkowców było prenamnażanie. W tym celu odważono po 5 g każdego produktu i przeniesiono do jałowych probówek zawierających wodę peptonową, zworteksowano i inkubowano w warunkach 37°C/24 h. Jednocześnie tą samą metodą wykonano posiew do dwukrotnie stężonego płynnego podłoża Giolitti-Cantoni oraz inkubowano w warunkach 37°C/24 h. Po inkubacji wykonano posiew 0,1 ml z każdej probówki z wodą peptonową na podłoże stałe Baird-Parkera metodą powierzchniową oraz posiew redukcyjny z płynnego podłoża Giolitti-Cantoni na podłoże Baird-Parkera, po czym wszystkie posiewy inkubowano w 37°C przez 24 h.

Kolejnym krokiem był pasaż charakterystycznych dla gronkowców kolonii na podłoże stałe w postaci skosów agarowych z dodatkiem glukozy oraz inkubacja w warunkach 37°C przez 24 h.

Następnie przystąpiono do izolacji materiału genetycznego z uzyskanych na skosach agarowych charakterystycznych kolonii gronkowców przy pomocy zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology) do izolacji DNA zgodnie z protokołem producenta. Kolejnym etapem był pomiar stężenia wyizolowanego DNA przy pomocy spektrofotometru firmy Tecan. Uzyskany materiał genetyczny do momentu dalszych analiz przechowywano w -20°C .

Oznaczanie obecności elementów genetycznych odpowiedzialnych za wirulencję szczepów *Staphylococcus* spp.

Wyizolowany materiał genetyczny posłużył do określenia obecności 7 genów wybranych spośród czynników wirulencji u 59 szczepów gronkowców pochodzących z produktów spożywczych. W puli oznaczanych genów znalazły się geny odpowiedzialne za produkcję biofilmu u gronkowców (*eno*, *icaA*, *icaD*), gen o złożonej strukturze i funkcji należący do rodziny koniugacyjnych transpozonów *int* (Tn916/1545), gen oporności na metycylinę (*mecA*), jako element mający znaczenie kliniczne ze względu na problematyczną terapię zakażeń drobnoustrojami posiadającymi ten gen oraz możliwość szybkiego szerzenia się oporności poprzez mechanizm horyzontalnego transferu genów (HTG), gen kodujący termostabilną nukleazę (*nuc*), a także gen przyczyniający się do szybszego tempa wzrostu oraz dłuższej żywotności i możliwości kolonizacji

Tab. 1. Charakterystyka starterów wykorzystanych do identyfikacji poszukiwanych genów wirulencji.

Szukany gen	Sekwencja	Długość produktu [pz]	Temperatura przyłączenia starterów [$^{\circ}\text{C}$]	Referencje
<i>int</i> (Tn 916/1545)	F: 5'-GCGTGATTGTATCTCACT-3'	1028	50	Opracowanie własne
	R: 5'-GACGCTCCTGTTGCTTCT-3'			
<i>icaA</i>	F: 5'-TCTCTTG CAGGAGCAATCAA-3'	188	55	Arciola et al. 2001
	R: 5'-TCAGGCACTAACATCCAGCA-3'			
<i>icaD</i>	F: 5'-ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3'	198		
	R: 5'-CGTGTTTTCAACATTTAATGCAA-3'			
<i>eno</i>	F: 5'-ACGTGCAGCAGCTGACT-3'	302	62	Tristan et al. 2003
	R: 5'-CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC-3'			
<i>arcA</i>	F: 5'-CTAACACTGAACCCCAATG-3'	1946	52	Hellmark et al. 2013
	R: 5'GAGCCAGAAGTACGCGAG- 3'			
<i>nuc</i>	F: 5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3'	280	55	Barski et al. 1996
	R: 5'- AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3'			
<i>mecA</i>	F: 5'- AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3'	533		
	5'- AGTTCTGGCACTACCGGATTTGC-3'			

Źródło: opracowanie własne.

skóry człowieka (*arcA*). Oznaczenie obecności każdego z genów wymagało dostosowania specyficznego profilu czasowo-temperaturowego, jak też ilości i stężeń poszczególnych odczynników do reakcji PCR oraz zastosowania odpowiednio dobranych starterów dla danego genu, których sekwencje zawarte zostały w tabeli 1 i 2.

Tab. 2. Mieszaniny reakcyjne PCR dla poszczególnych genów.

Odczynnik	Ilość [μl]/ 1 reakcję (25μl)	Odczynnik	Ilość [μl]/ 1 reakcję (25μl)	Odczynnik	Ilość [μl]/ 1 reakcję (25μl)
<i>int</i> (Tn 916/1545)		<i>icaA, icaD, eno, arcA</i>		<i>mecA, nuc</i>	
Polimeraza Taq	0,2	Polimeraza RUN	1	Polimeraza Hypernova Red	0,6
Bufor Taq	1	Bufor RUN	2,5	Bufor Shark z Mg	2,5
MgCl ₂ [25mM]	1,5	MgCl ₂ [25mM]	1,5	MgCl ₂ [50mM]	1
Primer forward [10μM]	1	Primer forward [10μM]	2,5	Primer forward [10μM]	1
Primer reverse [10μM]	1	Primer reverse [10μM]	2,5	Primer reverse [10μM]	1
dNTPs [10μM]	0,5	dNTPs [10μM]	0,25	dNTPs [10μM]	2,5
Woda	17,8	Woda	10,75	Woda	13,4
DNA	2	DNA	4	DNA	1

Źródło: opracowanie własne.

Każdorazowo po wykonaniu reakcji PCR przeprowadzono rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym o stężeniu odpowiednim do wielkości szukanego produktu amplifikacji z dodatkiem 5 μl bromku etydyny.

Wyniki

Z analizy produktów uzyskanych po wykonanych rozdziałach elektroforetycznych oznaczanych genów wynika, że około 65% spośród 59 szczepów

Staphylococcus posiadało minimum 1 z 7 wybranych genów wirulencji. Szczegółowe dane dotyczące procentowego udziału szczepów z określoną liczbą genów wirulencji oraz występującymi kombinacjami tych genów zawarte zostały w tabeli 3.

Tab. 3. Procentowy udział szczepów z określoną liczbą gronkowcowych genów wirulencji.

Liczba szczepów	Liczba genów wirulencji	Genotyp wirulencji
21 (35,59%)	0	-
23 (38,98%)	1	<i>int</i> <i>eno</i> <i>nuc</i> <i>icaD</i>
10 (16,95%)	2	<i>icaD, eno (7x)</i> <i>int, arcA</i> <i>eno, arcA</i> <i>eno, mecA</i>
5 (8,47%)	3	<i>icaD, eno, nuc (3x)</i> <i>icaD, eno, arcA</i> <i>int, icaA, icaD</i>

*Dane zawarte w tabeli dotyczą wszystkich wyizolowanych szczepów gronkowców, zarówno z produktów RTE jak i produktów surowych.

Zródło: opracowanie własne.

Analizując frekwencję występowania genów zjadliwości wśród badanych szczepów gronkowców, można stwierdzić, że największy odsetek izolatów

posiadało gen *eno* (45,76%). Frekwencja pozostałych genów kształtowała się następująco: *icaD* – 23,73%, *int* (Tn 516/1545) – 13,56%, *nuc* – 6,78%, *arcA* – 5,08%, *mecA* – 1,69% oraz *icaA* – 1,69%.

Produktami spożywczymi wolnymi od szczepów gronkowców posiadających geny wirulencji okazały się być: serki Capri, kurczak gotowany, rzodkiewka, sałatka brokułowa z makaronem, sushi z łososiem pieczonym, twaróg swojski oraz żołądki kurze. Geny odpowiedzialne za tworzenie biofilmu (*eno*, *icaA*, *icaD*) u gronkowców odnotowano zarówno w produktach RTE, jak i w surowych oraz poddawanych obróbkom termicznym produktach mięsnych, przy czym geny *icaA* oraz *icaD* wykazały powinowactwo tylko do produktów mięsnych. Gen *int* (Tn916/1545) został odnotowany w 8 próbkach, które pochodziły z 6 produktów mięsnych oraz podrobów: karkówki wieprzowej, schabu wieprzowego, wątróbki wieprzowej, wieprzowiny mielonej, wołowiny, serc indyjskich. W przebadanych produktach nabiałowych odnotowano tylko 2 szczepy, które posiadały geny wirulencji – gen *eno* w materiale genetycznym szczepu pochodzącego z sera koziego oraz gen *nuc* w DNA szczepu pochodzącego z sera koziego solankowego. Gen kodujący termostabilną nukleazę gronkowcową pojawił się dodatkowo w 3 próbkach: kiełbasie wieprzowej surowej, udzie z kurczaka oraz wątróbce wieprzowej. Wykazano także obecność genu oporności na metycylinę, jednak tylko w przypadku szczepu wyizolowanego z jednej próbki. Wszystkie badane sałatki charakteryzowały się obecnością szczepów posiadających gen *eno* odpowiedzialny za produkcję biofilmu. Jeden szczep wyizolowany z sałatek charakteryzował się obecnością genu *arcA*, natomiast gen *icaD* zaobserwowano u 2 szczepów.

W świetle przeprowadzonych badań, widać wyraźną tendencję do obecności genu *int* (Tn916/1545) u szczepów gronkowcowych pochodzących z surowych produktów mięsnych. Najliczniej występujące geny odpowiedzialne za produkcję biofilmu nie wykazały powinowactwa do konkretnej grupy badanych produktów spożywczych.

Uwzględniając stosunek ilości szczepów wyizolowanych z poszczególnych grup produktów do ilości odnotowanych w ich genomach genów wirulencji, nie odnotowano znaczącej różnicy. Procentowy rozkład kształtował się na poziomie 64,1% szczepów z genami wirulencji wśród gronkowców izolowanych z produktów RTE oraz 65% wśród szczepów izolowanych z surowych produktów spożywczych (tabela 4).

Z uzyskanych danych wynika, że w produktach RTE najczęściej pojawiały się szczepy gronkowców posiadających gen *eno* (59%) oraz *icaD* (20,5%) przy jednoczesnym braku szczepów posiadających geny *icaA* oraz *int*. Surowe produkty spożywcze okazały się być najbardziej obfite w szczepy gronkowców

Tab. 4. Porównanie liczebności oraz procentowego udziału poszczególnych genów wirulencji w produktach surowych oraz RTE

Gen	Produkty RTE		Produkty surowe	
	Liczba genów	Procent	Liczba genów	Procent
<i>icaA</i>	0	0	1	5%
<i>icaD</i>	8	20,5%	6	30%
<i>eno</i>	23	59%	4	20%
<i>arcA</i>	2	5,1%	1	5%
<i>mecA</i>	1	2,6%	0	0
<i>nuc</i>	2	5,1%	2	10%
<i>int</i> (Tn916/1545)	0	0	8	40%

*Zawartość procentowa została wyliczona w odniesieniu do całkowitej liczby szczepów wyizolowanych z poszczególnych grup produktów spożywczych: 39 - całkowita liczba szczepów wyizolowanych z produktów RTE, 20 - całkowita liczba szczepów wyizolowanych z produktów surowych.

Źródło: opracowanie własne.

posiadających w swoim genomie geny *int* (40%) oraz *icaD* (30%). W produktach tych nie odnotowano jednak szczepów, które posiadałyby gen *mecA*.

Dyskusja

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano produkty spożywcze, które zgodnie z literaturą stanowią najczęstsze źródło izolacji szczepów *Staphylococcus* (Bianchii in. 2014). Są one w czołówce czynników etiologicznych będących przyczyną zatruc pokarmowych.

Oznaczona w powyższych badaniach obecność w żywności szczepów posiadających geny odgrywające rolę w tworzeniu biofilmu, w szczególności pojawiający się często gen *eno* oraz *icaD*, pozwala przypuszczać, że w przypadku panujących odpowiednich warunków w środowisku lub obecności czynników aktywujących ekspresję tych genów, szczepy te mogą tworzyć konglomeraty na powierzchniach niedokładnie wyczyszczonych, mających styczność z tą żywnością lub szczepy te mogą powodować trudne do zwalczania i/lub odnawialne infekcje. Dotyczy to zarówno szczepów gronkowców bytujących w żywności surowej jak i gotowej do spożycia, gdyż oba geny warunkujące zdolność do produkcji biofilmu zajmowały pozycję w pierwszej trójce najczęściej wystę-

pujących genów w tych produktach. W takiej sytuacji szczególnie istotne dla przemysłu spożywczego powinno być zwrócenie uwagi na stosowane stężenia wykorzystywanych środków dezynfekcyjnych, gdyż, jak podaje literatura, stężenia subletalne są przyczyną aktywacji ekspresji tych genów (Slany i in. 2017). Z przeprowadzonych badań wynika także, że wspomniane wcześniej geny często występują w parze w genomie tego samego szczepu gronkowca, co dodatkowo może potęgować biofilmotwórcze właściwości. Ponadto szczepy posiadające taką parę genów w kilku przypadkach okazały się być także nośnikami dodatkowego genu termostabilnej nukleazy (*nuc*), którego obecność w genomie bakterii infekującej organizm może warunkować niszczenie DNA komórek gospodarza nawet w warunkach podwyższonej temperatury ciała, charakterystycznej dla trwającego stanu zapalnego wywołanego na skutek ominięcia mechanizmów obronnych układu immunologicznego. Omawiany gen może warunkować także zdolność drobnoustroju do przetrwania w środowisku wysokiej temperatury związanej z obróbką termiczną produktu, w którym się znajduje. Jak podaje literatura, obecność genu *nuc* może wskazywać na szczep gronkowca należącego do rodzaju *S. aureus*, gdyż jest on charakterystyczny właśnie dla tych mikroorganizmów (Młynarczyk i in. 2000). Szczepy gronkowców charakteryzujących się genotypem wirulencji *icaD*, *eno* czy *icaD*, *eno*, *nuc* w każdym z przypadków stanowiły najczęściej pojawiający się wzorzec. Gen *icaD* stanowi jednak w głównej mierze czynnik regulatorowy, aktywujący ekspresję genu *icaA* odpowiedzialnego za produkcję PIA, więc wirulencja związana z produkcją biofilmu będzie prawdopodobnie wzmożona u szczepów, które posiadają w genomie oba wspomniane geny, jak w przypadku kombinacji genowej *int*, *icaA*, *icaD* odnotowanej w izolacie pochodzącym z karkówki wieprzowej.

Uwagę zwraca także gen integrazy *int* (Tn916/1545), którego obecność odnotowano jako najczęstszą wśród szczepów pochodzących z produktów surowych. Integraza jest istotna pod względem wirulencji, zważywszy na fakt, iż katalizuje ona reakcję rekombinacji występującą pomiędzy specyficznym miejscem integronu (*att*) a kasetami genowymi posiadającymi nowe geny wirulencji (Gillings 2014). Biorąc pod uwagę znaczenie obecności tego genu w żywności, należy zauważyć, że jest on izolowany nie tylko z próbek żywności skontaminowanych przez *S. aureus*, ale występuje on także w genomie szczepów koagulazo-ujemnych. Literatura wskazuje także, że obecność genu *int* Tn (916-1545) wiąże się z włączaniem do genomu bakteryjnego genów oporności na antybiotyki, m.in. tetracyklinę czy kanamycynę (Chajęcka-Wierzchowska i in. 2018; Liu i in. 2017). Zatem, ze względu na wysoki odsetek szczepów posiadających ten gen zjadliwości, rozważyć można ewentualne występowanie w genomie tych

szczepów również wspomnianych wcześniej genów tetracyklino- czy kanamycynooporności. W powyższej pracy odnotowano jednak również przypadek szczepu, w genomie którego genowi integrazy towarzyszyły oba oznaczane geny należące do operonu *ica*. Może to świadczyć o preferencji katalizowania włączania przez gen integrazy nie tylko genów antybiotykooporności, ale także genów warunkujących produkcję biofilmu, jednak w celu uzyskania jednoznacznych wniosków należałoby powtórzyć badania, skupiając się wyłącznie na tym aspekcie. O ile drobnoustroje niosące gen integrazy mogą zostać wyeliminowane w procesie obróbki termicznej produktów surowych, którym dedykowane są takie zabiegi przed spożyciem, nie zostaną one jednak usunięte z produktów RTE, które takiej obróbki nie wymagają. W związku z tym odnotowanie braku obecności w badanych próbkach żywności gotowej do spożycia omawianego genu integrazy jest pozytywnym aspektem, biorąc pod uwagę bezpieczeństwo tego typu żywności. Przeciwny wynik zaobserwował zespół Chajęckiej-Wierzchowskiej (2018).

Ważną kwestię dla bezpieczeństwa żywności stanowi także fakt, iż mało licznymi genami wśród badanych szczepów gronkowców były geny *arcA*, dzięki czemu uznać można, że szczepy te będą bardziej podatne na działanie niekorzystnych czynników środowiska poszczególnych produktów spożywczych, jak m.in. niskie pH większości produktów nabiałowych. Niemniej zadowalającą sytuacją jest odnotowanie obecności genu *mecA* wyłącznie w przypadku jednego szczepu pochodzącego z jednej z sałatek. Wynik ten może być wczesną podstawą do założeń, iż coraz częściej nagłaśniany problem pojawiających się na szeroką skalę szczepów gronkowców metycylinoopornych w żywności wydaje się zanikać. Jest to jednak wczesna hipoteza, której prawdziwość należałoby potwierdzić szerszymi badaniami w tym kierunku.

Analiza wyników badań, która wskazuje na obecność wszystkich wybranych genów wirulencji wśród wyizolowanych z żywności szczepów gronkowców oraz fakt, że 65% z owych szczepów posiadało minimum jeden gen badany świadczy o tym, iż żywność wciąż stanowi rezerwuuar drobnoustrojów o wysokiej zjadliwości. Powyższe badania podkreślają istotę oraz aktualność problemu obecności gronkowców w żywności dostępnej na rynku. Jest to złożona kwestia, na rozwiązanie której musi składać się rzetelna praca zarówno producentów, w rękach których leży dbałość o wysoką jakość mikrobiologiczną dostarczanych produktów oraz zgodne z zaleceniami działania konsumenta, co do wykorzystywanej żywności. Rozwiązaniem tego problemu mogą być także badania nad opracowaniem nowego, bezpiecznego dla konsumenta dodatku do żywności, działającego hamująco na wzrost *Staphylococcus* spp. lub praca nad doskonaleniem środków przeciwdrobnoustrojowych dostępnych na rynku, jakimi są

m.in. bakteriocyny produkowane przez szczepy bakterii kwasu mlekowego, które według Zielińskiej (2016) są szczególnie skuteczne wobec *S. aureus*.

Podsumowanie i wnioski

Zarówno surowe produkty spożywcze przeznaczone do obróbki termicznej przez konsumenta, jak i produkty gotowe do spożycia stanowią źródło bytowania gronkowców o wysokiej zjadliwości. Gronkowce bytujące w surowych produktach spożywczych mogą przyczyniać się do szerzącego się problemu związanego z nabywaniem i rozprzestrzenianiem się genów związanych z wirulencją i antybiotykoopornością. Przeważająca w badanej żywności liczba szczepów gronkowców posiadająca geny odpowiedzialne za tworzenie biofilmu podkreśla istotę zwrócenia uwagi przez producentów żywności na rodzaj oraz stężenia stosowanych środków dezynfekcyjnych używanych w celu utrzymania higieny procesu technologicznego.

Literatura

- Aarestrup F., Wegener H., Collignon P. 2008. Resistant in bacteria of the food chain: epidemiology and control strategies. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ter.*, 6: 733-750.
- Babakhani S., Oloomi M. 2018. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J. Basic Microbiol.*, 1-13.
- Carneiro C. R., Postol E., Nomizo R., Reis L. F., Brentani R. R. 2003. Identification of enolase as laminine-binding protein on the surface of *Staphylococcus aureus*. *Microbes Infect.*, 6: 604-608.
- Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Nalepa B., Sierpińska M., Łaniewska-Trokenheim Ł. 2015. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origine phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food Microbiol.*, 46: 222-226.
- Cucarella C., Solano C., Valle J., Amorena B., Lasa I., Penades J. R. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.*, 183(9): 2888-2896.
- de Silva G. D. I., Kantzanou M., Justice A., Massey R. C., Wilkinson A. R., Day N. P. J., Peacock S. J. 2002. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J. Clin. Microbiol.*, 40(2): 382-388.
- Diep B. A., Gill S. R., Chang R., Phan T., Chen J. H., Davidson M. G., Lin F., Lin J., Carleton H. A., Mongodin E. F., Sensabaugh G. F., Perdreau-Remington F.

2006. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 367: 731-739.
- Gillings M. R. 2014. Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 78(2): 257-277.
- Goetz C., Tremblay Y. D., Lamarche D., Blondeau A., Gaudreau A. M., Labrie J., Jacques M. 2017. Coagulase-negative staphylococci species affect biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci. *J. Dairy Sci.*, 100(8): 6454-6464.
- Lakhundi S., Zhang K. 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 31(4): 1-103.
- Lister J. L., Horswill A. R. 2014. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect. Microbiol.*, 4:178.
- Otto M. 2010. *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Rev. Dermatol.*, 5(2): 183-195.
- Podkowik M. 2013. Genotypy, antybiotykooporność oraz czynniki wirulencji gronkowców koagulazo-ujemnych izolowanych z żywności gotowej do spożycia. Mskr. pracy doktorskiej. Uniwersytet przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław, 98 ss.
- Poyart-Salmeron C., Trieu-Cuot P., Carlier C., Courvalin P. 1991. Nucleotide sequences specific for Tn1545-like conjugative transposons in pneumococci and staphylococci resistant to tetracycline. *Antimicrob. Agents Ch.*, 35(8): 1657-1660.
- Salaberry S. R. S., Saldenberga B. S., Zuniga E., Melville P. A., Santos F. G. B., Guimaraes E. C., Benites N. R. 2015. Virulence factors genes of *Staphylococcus* spp. isolated from caprine subclinical mastitis. *Microb. Pathog.*, 85: 35-39.
- Ścieżyńska H., Maćkiw E., Mąka Ł., Pawłowska K. 2012. Nowe zagrożenia mikrobiologiczne w żywności. *Rocz. Państw. Zakł. Hig.*, 63(4): 397-402.
- Tong C., Wu Z., Zhao X., Xue H. 2018. Arginine catabolic mobile elements in livestock-associated methicillin-resistant staphylococcal isolates from bovine mastitic milk in China. *Front. Microbiol.*, 9:1031.
- Tristan A., Ying L., Bes M., Etienne J., Vandenesch F., Lina G. 2003. Use of multiplex PCR to identify *Staphylococcus aureus* adhesins. *J. Clin. Microbiol.*, 41(9): 4465-4467.
- Vrinda Menon K. 2016. Biofilm and food industry. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.*, 3(4):137-142.
- Watnick P., Kolter R. 2000. Biofilm, city of microbes. *J. Bacteriol. Res.*, 10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000

ABSTRACT

GENETIC ELEMENTS RESPONSIBLE FOR THE VIRULENCE OF *STAPHYLOCOCCUS* STRAINS ISOLATED FROM THE FOOD

The aim of the study was to determine the virulence of 59 staphylococcal strains isolated from the food based on determination of chosen genes: *icaA*, *icaD*, *eno*, *arcA*, *mecA*, *nuc* and *int* (Tn916/1545) responsible for different virulence mechanisms. Samples were collected from 30 raw and RTE products came from food places and markets in Olsztyn. Bacterial isolates were obtained using culture method. The presence of genes was determined by PCR reaction with specific primers and optimized thermal - time profiles. Results of the study indicate that 65% of all strains had at least one virulence gene. Both group of food (raw and RTE) were similar contaminated by strains with virulence genes. The most frequent genes were *eno*, *icaD* and *int* (Tn916/1545) where integrase gene was characteristic only for raw products. The most popular virulence genotype was *icaD*, *eno*.

Słowa kluczowe: *Staphylococcus*, żywność, geny wirulencji, biofilm

Keywords: *Staphylococcus*, food, virulence genes, biofilm

Dane do kontaktu z autorem:

martyna.but@uwm.edu.pl

Sandra Gašiorowska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Biologii i Biotechnologii

Koło Naukowe Neuroanatomów NEURON

Opiekun: dr hab. Anna Robak, prof. UWM

IMMUNOREAKTYWNOŚĆ KALBINDYNY W POLU PRZEDWZROKOWYM U KAWII DOMOWEJ (*CAVIA PORCELLUS*) W OKRESIE PŁODOWYM

Wstęp

Pole przedwzrokowe (POA) w mózgowiu dojrzałych ssaków w osi przednio-tylnej rozciąga się od przegrody kresomózgowia do pola przedniego podwzgorza, po obu stronach płaszczyzny pośrodkowej mózgowia. Na skrawkach poprzecznych zajmuje obszar między spoidłem przednim i brzusznią powierzchnią mózgowia w okolicy skrzyżowania nerwu wzrokowego i zachyłka przedwzrokowego (recessus preopticus, rp). W rozwoju zarodkowym POA leży brzusznie względem wyniosłości zwojowej przyśrodkowej, która jest nieobecna u dojrzałych osobników (Flames i in. 2007). W okresie embrionalnym neuroepitelium przedniej ściany zachyłka rp generuje neurony dla POA, które następnie jest źródłem neuronów dla innych ośrodków kresomózgowia m.in. przegrody, ciała migdałowatego, prążkowiec oraz kory (m.in. Hirata i in. 2009; Flandin i in. 2010; Gelman i in. 2009). POA bierze udział w regulacji wielu funkcji związanych z somatycznym i autonomicznym układem nerwowym, głównie w aspekcie reprodukcji i zachowań rozrodczych samców i samic oraz opieki macierzyńskiej (Hurtazo i in. 2008; Rosenblatt, Ceus 1997). POA bierze również udział w regulacji rytmiki okresów snu i czuwania (Sallanon i in. 1989). Jest również włączone w kontrolę pobierania wody, regulację osmotyczną oraz w kontrolę neuroendokrynną i sekrecję wazopresyny (McKinley i in. 2015). Nieprawidłowy rozwój POA może zaburzać migrację neuronów GABAergicznym do kory, dla której POA u myszy jest źródłem ok. 10% interneuronów (Gelman i in. 2009). Zaburzenia neurorozwojowe mogą mieć

odległe konsekwencje w życiu postnatalnym, np. mogą powodować rozwój schizofrenii (Duchatel i in. 2019).

W różnorodnych funkcjach neuronów w POA wspomaga kalbindyna D-28k (CB), która w okresie rozwoju bierze udział w migracji i różnicowaniu się neuronów (Baimbridge i in. 1992). CB decyduje o homeostazie wapniowej w komórce i ma wpływ na procesy zależne od jonów wapnia. Może ona także pełnić rolę transportera lub niekanonicznego sensora jonów wapniowych (Schwaller 2009; Schmidt 2012). CB współwystępuje z białkiem jądrowym NeuN (neuronal nuclear protein) w neuronach postmitotycznych, dlatego białka te mają znaczenie diagnostyczne w normie i patologii (Sarnat i in. 1998; Heizmann, Schafer 1990).

Istnieją opracowania POA u ssaków dojrzałych płciowo, m.in. u kawii (np. Bogus-Nowakowska i in. 2010). Jednakże badania ontogenetyczne, ponieważ są żmudne i znacznie trudniejsze do przeprowadzenia, są prowadzone w znacznie mniejszym zakresie. Ostatnio przeprowadzone badania immunohistochemiczne w ontogenezie POA u kawii (Bogus-Nowakowska 2018) wykazały, że komórki CB-immunoreaktywne (CB-ir) występują w 40. dniu życia płodowego (E40) i ich populacja już na tym etapie jest dymorficzna płciowo. Jednakże brakuje danych, czy komórki CB-ir występują już we wcześniejszych stadiach rozwojowych (np. E30). Kawia domowa wydaje się doskonałym organizmem modelowym do badań procesów rozwojowych, ze względu na wiele podobieństw do naczelnych (Wallen, Baum 2002; Bartesaghi, Severi 2004; Kaiser, Sachser 2005). Kawia ma stosunkowo długi okres ciąży (ok. 68 dni) w przeciwieństwie do innych gryzoni laboratoryjnych, np. szczura (21 dni) i myszy (19 dni). Dlatego też większość procesów rozwoju mózgowia u tego gatunku odbywa się w okresie prenatalnym. Noworodki kawii rodzą się z dobrze rozwiniętym układem nerwowym. Są zdolne do pobierania pokarmu i przemieszczania się w obrębie gniazda, chociaż wymagają opieki rodzicielskiej (Clancy i in. 2007).

Cel pracy

Celem niniejszych badań jest detekcja immunoreaktywnych neuronów zawierających kalbindynę i analiza stopnia różnicowania się komórek nerwowych na obszarze POA u kawii domowej w drugim trymestrze ciąży (stadium E30). Wiadomo, że CB występuje w POA kawii w E40 (Bogus-Nowakowska 2018). Zatem interesujące wydaje się zbadanie czy neurony CB-ir występują na wcześniejszych etapach rozwoju osobniczego. Uzyskane dane mogą pomóc w określeniu roli CB w procesie różnicowania się neuronów POA, które stanowią źródło interneuronów hamujących dla wielu sąsiednich struktur POA.

Materiały i metody

Badania przeprowadzono na 6 płodach kawii domowej (*Cavia porcellus*) z 30. oraz 31. dnia rozwoju wewnątrzmacicznego (E30, E31). Preparaty wykonano techniką parafinową i mrożeniową. Mózgowia po utrwaleniu w 4% paraformaldehydzie zatopiono w bloczki parafinowe lub zamrożono w temp. -80°C . Skrawki krojono w płaszczyźnie strzałkowej i złożonej płaszczyźnie poprzeczno-horyzontalnej (wskutek zgięcia głowowego mózgowia zarodka). Skrawki parafinowe grubości $20\ \mu\text{m}$ barwiono fioletem krezylowym wg metody Nissla; skrawki mrożeniowe grubości $10\ \mu\text{m}$ barwiono techniką immunoenzymatyczną DAB (3,3'-diaminobenzzydina) z wykorzystaniem przeciwciał przeciwko kalbindynie D-28k (1:1000, Swant) oraz przeciwko białku neuronalnemu NeuN (1:1000, Millipore). Kontrolę specyficzności przeciwciał i pojedyncze barwienia immunoenzymatyczne przeprowadzono zgodnie z procedurami stosowanymi w badaniach immunohistochemicznych na mózgowiach kawii domowej (Hermanowicz-Sobieraj, Robak 2017; Bogus-Nowakowska 2018). Dokumentację wyników badań wykonano z wykorzystaniem mikroskopu fluorescencyjnego BX51 (Olympus, Japan) połączonego z kamerą CC12 (Olympus, Japan) do pobierania obrazów i z zestawem komputerowym wyposażonym w oprogramowanie Cell B (Soft Images System, GmbH, Germany).

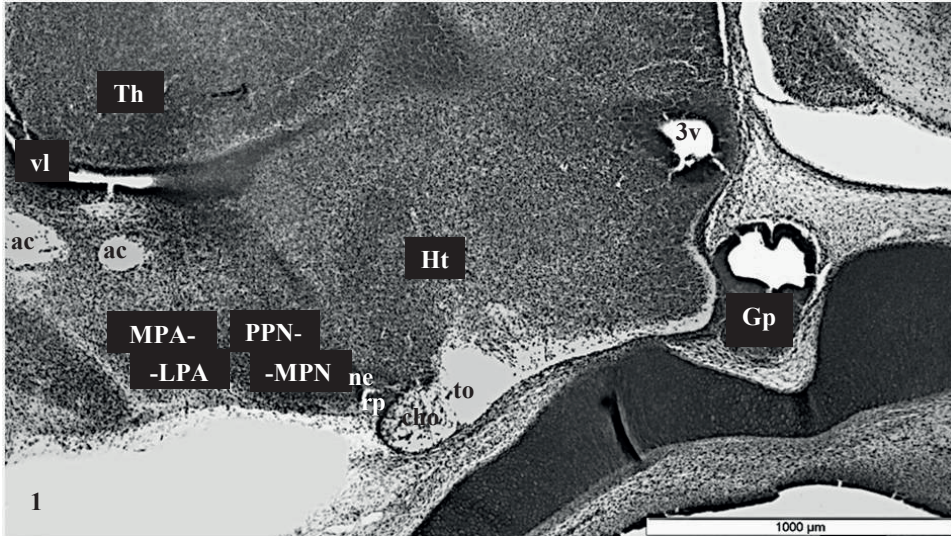
Wyniki badań

Pole przedwzrokowe (POA) w drugim trymestrze ciąży (E30 i E31) zajmuje obszar, którego grzbietowa krawędź graniczy ze spoidłem przednim, a brzuszna dochodzi do skrzyżowania nerwów wzrokowych, zachyłka przedwzrokowego i dolnej krawędzi mózgowia (ryc. 1-4).

Analiza histologiczna POA w E31 (ryc. 1, 5A). Biegun przedni POA sąsiaduje ze strukturami kresomózgowia, ale nie jest wyraźny w barwieniu fioletem krezylowym. Topografię POA określono na podstawie charakterystycznych punktów topologicznych (commissura anterior, recessus preopticus). Komórki przy zachyłku przedwzrokowym, przy neuroepitelium (ne) są ułożone ściśle. Tworzą one zwarty kompleks dwóch jąder nerwowych: okołokomorowego (PPN) i pośrodkowego (MPN), między którymi jest bardzo trudno wyznaczyć granicę (PPN-MPN). Pozostały obszar różnicującego się POA ma luźniej rozmieszczone komórki i tworzy kompleks MPA-LPA. Granica między polem przyśrodkowym (MPA) a bocznym (LPA) jest również trudna do wyróżnienia.

Komórki nerwowe w POA na skrawkach barwionych fioletem krezylowym (ryc. 5A) mają głównie perykariony zaokrąglone, nieliczne mają wrzecionowaty kształt. Wymiar tych komórek dochodzi do $10\ \mu\text{m}$. W neuropłazmie

Ryc. 1. Przekrój strzałkowy przez mózgowie kawii domowej na wysokości pola przedwzrokowego w E31. metoda Nissla; ac – spoidło przednie, cho – skrzyżowanie wzrokowe, Gp – przysadka mózgowa, Ht – podwzgórze, MPA-LPA – komplekspole przedwzrokowe przyśrodkowe – pole przedwzrokowe boczne, ne – neuroepitelium, PPN – MPN – kompleks jądro przedwzrokowe okołokomorowe-jądro przedwzrokowe pośrodkowe, rp – zachyłek przedwzrokowy, Th – wzgórze, to – pasmo wzrokowe, vl – komora boczna, 3v –komora trzecia. Podziałka 1000 μm

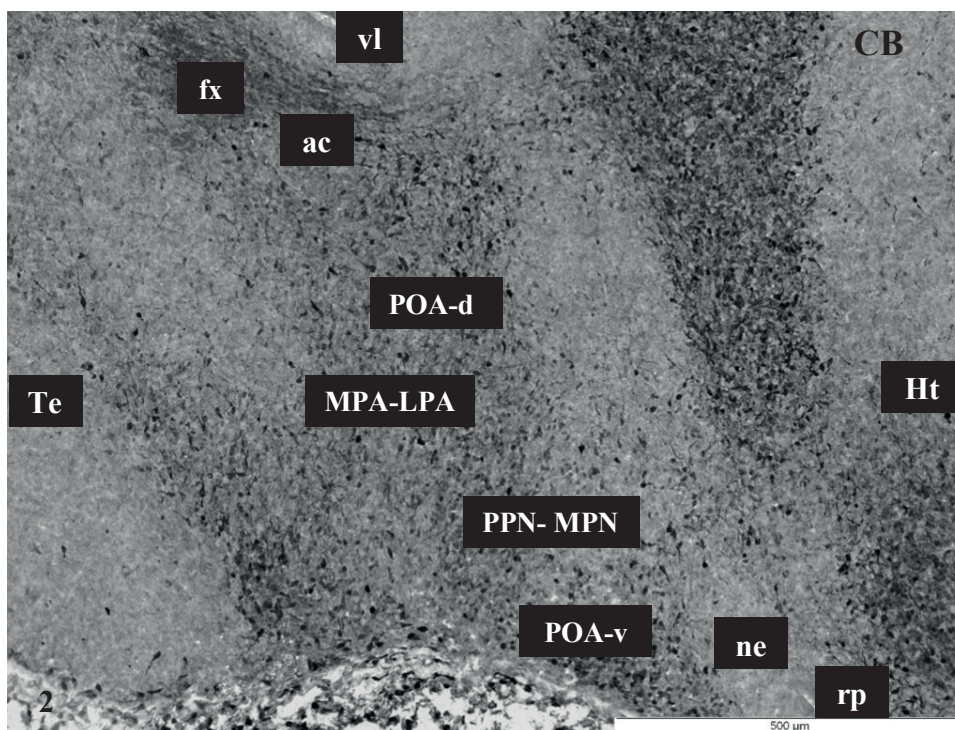


Źródło: Opracowanie własne

komórek występuje niewielka ilość substancji tigruidowej, rozmieszczonej peryferycznie. Natomiast w wypustkach cytoplazmatycznych istota tigruidowa na ogół nie jest widoczna. Jądro komórkowe w większości komórek jest stosunkowo duże i jasno wybarwione oraz występuje w nim intensywnie wybarwione jąderko.

Analiza immunohistochemiczna POA w E30 (ryc. 2, 3, 5 C, D). Na obszarze POA stwierdzono występowanie zróżnicowanej dystrybucji CB-immunoreaktywnych komórek nerwowych (CB-ir). CB-ir komórki były rozmieszczone nieregularnie, ale zaobserwowano dwa skupienia, w których CB-ir neurony były gęściej ułożone. Ze względu na ich topografię, jedno skupienie nazwano grupą grzbietową (POA-d), a drugie grupą brzuszną (POA-v). Na przekroju strzałkowym CB-ir neurony w POA-d układały się w formie pionowego pasma komórek. Dookoła tego obszaru neurony CB-ir były rozmieszczone luźno

Ryc. 2. Przekrój strzałkowy przez mózgowie kawii domowej na wysokości pola przedwzrokowego w E30. Struktury immunoreaktywne zawierające CB, metoda DAB. ac – spoidło przednie, cho – skrzyżowanie wzrokowe, MPA-LPA – kompleks pole przedwzrokowe przyśrodkowe-pole przedwzrokowe boczne, ne – neuroepitelium, PPN – MPN – kompleks jądro przedwzrokowe okołokomorowe-jądro przedwzrokowe pośrodkowe, POA-d – grupa grzbietowa komórek CB-ir, POA-v – grupa brzuszna komórek CB-ir, rp – zachyłek przedwzrokowy, Te – kresomózgowie, Ht – podwzgórze, vl – pasmo wzrokowe, vl – komora boczna. Podziałka 500 μ m.

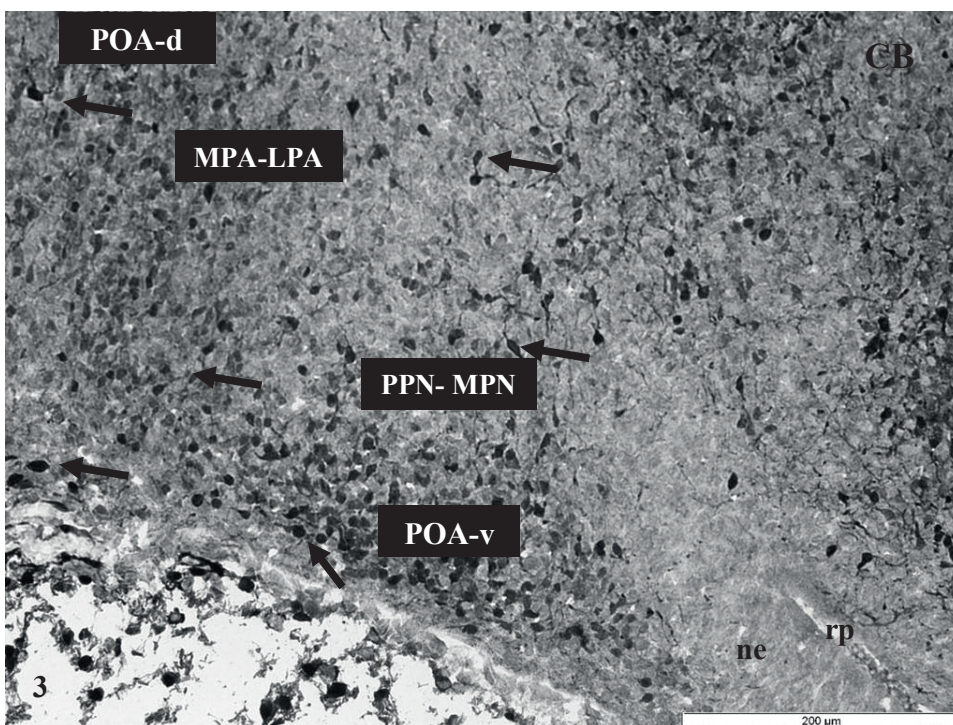


Źródło: Opracowanie własne

i nierównomiernie. Neurony CB-ir w POA-v tworzyły skupienie w kształcie owalu, poziomo ułożonego przy brzusznej krawędzi mózgowia. Na przekrojach strzałkowych, koniec tylny POA-v przylegał ściśle do CB-negatywnego neuroepitelium rp. Natomiast przy końcu przednim POA-v pojedyncze komórki CB-ir były rozmieszczone wzdłuż powierzchni brzusznej mózgowia i w kierunku przednim dochodziły do struktur kresomózgowie.

CB-ir komórki w POA-v miały głównie zaokrąglone perykariony, mierzące od 7,5 do 10 μ m. W niektórych komórkach były widoczne stosunkowo krótkie

Ryc. 3. Przekrój strzałkowy przez mózgowie kawii domowej na wysokości pola przedwzrokowego w E30 (powiększenie fragmentu ryc. 2). Widoczne jest nierównomierne rozmieszczenie komórek CB-ir na obszarze różnicującego się POA. CB-ir neurony w POA-v są ściśle ułożone przy negatywnym względem CB neuroepitelium. MPA-LPA – kompleks pole przedwzrokowe przyśrodkowe-pole przedwzrokowe boczne, ne – neuroepitelium, PPN-MPN – kompleks jądro przedwzrokowe okołokomorowe-jądro przedwzrokowe pośrodkowe, POA-d – grupa grzbietowa komórek CB-ir, POA-v – grupa brzuszna komórek CB-ir, rp – zachylek przedwzrokowy, strzałka wskazuje komórki CB-ir o morfologii komórek migrujących. Podziałka 200 μm .

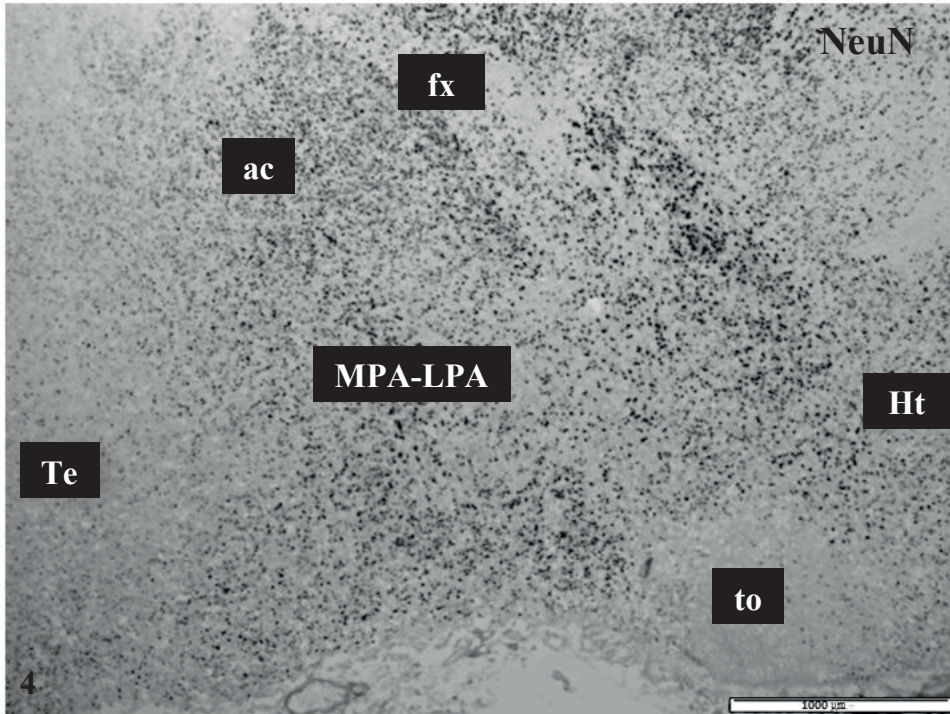


Źródło: Opracowanie własne

(do 10 μm długości) wypustki cytoplazmatyczne. Intensywność immunoreakcji w kierunku CB była zróżnicowana, od bardzo wysokiej do niskiej. Na ogół jądro komórkowe wykazywało wysoki poziom immunoreakcji, w przeciwieństwie do jąderka (ryc. 5C).

W POA-d, oprócz perykarionów zaokrąglonych, występowały również perykariony owalne, o wymiarach wzdłuż osi długiej od 9 do 12,5 μm . Ich wypustki cytoplazmatyczne osiągały długość do 41 μm . Większość tych wypustek była

Ryc. 4. Przekrój strzałkowy przez boczną część różnicującego się POA kawii domowej w E30. Struktury immunoreaktywne zawierające NeuN, metoda DAB; ac – spoidło przednie, fx – sklepienie, MPA-LPA – kompleks pole przedwzrokowe przyśrodkowe-pole przedwzrokowe boczne, Te – kresomózgowie, Ht – podwzgórze, to – pasmo wzrokowe. Podziałka 1000 μm .



Źródło: Opracowanie własne

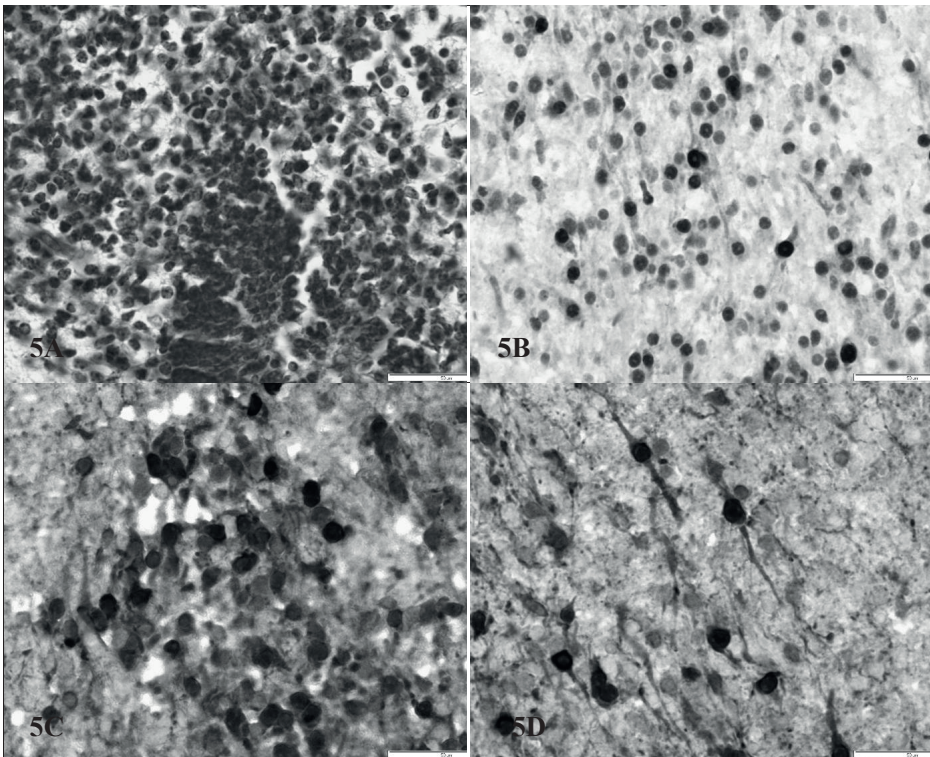
zorientowana wzdłuż osi pionowej. Jądro komórkowe wykazywało wysoki poziom immunoreakcji względem CB, w przeciwieństwie do jąderka (ryc. 5D).

Komórki CB-ir występujące między POA-d i POA-v oraz na pozostałym obszarze POA wykazywały słabszy poziom immunoreakcji, natomiast komórki neuroepitelium zawsze były CB-negatywne.

NeuN-immunoreaktywne struktury (NeuN-ir) zaobserwowano w całym obszarze POA (ryc. 4, 5B). Komórki zawierające białko NeuN były rozmieszczone bardziej równomiernie w porównaniu z komórkami CB-ir. NeuN-ir komórki wykazywały silniejszą immunoreakcję w jądrach neuronów. W części bocznej POA komórki NeuN-ir miały większe wymiary, w przeciwieństwie do NeuN-ir komórek usytuowanych w okolicy zachyłka przedwzrokowego. Również po-

ziom immunoreakcji był silniejszy w neuronach położonych dalej od zachyłka, w porównaniu z neuronami rozmieszczonymi w jego pobliżu. Ze względu na rozmiary jąder komórkowych, wykazujących zazwyczaj silną immunoreakcję w kierunku NeuN (ryc. 5B), wyróżniono dwie subpopulacje komórek. Komórki w pierwszej subpopulacji były stosunkowo nieliczne i zawierały duże NeuN-ir jądra (7,5-10 μm), natomiast w drugiej subpopulacji wymiary jąder były mniejsze (5,5 do 7 μm) i miały znacznie bardziej zróżnicowany poziom immunoreakcji. W subpopulacji pierwszej zaobserwowano owalne jądra z dwoma jąderkami (ryc. 5B). Wyrostki cytoplazmatyczne zawierały nieznaczne ilości białka i trudno było niekiedy określić granicę między wypustką a perykarionem. Na ogół wypustki wyznakowane białkiem NeuN były dłuższe i lepiej widoczne w porównaniu z wypustkami neuronów wybarwionych fioletem krezyłowym.

Ryc. 5. Rodzaje komórek na obszarze różnicującego się POA w E30 na przekrojach strzałkowych. A: Fiolet krezyłu, metoda Nissla; B: komórki NeuN-immunoreaktywne, metoda DAB; C-D: komórki CB-immunoreaktywne, metoda DAB; wszystkie podziałki 100 μm .



Źródło: Opracowanie własne

Dyskusja

Niniejsze badania po raz pierwszy wykazały, że w 30. dniu życia płodowego u kawii domowej (II trymestr) różnicujące się komórki w obszarze POA zawierają kalbindynę D-28k, marker specyficznych subpopulacji neuronów postmitotycznych. CB jest białkiem wiążącym wapń, które reguluje homeostazę jonową w komórkach nerwowych (bufor wapnia). Ponadto, białko to pełni rolę w detekcji sygnału wapniowego (sensor jonów wapnia) i w przekazywaniu sygnałów do cytoplazmy komórki oraz do jądra (przekaznik drugorzędowy). CB, podobnie jak NeuN, uczestniczy w wielu ważnych funkcjach neuronów na poziomie molekularnym, które nie zostały jednak do końca poznane.

Badania wykazały, że w okresie płodowym (E30-E31) POA jest utworzone przez zróżnicowaną populację komórek nerwowych pod względem dystrybucji, wielkości perykarionów i intensywności immunoreakcji w kierunku CB i NeuN. Na podstawie cytoarchitektury w POA kawii domowej w E31 wyróżniono dwa zasadnicze kompleksy neuronów PPN-MPN oraz MPA-LPA. Ze względu na ścisłe ułożenie komórek nie można przeprowadzić granicy między jądrami lub polami nerwowymi tworzącymi te kompleksy, tzn. jądrem okołokomorowym (PPN) i jądrem pośrodkowym (MPN), jak również między polem przyśrodkowym (MPA) i polem bocznym (LPA). Analogiczny podział zastosowano w badaniach morfometrycznych POA u osobników dojrzałych płciowo (Bogus-Nowakowska i in. 2010). Różnice w wielkości komórek między MPA i LPA oraz w części przyśrodkowej POA (w regionach dymorficznych płciowo) u kawii domowej stwierdzono już we wcześniejszych badaniach (Bogus-Nowakowska i in. 2010; Byne i in. 1987).

W przeprowadzonych badaniach zaobserwowano różnice w intensywności wybarwienia jąder komórkowych w POA, co może wskazywać na zróżnicowaną czynność transkrypcyjną (García-Cabezas, Zikopoulos2019). Stwierdzono, że wielkość perykarionów jest związana ze strukturą jądrowej chromatyny i wielkością jąderka, a nie z obecnością kolców dendrytycznych lub określonym neuroprzekaznikiem (García-Cabezas, Zikopoulos2019). W niniejszych badaniach duże perykariony w POA kawii domowej zawierały duże, jasne jądro, podobnie jak neurony projekcyjne w korze mózgowej, w których euchromatyna nie wybarwia się barwnikami stosowanymi w metodzie Nissla, a jądro wygląda jak „puste”. Geny, które podlegają transkrypcji, są łatwo dostępne w trybie tzw. „otwartej euchromatyny», natomiast geny nietranskrybowane są zagęszczane, tworząc agregaty heterochromatyny. Wydaje się, że czynność transkrypcyjna neuronów POA koreluje z aktywną rolą tego ośrodka jako centrum regulacji różnicowania płciowego mózgowia oraz centrum proliferacyjnego interneuronów dla wielu struktur podkorowych i kory mózgowej (Gelman i in. 2009).

Według Byne i in. (1987) neurogeneza w jądrach niedymorficznych POA u kawii kończy się wcześniej niż w dymorficznych, w których trwa do E31. Niniejsze badania wykazały, że w E31 na obszarze POA występują CB-ir neurony w specyficznych lokalizacjach. CB-ir komórki wykazywały wysoką zawartość CB i miały morfologię komórek migrujących, m.in. występowały ponad neuroepitelium rp, przy brzusznej powierzchni mózgowia oraz w grupie POA-d. Wydaje się, że obecność CB w neuronach może mieć wpływ na regulację fali wapniowych, jak również na pojawianie się spontanicznej aktywności neuronów, kształtujących obwody neuronalne. W procesach migracji oraz aktywności elektrofizjologicznej komórek, które są zależne od jonów wapnia, CB wydaje się pełnić ważne funkcje. W E30 dystrybucja CB (niniejsze badania) wykazuje pewne różnice w porównaniu z E40 (Bogus-Nowakowska 2018). Może to wynikać ze stadiów rozwojowych, jak również z analiz przeprowadzonych na rzeczywistych płaszczyznach poprzecznych w E40. Takiej płaszczyzny nie można uzyskać w E30 ze względu na zgięcie głowowe mózgowia, dlatego większość obserwacji przeprowadza się w płaszczyźnie strzałkowej. Niektóre neurony CB-ir w POA-d w E30 mogą być w trakcie migracji z POA do struktur limbicznych (Hirata i in. 2009; Gelman i in. 2009). Należy dodać, że neurony POA należą do grupy neuronów najwcześniej generowanych w części podkorowej mózgowia, ale ich proces różnicowania komórkowego wykazuje długi okres latencji (Keyser 1979). To może również wpływać na zróżnicowanie stopnia dojrzałości morfologicznej i funkcjonalnej neuronów w badanym ośrodku.

Kalbindyna jest uznanym markerem określonych stanów patologicznych (Heizmann, Schafer 1990). Stwierdzono m.in., że w chorobie Alzheimera poziom kalbindyny D-28k i jej mRNA obniża się (Baimbridge i in. 1985). Kalbindyna w określonych strukturach w ontogenezie wykazuje ekspresję przejściową lub stałą. W POA kawii domowej od E30 (niniejsze badania) CB ma ekspresję stałą aż do dorosłości (Bogus-Nowakowska 2018), co wskazuje, że pełni ona bardzo ważną rolę w czynności tego ośrodka. Zdania na temat ochronnej czynności CB (neuroprotekcji) w neuronach są nadal podzielone. Niektórzy badacze twierdzą, że CB może być czynnikiem współdziałającym w mechanizmach chroniących ośrodki dymorficzne płciowo przed apoptozą (Sickel, McCarthy 2000). Wpływ na różnicowanie cytoarchitektury POA ma wiele czynników, w tym proliferacja i migracja komórek, apoptoza oraz czynniki troficzne i hormonalne (Byne i in. 1987; Jacobson i in. 1985; Park i in. 1996, 1998; Dodson, Gorski 1993; Davis i in. 1996).

NeuN jest wysoce specyficznym markerem neuronalnym w mózgowiach płodów człowieka, chociaż wyjątkiem są np. mitralne komórki w opuszkach węchowych, fotoreceptory siatkówki oraz komórki Cajal-Retziusa i Purkinjego,

które nigdy nie są immunoreaktywne dla tego antygenu (Mullen i in. 1992). NeuN jest dobrym markerem późnych faz różnicowania komórkowego i nie daje pozytywnej immunoreakcji w komórkach nerwowych, które nie osiągnęły stadium rozwojowego zbliżonego do czynności dojrzałych komórek (Sarnat i in. 1998). Większość komórek będących w czasie podziału mitotycznego nie jest jeszcze rozpoznawana przez NeuN, podobnie jak neuroepitelium zachyłka przedwzrokowego u kawii w E30 (niniejsze badania). NeuN jest stałym regulatorem funkcji komórek na poziomie molekularnym – głównie w jądrze komórkowym i został zidentyfikowany jako białko Fox-3 z ekspresją tylko w komórkach nerwowych (Mullen i in. 1992). Wykazano, że przeciwciała przeciwko NeuN rozpoznają tylko ufosforylowane formy tego białka (Guselnikova, Korzhevskiy 2015). Białko NeuN jest markerem jądrowym, ale może występować również w cytoplazmie. Jest to uwarunkowane krótką sekwencją aminokwasową, która odpowiada za lokalizację subkomórkową dwóch izoform NeuN (Guselnikova, Korzhevskiy 2015). Wyniki badań wskazują, że w schizofrenii poziom komórek NeuN pozytywnych, jak i GABAergicznych wzrasta w istocie białej (Duchatel i in. 2019).

Podsumowanie

Niniejsze badania prezentują po raz pierwszy dowody na występowanie CB-immunoreaktywnych neuronów w POA kawii domowej w 30. dniu rozwoju płodowego. Ekspresja CB stwierdzona w E30 (niniejsze badania) trwa przez następny okres ontogenezy, aż do uzyskania dojrzałości płciowej (Bogus-Nowakowska 2018). CB występuje w zróżnicowanej cytologicznie i morfologicznie podpopulacji neuronów, z których część ma morfologię komórek migrujących, co jest zgodnie z obserwacjami u innych gatunków ssaków. Biorąc pod uwagę dystrybucję i immunoreaktywność komórek zawierających NeuN (marker komórek dojrzałych do pełnienia swoich funkcji), można gradient rozwojowy POA u kawii w E30 określić jako boczno-przyśrodkowy („outside-in”). Niniejsze wyniki sugerują, że proliferacja komórek rp jest kontynuowana, co można wnioskować z wysokiego nabłonka neuroepitelium wybarwionego fioletem krezyłowym. Ponadto, w barwieniu immunohistochemicznym komórki te były zawsze CB-negatywne i NeuN-negatywne. Te obserwacje korelują z ostatnimi wynikami badań molekularnych, które wskazują, że POA jest ośrodkiem proliferacji interneuronów dla wielu struktur podkorowych i kory mózgowej.

W podsumowaniu można stwierdzić, że CB jest białkiem w istotny sposób zabezpieczającym prawidłowe różnicowanie się POA u kawii domowej od 30. dnia rozwoju wewnątrzmacicznego.

Literatura:

- Andressen C., Blümcke I., Celio M. R. 1993. Calcium binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res.*, 271: 181-208.
- Baimbridge K. G., Celio M. R., Rogers J. H. 1992. Calcium-binding proteins in the nervous system. *Trends Neurosci.*, 15(8): 303-308.
- Baimbridge K. G., Moody I., Miller J. J. 1985. Reduction of rat hippocampal calcium binding protein following commissural, amygdala, septal, perforant path and olfactory bulb kindling. *Epilepsia.*, 26: 460-465.
- Bogus-Nowakowska K. 2018. Ontogeny of Neurons Containing Calcium-Binding Proteins in the Preoptic Area of the Guinea Pig: Sexually Dimorphic Development of Calbindin. *Dev Neurobiol.*, 79(2): 175-201. doi:10.1002/dneu.22662
- Bogus-Nowakowska K., Robak A., Sztejn S., Równiak M., Wasilewska B., Najdzion J. 2010. A morphometric study of the preoptic area of the guinea pig. *Folia Morphol.*, 69(1): 15-23.
- Byne W., Warren J. T., Siggielkow I. 1987. Medial preoptic sexual dimorphisms in the guinea pig. II. An Investigation of Medial Preoptic Neurogenesis. *J. Neurosci.*, 7(9): 2697-2702.
- Celio M. R. 1990. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience*, 35: 375-475.
- Clancy B., Kersh B., Hyde J., Darlington R. B., Anand K. J. S., Finlay B. L. 2007. Web-based method for translating neurodevelopment from laboratory species to humans. *Neuroinformatics*, 5: 79-94.
- Davis E. C., Popper P., Gorski R. A. 1996. The role of apoptosis in sexual differentiation of the rat sexually dimorphic nucleus of the preoptic area. *Brain Res.*, 734: 10-18.
- Duchatel R. J., Shannon Weickert C., Tooney P. A. 2019. White matter neuron biology and neuropathology in schizophrenia. *NPJ Schizophr.*, 8: 5(1): 10. doi: 10.1038/s41537-019-0078-8.
- Flames N., Pla R., Gelman D. M., Rubenstein J. L. R., Puelles L., Marín O. 2007. Delineation of Multiple Subpallial Progenitor Domains by the Combinatorial Expression of Transcriptional Codes. *J. Neurosci.*, 27(36): 9682-9695.
- García-Cabezas M. A., Zikopoulos B. 2019. Evolution, development, and organization of the cortical connectome. *PLoS Biol.*, 17(5): e3000259. doi:10.1371/journal.pbio.3000259
- Gelman D. M., Martin F. J., Nobrega-Pereira S., Pieroni A., Kessarlis N., Marin O. 2009. The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *J. Neurosci.*, 29: 9380-9389.
- Guselnikova V. V., Korzhevskiy D. E. 2015. NeuN As a Neuronal Nuclear Antigen and Neuron Differentiation Marker. *Acta Naturae*, 7(2): 42-47.

- Heizmann C. W., Schafer B. W. 1990. Internal calcium-binding proteins. *Cell Biol.*, 1: 277-282.
- Hermanowicz-Sobieraj B., Robak A. 2017. The ontogenetic development of neurons containing calcium-binding proteins in the septum of the guinea pig: Late onset of parvalbumin immunoreactivity versus calbindin and calretinin. *J. Chem. Neuroanat.* 79: 22-31.
- Hirata T., Li P., Lanuza G. M., Cocas L. A., Huntsman M. M., Corbin J. G. 2009. Identification of distinct telencephalic progenitor pools for neuronal diversity in the amygdala. *Nat. Neurosci.*, 12: 141-149.
- Hurtazo H. A., Parades R. G., Agmo A. 2008. Inactivation of the medial preoptic area/anterior hypothalamus by lidocaine reduces male sexual behavior and sexual incentive motivation in male rats. *Neuroscience*, 152: 331-337
- Jacobson C. D., Gorski R. A. 1981. Neurogenesis of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 196: 519-529.
- Kaiser S., Sachser N. 2005. The effects of prenatal social stress on behaviour: mechanisms and function. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 29: 283-294.
- Keyser A. 1979. Development of the Hypothalamus in Mammals. An investigation into its morphological position during ontogenesis. [w:] *Handbook of the hypothalamus. Vol. 1. Anatomy of the hypothalamus.* Marcel Dekker, Inc. New York, Basel.
- Mallard C., Loeliger M., Copolov D., Rees S. 2000. Reduced number of neurons in the hippocampus and the cerebellum in the postnatal guinea pig following intrauterine growth-restriction. *Neuroscience*, 100(2): 327-333.
- McKinley M. J., Yao S. T., Uschakov A., McAllen R. M., Rundgren M., Martelli D. 2015. The median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. *Acta Physiol. (Oxf.)* 214: 8-32.
- Mullen R. J., Buck C. R., Smith A. M. 1992. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development.*, 116: 201-211
- Park J. J., Baum M. J., Paredes R. G., Tobet S. A. 1996. Neurogenesis and cell migration into the sexually dimorphic preoptic area/anterior hypothalamus of the fetal ferret. *J. Neurobiol.*, 30: 315-328.
- Rosenblatt J. S., Ceus K. 1998. Estrogen implants in the medial preoptic area stimulate maternal behavior in male rats. *Horm. Behav.* 33(1): 23-30.
- Sarnat H. B., Nochlin D., Born D. E. 1998. Neuronal nuclear antigen (NeuN): a marker of neuronal maturation in the early human fetal nervous system. *Brain Dev.*, 20: 88-94.
- Schmidt H. 2012. Three functional facets of calbindin D-28k *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 5(25): 1-7.
- Schwaller B. 2009. The continuing disappearance of “pure” Ca²⁺ buffers. *Cell. Mol. Life Sci.*, 66: 275-300.

- Sickel M., McCarthy M. 2000. Calbindin-D28k immunoreactivity is a marker for a subdivision of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area of the rat: developmental profile and gonadal steroid modulation. *J. Neuroendocrinol.*, 12(5): 397-402.
- Tobet S. A., Hanna I. K. 1997. Ontogeny of sex differences in the mammalian hypothalamus and preoptic area. *Cell. Mol. Neurobiol.*, 17: 565-601.

ABSTRACT

CALBINDIN IMMUNOREACTIVITY IN THE PREOPTIC AREA OF THE GUINEA PIG (*CAVIA PORCELLUS*) IN THE FETAL STAGE

The aim of the study was to analyse the immunoreactive structures containing calbindin D-28k (CB) and neuronal marker (NeuN) at E30 stage in the preoptic area (POA) of the guinea pig (*Cavia porcellus*) in the fetal development. Microscope scraps were made using the paraffin technique (Nissl method) or the freezing technique (DAB method). Studies have shown that POA at E30 is a region in the course of cytological and anatomical differentiation. Based on the differentiated immunoreaction of cells containing NeuN, it can be concluded that POA neurogenesis occurs according to the "outside-in" pattern. The distribution of CB-containing cells in POA at E30 may indicate (1) a differentiating analogous centre to CALB-SDN; (2) the continuation of cell migration mainly in the dorsal (vertical) group in which cells with the morphology of migrating cells and to a lesser extent in the ventral (horizontal) group were observed. The least mature cells occurred in the periventricular region, closely adjacent to the neuroepithelium of the preoptic recess. To sum up, CB immunoreactive structures are already present at E30 stage in the POA of the guinea pig (this study) and may undergo dimorphic differentiation that was found at the E40 stage (Bogus-Nowakowska 2018).

Słowa kluczowe: pole przedwzrokowe, kawia domowa, budowa komórkowa, kalbindyna, NeuN

Keywords: preoptic area, guinea pig, cell structure, calbindin, NeuN

Dane do kontaktu z autorem:

sandrag9808@gmail.com

Natalia Gorczyca, Patrycja Bujalska, Paweł Podobiński

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Studenckie Koło Naukowe Zoologów i Ekologów

Opiekun: dr Dariusz Łupicki

BEHAWIORALNE SKUTKI EKSPOZYCJI ROZDĘTKI ZAOSTRZONEJ *PHYSELLA ACUTA* NA NANOSREBRO

Wstęp

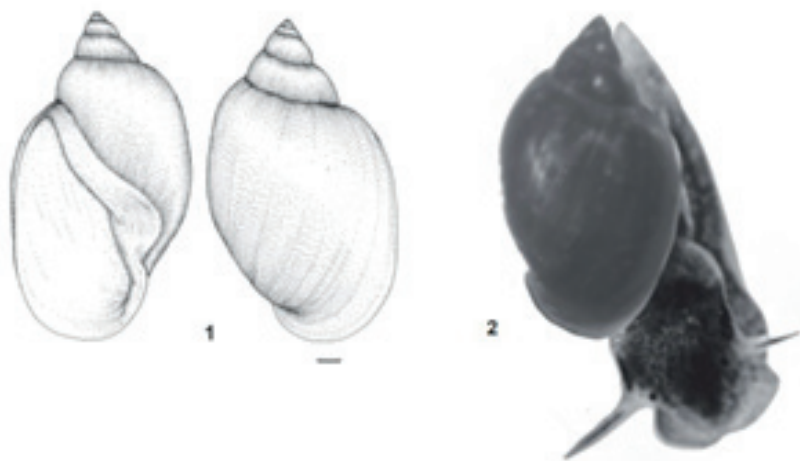
Nanosrebro, dzięki swojej wysokiej aktywności biologicznej i silnym właściwościom zwalczania drobnoustrojów chorobotwórczych, jest coraz częściej wykorzystywane w wielu gałęziach przemysłu, między innymi w produkcji wyrobów medycznych, materiałów przeznaczonych do konserwacji żywności, odzieży sportowej i farb (Świdwińska-Gajewska, Czerczak 2014). Z powodu tych technologii coraz więcej cząsteczek nanosrebra dostaje się do środowiska, wywierając negatywny wpływ na żyjące w nim organizmy. Badania wykazują działanie neurotoksyczne i genotoksyczne nanosrebra oraz jego szkodliwy wpływ na rozrodczość organizmów, a także silne właściwości molluskocydalne przy zastosowaniu wysokich stężeń (Wang i in. 2012). Biodostępność nanosrebra dla organizmów jest bardzo różnorodna. Nanocząsteczki srebra mogą być wchłaniane drogą pokarmową, inhalacyjną i dermalną do krwioobiegu, skąd trafiają do narządów wewnętrznych (Świdwińska-Gajewska, Czerczak 2014). Stwierdzono, że rozmiar nanocząsteczek wpływa na dystrybucję w tkankach, wnikanie do komórek i toksyczność – mniejsze cząsteczki są bardziej szkodliwe. Badania pokazują, że w tkankach żywych następuje utlenianie AgNPs (ang. *silvernanoparticles*) do jonów Ag(I), które ulegają reakcjom kompleksowania z białkami, głównie w nerkach i wątrobie, u ślimaków w wątrobotrzustce (Malejko, Godlewska-Żyłkiewicz 2015). Cząstki nanosrebra są często wykorzystywane dzięki swoim silnym właściwościom przeciwdrobnoustrojowym. Produkty zawierające nanosrebro uwalniają je do środowiska w postaci nanocząsteczek, agregatów i aglomeratów nanocząsteczek lub jonów rozpuszczalnych stanowią-

cych potencjalne zagrożenie dla życia i zdrowia ludzi oraz ekosystemów. Badania wykazują toksyczny wpływ nanosrebra na bakterie, nicienie i komórki ryb (Wang i in. 2012). Badania ekotoksykologiczne wykazują wysoką toksyczność nanosrebra na organizmy wodne. Najczęściej badanymi organizmami wodnymi są ślimaki słodkowodne, ryby i glony. Mechanizmy toksyczności nanosrebra obejmują zwiększenie poziomu wewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu, a w konsekwencji uszkodzenie białka i DNA oraz interferencje jonów srebra z enzymami komórkowymi (Völker i in. 2014).

Rozdętka zaostrowana *Physella acuta* z rodziny rozdętkowatych *Physidae* jest kosmopolitycznym, słodkowodnym i ciepłolubnym ślimakiem płucodysznym (Michnowska 2016). Rozdętki wchodzą w wiele interakcji międzygatunkowych i są szeroko rozpowszechnione w ekosystemach wodnych, stanowiąc pokarm dla organizmów na wyższych poziomach troficznych. Antropogeniczne zanieczyszczenia wód nanosrebrem zakłócają te oddziaływania przez wywieranie toksycznego wpływu na organizmy, zmniejszając ich vitalność i behavior (Bernot, Brandenburg 2013). *P. acuta* posiada wydłużoną, gładką i półprzezroczystą muszlę (rys. 1) o średniej długości 16 mm i średniej szerokości 9 mm. Występuje w większości wód słodkich na świecie (Paraense, Pointier 2003). Zasiedla zbiorniki o wodach płytkich, stojących lub wolno płynących, o mulistym lub piaszczystym podłożu, porośnięte bujną roślinnością i położone na terenach nizinnych i wyżynnych.

Główną drogą rozprzestrzeniania jest handel akwarystyczny (Strzelec i in. 2006). Transfer do kolejnych zbiorników lub środowiska naturalnego następuje najczęściej poprzez rośliny wodne, do których przyczepiane są pakiety z jajami (Michnowska 2016). Rozdętka jest wszystkożerna, jednak żywi się głównie detrytusem i martwymi tkankami roślin (Strzelec i in. 2006). Jest niezwykle płodnym i ruchliwym gatunkiem, dlatego w niektórych krajach uznawana za gatunek inwazyjny. W Polsce ma status gatunku obcego, po raz pierwszy pojawiła się w 1912 roku w okolicach Opola, w kanałach zrzutowych elektrociepłowni (Michnowska 2016). Okres rozmnażania rozpoczyna się w kwietniu i kończy w sierpniu. Młode rozwijają się po 20 dniach, a dojrzałość płciową osiągają po 17-18 miesiącach (Paraense, Pointier 2003). Mimo stosowania popularnych praktyk dezynsekcyjnych, różne stadia rozwojowe rozdętek wydają się być odporne na znaczną część dostępnych w handlu preparatów o działaniu moluskocydalnym. Mimo to badacze podkreślają stenotopowy charakter rozdętek względem czynników abiotycznych, jak również zanieczyszczeń pochodzenia antropogenicznego (Bernot, Brandenburg 2013). Z tego względu są one dobrymi obiektami badawczymi do analizowania toksycznego wpływu różnych substancji w środowisku wodnym.

Rys. 1. Rozdętka zaostzona *Physella acuta*
1. Muszla 2. Pelzający osobnik. Skala = 1mm.



Źródło: Paraense, Pointier 2003

Celem pracy jest przedstawienie wyników badań nad wpływem wybranych stężeń nanosrebra na behavior rozdętki zaostzonej *Physella acuta* w warunkach laboratoryjnych. Za cele szczegółowe obrano zbadanie występowania i nasilenia różnic w aktywności lokomotorycznej i rozmieszczeniu, uwzględniając analizę śmiertelności.

Material i metody

Materiał badawczy stanowiło 96 osobników *Physella acuta*, podzielonych na 8 grup badawczych, po 12 osobników każda. Osobniki odławiano losowo z wcześniej przygotowanego zbiornika zarodowego, w którym populacja była utrzymywana od grudnia 2018 roku. Pochodzenie populacji nie jest znane; wiadomo jedynie, że drogą zawleczenia był handel akwarystyczny. Osobniki były głodzone na 3 dni przed rozpoczęciem eksperymentu.

Do przygotowania roztworów badawczych wykorzystano srebrną wodę firmy nano-Tech o stężeniu 50 mg/L, rozcieńczaną odchlorowaną wodą kranową. Układ eksperymentu stanowiło 8 zbiorników o pojemności 25 L. W każdym z nich umieszczono 5 l roztworu nanosrebra o następujących stężeniach: 50, 25, 10, 5, 2,5, 1 i 0,5 mg/L. Ostatni zbiornik, zawierający wyłącznie odchlorowaną wodę, stanowił próbę kontrolną. W trakcie eksperymentu utrzymywano poziom natlenienia, temperaturę i odczyn pH wody w granicach nieodbiegających

od wymagań gatunku (7-9 mg O₂/L, 18-22°C, 7-8 pH). Wszystkie zbiorniki podlegały równomiernemu, sztuczному oświetleniu w reżimie 12-godzinnym.

Gotowe roztwory wiano do zbiorników na dzień przed wprowadzenie grup badawczych, w celu wyrównania temperatury wody z otoczeniem i równomiernego rozproszania cząstek nanosrebra. W trakcie 7-dniowej ekspozycji odnotowywano ogólną aktywność lokomotoryczną, tendencje w tworzeniu skupisk, położenie początkowe i wyjściowe, zdolność i chęć do konsumpcji oraz rozrodu, a także objawy zachowań anormalnych. Szczególną uwagę zwrócono na rozmieszczenie osobników i ich aktywność dyspersyjną oraz zdolność do eksploracji zbiornika w pierwszej godzinie ekspozycji. Obserwacji dokonywano codziennie, w godzinach okołopołudniowych, przez okres nie krótszy niż 1 godzina. Przed każdą kolejną obserwacją sprawdzano śmiertelność grup. Kontroli podlegały nieaktywne osobniki znajdujące się na podłożu zbiornika lub pływające po powierzchni wody. Osobniki martwe rozpoznawano po braku reakcji ruchowej na bodziec mechaniczny (ukłucie tępo zakończoną igłą); następnie usuwano je ze zbiornika i umieszczano w 70-procentowym roztworze etanolu. Osobniki znajdujące się na ściankach zbiornika traktowano domyślnie jako żywe, niepodlegające kontroli mechanicznej. Próbę karmienia przeprowadzono na osobnikach, które przeżyły pierwszą dobę ekspozycji. Wykorzystano pokarm akwarystyczny Ichtio-vit firmy Tropical, aplikowany po 1 granulce na osobnika. Po zakończeniu ekspozycji dokonano pomiarów wysokości muszli wszystkich osobników (pomiar od najniższego punktu wargi do szczytu muszli). Ślimaki, które przeżyły tygodniową ekspozycję, przenoszono grupami do szklanych zlewek o pojemności 250 ml, zawierających czystą, odchlorowaną wodę. W tak przygotowanej rekonwalescencji odnotowywano czas potrzebny pozostałym osobnikom na odzyskanie pełnej aktywności lokomotorycznej.

Uzyskane dane poddano analizie statystycznej z wykorzystaniem programu Excel i Statistica v.13.0. Do wykazania zależności między rozmiarem ślimaków a śmiertelnością w poszczególnych stężeniach wykorzystano test Tukeya. Rozmiary muszli poszczególnych grup badawczych porównano w oparciu o średnią arytmetyczną. Analiza behawioralna została zaprezentowana w postaci etogramu. Dane liczbowe pozwoliły na scharakteryzowanie wpływu poszczególnych stężeń nanosrebra na śmiertelność, położenie oraz aktywność ślimaków. Uzyskane wyniki zaprezentowano w postaci diagramów i wykresów.

Wyniki badań

Pomiary wysokości muszli zebrano w tabeli 1. Test Tukeya nie wykazał istotnej statystycznie zależności między rozmiarem ślimaków a śmiertelnością.

Średnia wysokość muszli badanych osobników we wszystkich zbiornikach była zbliżona i wynosiła 6,32 mm.

Tab. 1. Pomiary wysokości muszli rozdętki zaostrej *Physella acuta* w poszczególnych zbiornikach.

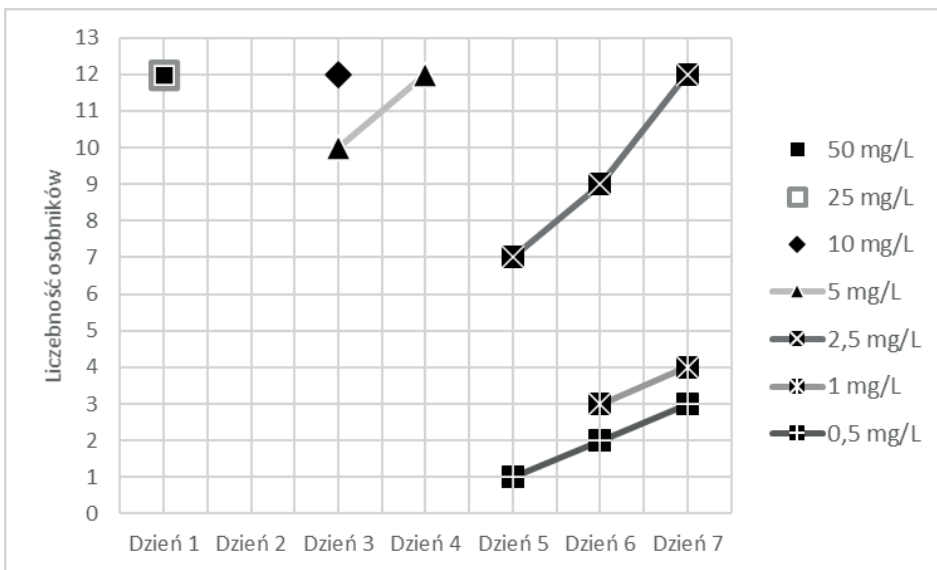
Stężenie nanosrebra w zbiorniku	50 mg/L	25 mg/L	10 mg/L	5 mg/L	2,5 mg/L	1 mg/L	0,5 mg/L
Długość muszli w mm	6,1	7,2	6,7	6,4	7,3	6,69	7,1
	4,82	4,85	6,58	5,7	6,7	5,38	6,08
	6,68	5,26	7,16	5,76	6,28	7,16	6
	5,92	6,38	7,96	4,8	7,9	5,7	7,1
	5,7	7,1	5,76	6,23	6,18	7,1	6,4
	5,3	7	4,8	6,68	6,18	7,9	5,7
	7,36	6,8	7,2	6,71	5,34	6,4	6
	6,8	6,34	4,85	7,6	6,6	5,8	6,7
	6,8	5,32	5,24	6,3	6,5	7	5,5
	6,14	6,6	6,38	7,15	5,7	6,8	6,7
	7,22	6,5	7,12	5,78	6,72	6,34	6,25
7,4	5,72	5,98	6,45	5,76	6	7	
Średnia długość muszli w mm	6,35	6,26	6,31	6,3	6,43	6,52	6,38

Źródło: Opracowanie własne

Przeprowadzona analiza śmiertelności przedstawia 100-procentową śmiertelność w 5 badanych stężeniach w czasie ekspozycji (wyk.1). Dla stężeń 50 i 25 mg/L próba wymarła tuż po wprowadzeniu osobników do zbiornika. Największa śmiertelność wypadła w dni parzyste. Na podstawie danych o śmiertelności można oszacować, że dawka nanosrebra LC_{50} dla *Physella acuta* znajduje się w przedziale 1-2,5 mg/L.

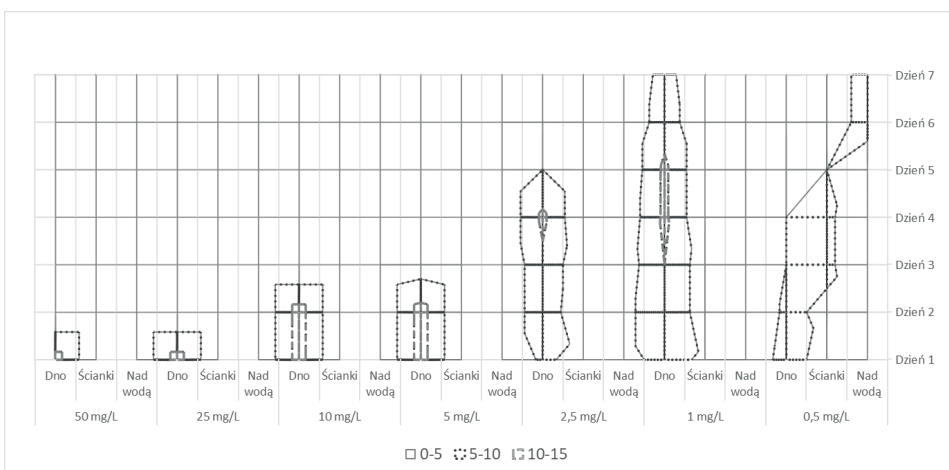
Na załączonym wykresie 2 przedstawiono zmiany w rozmieszczeniu ślimaków zależnie od stężenia. Dostrzegalne zmiany wynikają z faktycznego przemieszczenia ślimaków ku szczytowym partiom zbiornika. Przebieg tego zjawiska ma podłoże behawioralne, związane z aktywnością lokomotoryczną ślimaków. Osobniki przebywające w wyższych stężeniach doznawały znacznego porażenia; podejmowały próby ruchu, jednak rytmika ruchów mięśni stopy była zaburzona i niejednostajna. Dostrzegalna była również nieprawidłowa praca mięśnia kolumnkowego, odpowiadająca za przyciąganie i ukierunkowanie muszli. Oprócz tego reakcją wielu osobników było naprzemienne przekręcanie głowy w lewą i prawą stronę, co wskazuje na problemy o podłożu neurologicznym. W większości przypadków problemy te skutecznie utrudniały lub

Wyk. 1. Wykres śmiertelności ślimaków w czasie ekspozycji na nanosrebro. W przypadku osiągnięcia 12, cała próba uznana jest za zakończoną.



Źródło: Opracowanie własne

Wyk. 2. Wykres rozmieszczenia ślimaków względem stężenia w czasie. Grubość linii obrazuje zagęszczenie.



Źródło: Opracowanie własne

uniemożliwiały poruszanie. Dotkliwość tej reakcji malała wraz ze stężeniem nanosrebra. Częściową aktywność lokomotoryczną ślimaki utrzymywały w stężeniu $<2,5$ mg/L. W stężeniach 1 i 0,5 mg/L widoczne były wyraźne tendencje w przemieszczaniu się przeciwnie do dna zbiornika.

Ogólna aktywność lokomotoryczna rozdętek we wszystkich próbach była wyraźnie zmniejszona w stosunku do próby kontrolnej. Ślimaki nie wykazywały zainteresowania pokarmem ani kopulacją. Miały zaburzoną koordynację ruchową i problemy z orientacją w przestrzeni oraz zaburzenia procesów decyzyjnych. Po wrzuceniu do zbiorników ślimaki przemieszczały się w kierunku krawędzi zbiornika, później ich aktywność spadała, nie tworzyły skupisk. Część ślimaków przebywała nad powierzchnią wody, sporadycznie podchodząc ku powierzchni. W kontakcie z powierzchnią obserwowano podchodzenie wody pod wargę muszli, do momentu aż cały ślimak został nią pokryty. Po kilkukilkunastu minutach wracały nad powierzchnię, gdzie przebywały przyklejone nieruchomo przez resztę dnia. Większe osobniki wykazywały wyższą aktywność niż osobniki mniejsze.

Dyskusja

Z powodu wzrastającego z roku na rok wykorzystania nanosrebra w przemyśle, wzrasta także ilość odpadów zawierających toksyczny nanometal (Oliver i in. 2014; Faunce, Watal 2015). Szkodzi ono środowisku poprzez swoje biobójcze działanie na organizmy żyjące w glebie i wodzie, takie jak bakterie, sinice, drobne bezkręgowce i ryby (Bernot, Brandenburg 2013; Oliver i in. 2014). Naukowcy z całego świata zdają sobie sprawę z powagi problemu nanometali w środowisku, dlatego prowadzi się szereg badań nad biodostępnością nanosrebra dla organizmów wodnych i lądowych, jego toksycznością oraz metodą zapobiegania aktualnej sytuacji.

Badania prowadzone przez Faunce i Watal pokazują, że cząsteczki nanosrebra akumulują się wzdłuż łańcucha pokarmowego i hamują bakterie azotowe przyswajające wolny azot z powietrza, zaburzając obieg azotu w ekosystemie (Faunce, Watal 2015). Toksyczne działanie nanosrebra może wynikać również z jego reaktywności i indukowania powstawania reaktywnych form tlenu. Toksyczność nanosrebra jest wyższa u organizmów filtrujących wodę, na przykład u małży (Griffitt i in. 2008). Badania prowadzone przez McLaughlin i Bonzogo na pstrągach potokowych *Oncorhynchus mykiss*, strzeblach grubogłowych *Pimephales promelas* i dafniach *Daphnia magna* wykazują zwiększenie toksyczności jonowej srebra na organizmy wodne w wyniku zwiększenia stężenia nanosrebra z 0 na 2 mg/L (McLaughlin, Bonzogo

2012). W naszych badaniach obserwowaliśmy negatywny wpływ cząsteczek nanosrebra już w stężeniu 0,5 mg/L, w stężeniu 2,5 mg/L efekt ten był znaczący, na co wskazuje stopniowy wzrost śmiertelności w czasie ekspozycji (wyk. 1). Bernot i Brandenburg prowadzili badania nad wpływem nanosrebra na przetrwanie, wzrost, rozmnażanie i zachowanie ślimaka *Physella acuta* (Bernot, Brandenburg 2013). Eksperyment wykazał niższe przeżycie rozdętki w wyższych stężeniach nanosrebra, co jest zgodne z naszymi wynikami. Efekt ten był zmniejszony, gdy do pojemników eksperymentalnych dodano żwirowe podłoże. Również wzrost i rozmnażanie zostały zahamowane pod wpływem ekspozycji mięczaków na nanosrebro. W prowadzonych przez nas badaniach ślimaki nie podejmowały prób kopulacji lub były to nieudane próby. Zarówno liczba jak i masa jaj były zmniejszone. Zaobserwowano również zachowania stresowe wśród ślimaków, takie jak szybsze ruchy oraz przebywanie ponad powierzchnią wody, aby uniknąć kontaktu z nanosrebrem, co również było przez nas obserwowane. Badania prowadzone przez Justice i Bernot na rozdętkę zaostrej wykazały, że jej zdolność do wyczuwania i reagowania na sygnał wydawany przez drapieżnika była zaburzona pod wpływem działania nanosrebra (Justice, Bernot 2014). Ślimaki częściej padały ofiarą ataków drapieżników, ich funkcje obronne były upośledzone przez toksyczne działanie nanosrebra. Przy wyższych stężeniach *Physella acuta* unikały kontaktu z wodą, przebywając nad powierzchnią zbiornika, co obserwowaliśmy również w naszych badaniach. Ponadto obserwowano, że rozdętka przemieszczała się szybciej w obecności wysokich stężeń nanosrebra w celu ucieczki od zanieczyszczenia.

Prawdopodobne jest, że wykorzystanie napięcia powierzchniowego tafli wody umożliwiło ślimakom nawilżenie tkanek, przy minimalnym kontakcie z nanosrebrem. Na podstawie obserwacji stwierdzono, że rozdętka wykorzystują zjawisko kapilarne do zaciągnięcia wody pod wargę muszli. Mimo standardowej reakcji unikania, czyli ucieczki z wody, ślimaki decydowały się na ponowny czasowy kontakt z zawiesiną, aby uniknąć odwodnienia. Liczne publikacje opisują ucieczkę w odpowiedzi na zanieczyszczenia (Lefcort i in. 2013) czy obecność drapieżników (Alexander, Covich 1991). Rzadko jednak prezentowany jest szczegółowy opis podobnego zachowania z uwzględnieniem prób utrzymania wilgoci.

Średnia wysokość muszli w badanych grupach nie odbiegała od danych literaturowych (Strzelec i in. 2006), była jednak mniejsza niż u osobników odławianych ze środowiska naturalnego wykorzystywanych w badaniach Bernot i Brandenburg. Rozbieżności w rozmiarach wynikają najprawdopodobniej z różnic klimatycznych.

Podsumowanie

Niniejsze badania potwierdziły, notowany już w literaturze, negatywny wpływ cząstek nanosrebra na organizmy wodne. *Physella acuta* sprawdził się jako gatunek modelowy; opisano szereg reakcji behawioralnych uzależnionych od koncentracji nanometalu. Wszystkie stężenia powyżej 2,5 mg/L okazują się być śmiertelne w trakcie 7-dniowej ekspozycji. Obserwowano silne działanie neurotoksyczne powodujące zaburzenia w orientacji przestrzennej i aktywności lokomotorycznej ślimaków. W niższych stężeniach (1 i 0,5 mg/L), gdzie umożliwiało było przemieszczanie się, obserwowano reakcję unikania. Rozdętki umiejscawiały się ponad powierzchnią wody, sporadycznie wykorzystując napięcie powierzchniowe do nawilżenia się. Wszystkie badane stężenia były jednak zbyt wysokie, aby umożliwić osobnikom swobodne pobieranie pokarmu z dna. Uważamy, że opisane zachowania są uniwersalną reakcją słodkowodnych *Pulmonata* na niekorzystne warunki środowiska wodnego. Objęta przez ślimaki strategia rodzi dalsze pytania związane z przebiegiem procesu decyzyjnego i szacowaniem ryzyka. *Physella acuta* to wdzięczny organizm o znacznym potencjale badawczym, a uzyskane dane dają przyczynek do dalszych badań nad zachowaniami ślimaków wodnych. Ślimaki słodkowodne są liczną i ważną grupą organizmów wodnych. Większość z nich wykorzystuje chemorecepcję do wykrywania drapieżników, wyszukiwania pokarmu czy partnera do rozrodu. Zanieczyszczenia wód mogą zaburzać chemorecepcję i rolę, jaką pełnią te organizmy w naturalnych ekosystemach.

Literatura:

- Alexander J., Covich A. 1991. Predation Risk and Avoidance Behavior in Two Freshwater Snails. *Biological Bulletin*, 180(3): 387-393.
- Bernot R., Brandenburg M. 2013. Freshwater snail vital rates affected by non-lethal concentrations of silver nanoparticles. *Hydrobiologia*, 714: 25-34.
- Faunce T., Watal A. 2015. Nanosilver and global public health: international regulatory issues. *Nanomedicine*, 5(4): 617-632.
- Griffitt R., Luo J., Gao J., Bonzongo J., Barber D. 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 27(9): 1972-1978.
- Justice J., Bernot R. 2014. Nanosilver Inhibits Freshwater Gastropod (*Physa acuta*) Ability to Assess Predation Risk. *The American Midland Naturalist*, 171(2): 340-349.

- Lefcort H., Wehner E., Cocco P. 2013. Pre-Exposure to Heavy Metal Pollution and the Odor of Predation Decrease the Ability of Snails to Avoid Stressors. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 64:273-280.
- Malejko J., Godlewska-Żyłkiewicz B. 2015. Nanosrebro - zastosowanie, migracja i metody oznaczania. *Wiadomości chemiczne*, 69: 9-10.
- McLaughlin J., Bonzongo J. 2012. Effects of natural water chemistry on nanosilver behavior and toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 31(1): 168-175.
- Michnowska A. 2016. Rola malakofauny w ocenie czystości wody zbiornika w Suchedniowie na podstawie Rozdętki zaostrej [*Physella acuta* (Draparnaud, 1805)]. *Acta Juvenum*, 1: 35-38.
- Oliver A., Croteau M., Stoiber T., Tejamaya M., Römer I., Lead J., Luoma S. 2014. Does water chemistry affect the dietary uptake and toxicity of silvernanoparticles by the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*? *Environmental Pollution*, 189: 87-91.
- Paraense L., Pointier J. 2003. *Physella acuta* Draparnaud, 1805 (Gastropoda: Physidae): a Study of Topotypic Specimens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 98(4): 513-517.
- Strzelec M., Spyra A., Serafiński W. 2006. Over thirty years of *Physella acuta* (Draparnaud, 1805) expansion in the Upper Silesia and adjacent regions (Southern Poland). *Malakologische Abhandlungen*, 24: 49-55.
- Świdwińska-Gajewska A., Czerczak S. 2014. Nanosrebro - szkodliwe skutki działania biologicznego. *Medycyna Pracy*, 65(6): 831-845.
- Völker C., Gräf T., Schneider I., Oetken M., Oehlmann J. 2014. Effects of silver nanoparticles and 17 α -ethinylestradiol on the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21: 10661–10670.
- Wang Z., Chen J., Li X., Shao J., Peijnenburg W. 2012. Aquatic toxicity of nanosilver colloids to different trophic organisms: contributions of particles and free silver ion. *Environ. Toxicol. Chem.*, 31(10): 2408-2413.

ABSTRACT

BEHAVIORAL EFFECTS OF BLADDER SNAIL *PHYSELLA ACUTA* EXPOSURE TO NANOSILVER

The development of technology and industry from year to year contributes to pollution of aquatic environments with nanometals. Groups of organisms particularly vulnerable to these particles are aquatic invertebrates, mainly crustaceans, insects and molluscs. Due to the strong biocidal properties of nanosilver, a number of toxicological and behavioral tests have been carried out on a selected representative of freshwater snails – bladder snail *Physella Acuta*. Research groups of 12 individuals were exposed to the following nanosilver concentrations: 50, 25, 10, 5, 2.5, 1, and 0.5 mg/L. In these studies, we observed the negative

impact of nanosilver particles already at a concentration of 0.5 mg/L, at a concentration of 2.5 mg/L this effect was significant. Mainly locomotor functions were disturbed; at higher concentrations, lack of coordination, inability to choose the direction of movement, and unnatural shell movements were observed. The experiment confirmed the negative effect of nanosilver on snails and allowed to characterize the defense response to water pollution.

Słowa kluczowe: nanometale, toksyczność, aktywność lokomotoryczna, ślimaki słodkowodne, zanieczyszczenie srebrem

Keywords: nanometals, toxicity, locomotor activity, freshwater snails, silver pollution

Dane do kontaktu z autorem:

mgr Paweł Podobiński

pawel.podobinski@upwr.edu.pl

Katarzyna Anna Grosz, Julia Subda

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Studenckie Koło Naukowe Mykologów

Opiekun: dr hab. Anna Biedunkiewicz

STAN WIEDZY MYKOLOGICZNEJ NA TEMAT BEZPIECZNEGO GRZYBOBRANIA WŚRÓD STUDENTÓW WYDZIAŁU BIOLOGII I BIOTECHNOLOGII UNIWERSYTETU WARMIŃSKO-MAZURSKIEGO W OLSZTYNIE

Wstęp

Lasy są jednym z najważniejszych komponentów środowiska przyrodniczego, decydujących o równowadze ekologicznej. Jest to również dobro ogólnospołeczne, kształtujące jakość życia człowieka. Pozostają jednym z najmniej naruszonych przez człowieka obszarów Polski.

Grzybobranie, obok spacerów czy jazdy na rowerze, zalicza się do najczęściej podejmowanych form rekreacji przez użytkowników obszarów leśnych. Chęć przebywania na łonie natury jest główną motywacją ludzi wybierających się do lasu. Duża część zbieraczy grzybów mieszka w dużych miastach, więc możliwość spędzenia wolnego czasu na świeżym powietrzu jest dla nich odskocznią od zatłoczonych ulic. Dla wielu osób jest to nie tylko sposób na uzupełnienie spiżarni, ale także ukochane hobby.

Najsmaczniejsze i najbardziej poszukiwane przez grzybiarzy są grzyby rurkowe, mające na spodniej części kapelusza warstwę rodzajną w formie „rureczek” przypominających „gąbkę”. Cecha ta ułatwia decyzję o zbiorze owocnika, gdyż w tej grupie grzybów nie spotyka się grzybów śmiertelnie trujących. Znajduje się jedynie gatunki powodujące zaburzenia gastryczne lub grzyby niejadalne takie, jak np. goryczak żółciowy potocznie zwany szatanem, który nie jest groźny dla zdrowia, a jedynie psuje smak potrawy. Natomiast zbieranie grzybów blaszkowych wymaga dużej wiedzy i ostrożności. To wśród nich

występują gatunki śmiertelnie trujące, np. wszystkie muchomory, piestrzenica kasztanowata (*Gyromitraesculenta* (Pers.) Fr. 1849), zasłonak rudy (*Cortinariusorellanus* Fr. 1838), wieruszka zatokowata (*Entoloma sinuatum* (Bull.) P. Kumm 1871), krowiak podwinięty (czyli olszówka) (*Paxillus involutus* (Batsch) Fr. 1836-1838) czy maślanka wiązkowa (*Hypholoma fasciculare* (Huds.) P. Kumm 1971). Do najczęściej zbieranych gatunków grzybów w naszym kraju należą: podgrzybek brunatny (*Imleriabadia* (Fr.) E.-J. Gilbert 1931), borowik szlachetny (*Boletus edulis*) Bull 1781 oraz pieprznik jadalny, nazywany kurką (*Cantharellus cibarius* Fr. 1821).

Podczas grzybobrania należy zatem wykazać się wszechstronną wiedzą na temat budowy owocników w różnym stadium rozwoju, sposobu ich zbioru, ale również siedlisk zajmowanych przez różne gatunki czy postępowania w razie spożycia owocnika trującego.

Cel

Poznanie poziomu wiedzy studentów Wydziału Biologii i Biotechnologii UWM w Olsztynie, dotyczącej znajomości grzybów jadalnych i niejadalnych, zasad ich właściwego zbierania oraz świadomości skutków spożycia grzybów trujących.

Material i metody

W styczniu 2020 r. wśród studentów Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego zostały przeprowadzone badania ankietowe wielokrotnego wyboru w formie elektronicznej ankiety, zawierającej 35 pytań, z wykorzystaniem platformy Google. Odpowiedzi udzieliło 215 osób, w tym 175 kobiet i 40 mężczyzn. Pytania ankietowe dotyczyły danych metryczkowych (6) oraz wiedzy na temat bezpiecznego grzybobrania (29). Większość ankietowanych stanowiły kobiety (81,4%). Przeważającym miejscem zamieszkania była wieś (34%). Wiek ankietowanych to średnio 21 lat (22,3%). Prawie połowa osób odpowiadających na pytania studiuje biotechnologię. Na drugim roku studiów jest 38,6% badanych oraz aż 70,2% jest na pierwszym stopniu kształcenia (tab. 1)

Wyniki badań

Większość ankietowanych twierdzi, że chodzą bądź chodzili na grzybobranie (89,9%), w którym uczestniczyli z doświadczonym grzybiarzem (68,1%),

Tabela 1. Pełna metryczka ankietowanych – odpowiedzi obowiązkowe.

Płeć	Kobieta	Mężczyzna				
Liczba ankietowanych; udział procentowy (%)	175 (81,4)	40 (18,6)				
Wiek	19	20	21	22	23	>24
Liczba ankietowanych; udział procentowy (%)	10 (4,7)	41 (19,1)	48 (22,3)	42 (19,5)	46 (21,4)	28 (13)
Miejsce stałego zamieszkania	Wieś	Miasto < 20 tys. mieszkańców	Miasto 20-100 tys. mieszkańców	Miasto 100-1000 tys. mieszkańców	Miasto >1000 tys. mieszkańców	
Liczba ankietowanych; udział procentowy (%)	73 (34)	26 (12,1)	51 (23,7)	39 (18,1)	26 (12,1)	
Kierunek	Biologia	Biotechnologia	Mikrobiologia			
Liczba ankietowanych; udział procentowy (%)	43 (20)	105 (48,8)	67 (31,2)			
Stopień kształcenia	Pierwszy	Drugi				
Liczba ankietowanych; udział procentowy (%)	151 (70,2)	64 (29,8)				
Rok studiów	1	2	3	4		
Liczba ankietowanych; udział procentowy (%)	60 (27,9)	83 (38,6)	51 (23,7)	21 (9,8)		

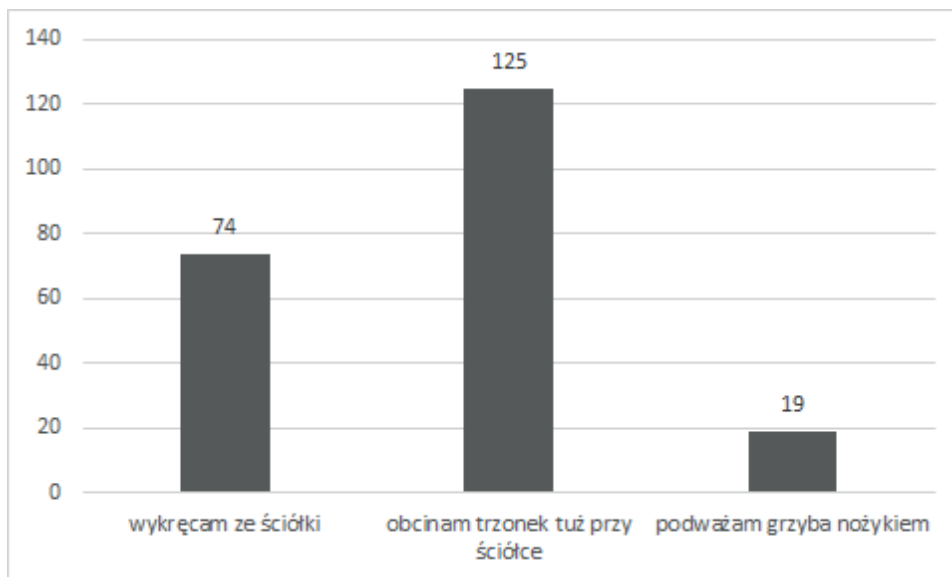
Nazwy gatunkowe grzybów zostały podane z rozszerzeniami zgodnie z Index Fungorum (www.indexfungorum.org).

Źródło: Opracowanie własne

z osobami o znikomej wiedzy na temat zbierania grzybów (26%), bądź sami (5,9%). Osoby, które wybierają się na grzyby to, w dużej mierze, osoby mieszkające na wsi. Grzyby leśne są często składnikiem tradycyjnych polskich potraw, konsumowanych podczas rodzinnych spotkań. Aż 84% ankietowanych potwierdziło, że spożywa grzyby. Jednak aż 31 osób przyznało, że nie je grzybów,

a mimo to uczestniczy w grzybobraniu. 68% badanych jest świadoma tego, że oprócz walorów smakowych, grzyby są bogate w składniki odżywcze.

Rycina 1. Sposób zbierania grzybów przez ankietowanych.

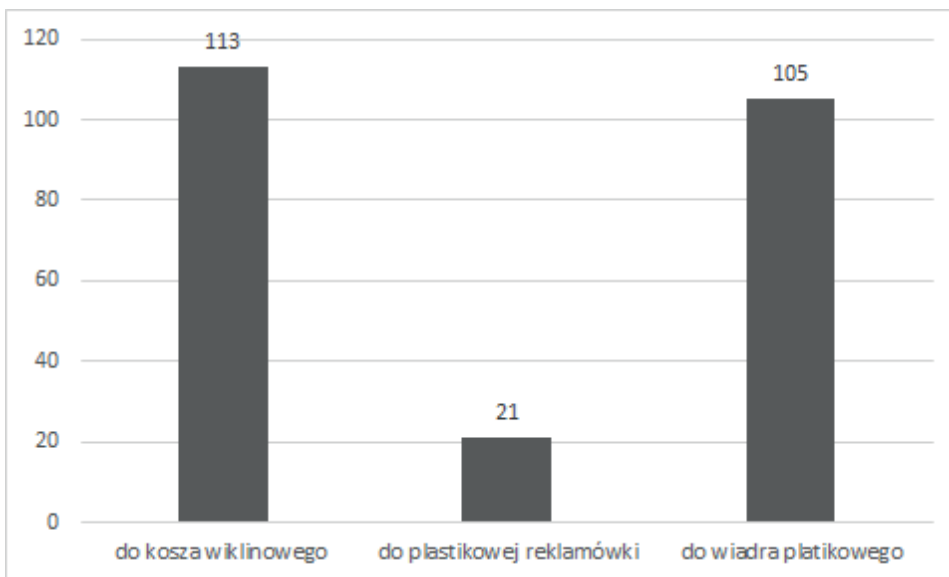


Źródło: Opracowanie własne

Studenci zapytani o sposób wyjmowania grzybów ze ściółki udzielali zróżnicowanych odpowiedzi (ryc. 1). Większość obcina trzonki grzybów tuż przy ściółce (62,2%), może to być spowodowane błędnym przekonaniem, że pozostawiona w ściółce grzybnia wyda nowe owocniki. Obcięcie trzonka w przypadku rozróżniania grzybów jadalnych podobnych do muchomorów pozbawia nas ważnej cechy diagnostycznej, jaką jest nasada trzonu ukryta pod powierzchnią ściółki. Może być ona np. bulwkowata, jak u muchomorów lub łagodnie, czy tępo zakończona, jak u większości grzybów jadalnych.

Z wyników pytania wielokrotnego wyboru wynika, że studenci najczęściej zbierają grzyby do wiklinowych koszy (55,9%) lub plastikowych wiader (52%). Dobra praktyka grzybiarska, w której wykorzystywane są kosze wiklinowe, zapewnia wentylację grzybów oraz rozsiewanie zarodników, które wysypują się z zebranych owocników w lesie, po którym się przemieszczamy. Użycie plastikowych wiader zapewnia wygodny zbiór, zapobiega gniciu owocników, jednak nie sprawdza się przy wielogodzinnych wyprawach, podczas których grzyby mogą się zaparzać, a zarodniki nie rozsiewają się. Być może ten sposób zbioru grzybów jest wynikiem lepszej dostępności i niższej ceny

Rycina 2. Pojemniki wykorzystywane przez ankietowanych podczas grzybobrania.



Źródło: Opracowanie własne

plastikowych wiader niż wiklinowych koszy, które nie są zbyt często używane poza sezonem grzybobrania, a co za tym idzie nie są obecne w większości domów. Niewielka część ankietowanych zbiera grzyby do plastikowej torby, tzw. reklamówki (10,4%) (ryc. 2). Taki sposób transportowania w dużej mierze może być spowodowany niewiedzą i nieplanowanym, spontanicznym znalezieniem grzybów. Jest to zdecydowanie niewłaściwe postępowanie, gdyż nawet jadalne grzyby, nie mając dostępu tlenu, mogą produkować toksyczne metabolity, a brak możliwości rozsiewania się zarodników powoduje, że z roku na rok ilość grzybów leśnych zmniejsza się.

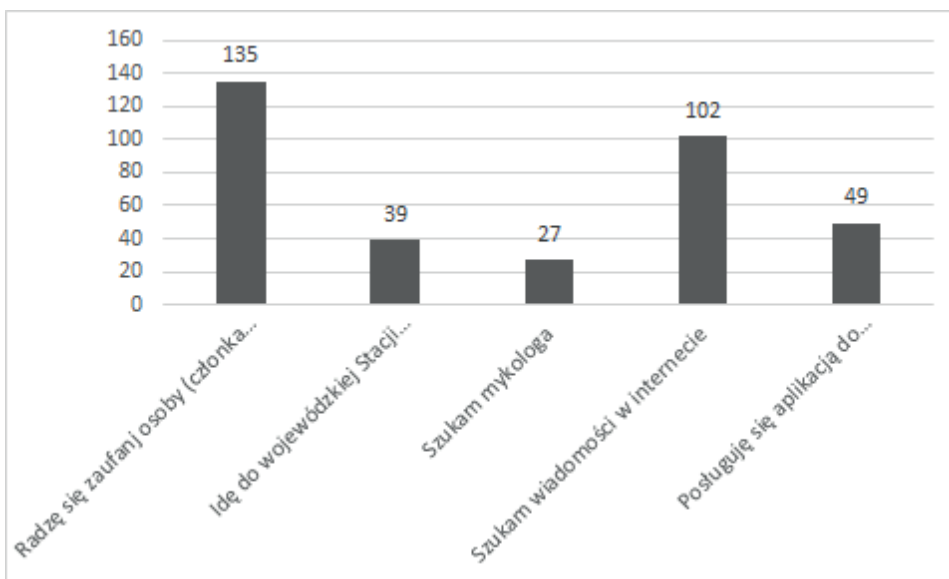
Ponad połowa ankietowanych (61,3%) nie posiada w domu atlasu grzybów, a podczas wyprawy na grzyby korzysta z niego jedynie 14%. Znaczna część studentów wie, że na grzyby należy wybrać się rankiem, a najlepszą porą roku na grzybobranie jest jesień. Są świadomi także, że nie można niszczyć ściółki leśnej oraz owocników grzybów trujących czy niejadalnych. Chociaż uważane są za nieprzydatne dla ludzi, jednak mogą stanowić pożywienie dla zwierząt. Większość osób uczestniczących w badaniu zbiera grzyby w odpowiednim stadium rozwoju (89,2%), czyli gdy są w pełni rozwinięte, a wszystkie cechy diagnostyczne są dobrze widoczne. Pozostałe osoby (10,8%) wybierają grzyby zbyt młode, bądź zbyt stare. Może to być przyczyną pomyłek podczas iden-

tyfikacji gatunku – wiele owocników grzybów trujących w początkowej fazie wzrostu wygląda podobnie do ich jadalnych odpowiedników. Niecałe 80% odpowiedziało, iż większość grzybów jadalnych ma pod kapeluszem hymenofor rurkowaty. Znacząca większość badanych (88%) potrafi rozróżnić, na podstawie fotografii zamieszczonych w ankiecie, grzyby trujące i jadalne. Niestety spora grupa osób nie umiała odróżnić czubajki kani (*Macrolepiotaprocera* (Scop.) Singer, 1948) od czubajeczki cuchnącej (*Lepiotacristata* (Bolton) P. Kumm. 1871) (32,2%) oraz borowika ceglasporego (*Neoboletus luridiformis* (Rostk.) Gelardi, Simonini & Vizzini, 2014) od goryczaka żółciowego (*Tylopilus felleus* (Fr.) P. Karst. 1882), aż 95,8% wskazało goryczaka jako grzyb jadalny. Takie pomyłki w realnym życiu nie spowodowałyby zatruc śmiertelnych, jednak dodatek tych niejadalnych grzybów do potrawy skutkuje niepożądanym, gorzkim smakiem. Niestety pomyłka w przypadku grzybów trujących może skutkować śmiercią. Szczególnie w przypadku nieprawidłowego postępowania przy podejrzeniu spożycia grzyba trującego. Niestety, nie wszyscy studenci potrafią podjąć odpowiednie działanie, gdyż aż 7 osób twierdzi, że należy poczekać na pierwsze objawy zatrucia zamiast bezzwłocznie udać się do lekarza. Dwie osoby nie udzieliły odpowiedzi, więc można założyć, że również nie znały poprawnej odpowiedzi. Ponad 20% badanych twierdzi, że grzyb trujący, znajdujący się z grzybami jadalnymi może przekazywać swoje toksyny poprzez bezpośredni kontakt, co nie jest prawdą. Prawie 85% studentów uważa, że żerowanie ślimaka na owocniku nie oznacza wcale, iż jest on jadalny. Jest to słuszne przekonanie, gdyż nawet jeśli toksyna działa negatywnie na organizm ludzki, nie oznacza to, że organizmy niektórych zwierząt nie są w stanie jej zneutralizować. Niestety, część studentów sądzi inaczej, może to być spowodowane instynktownym naśladownictwem zwierząt.

Najprawdopodobniej właśnie poprzez obserwację zwierząt zjadających grzyby ludzie zaczęli próbować nieznanych dotąd darów natury. Podobnie odpowiadali studenci na pytanie, czy zawsze grzyb trujący ma gorzki lub piekący smak (18,8% ankietowanych odpowiedziało twierdząco). Jest to błędne przesądzenie, a najlepszym tego przykładem jest muchomor zielonawy (*Amanitaphalloides* (Vaill.ex.Fr.) Link. 1833), który ma słodkawy posmak (według opisu w atlasach) (Gerhardt 2006). Dla osób niezaznajomionych z procedurą identyfikacji przydatności do spożycia grzyba poprzez zmysł smaku czynność ta jest niebezpieczna z uwagi na ryzyko wystąpienia zjawiska zatrucia toksynami. Zatem tylko doświadczony mykolog może posługiwać się posmakiem jako cechą diagnostyczną.

Podczas weryfikacji poprawności oznaczenia grzybów studenci korzystają z różnych źródeł wiedzy, co pokazują wyniki uzyskane w pytaniu wielokrotnego

Rycina 3. Sposoby sprawdzania przydatności grzybów do spożycia przez ankietowanych.



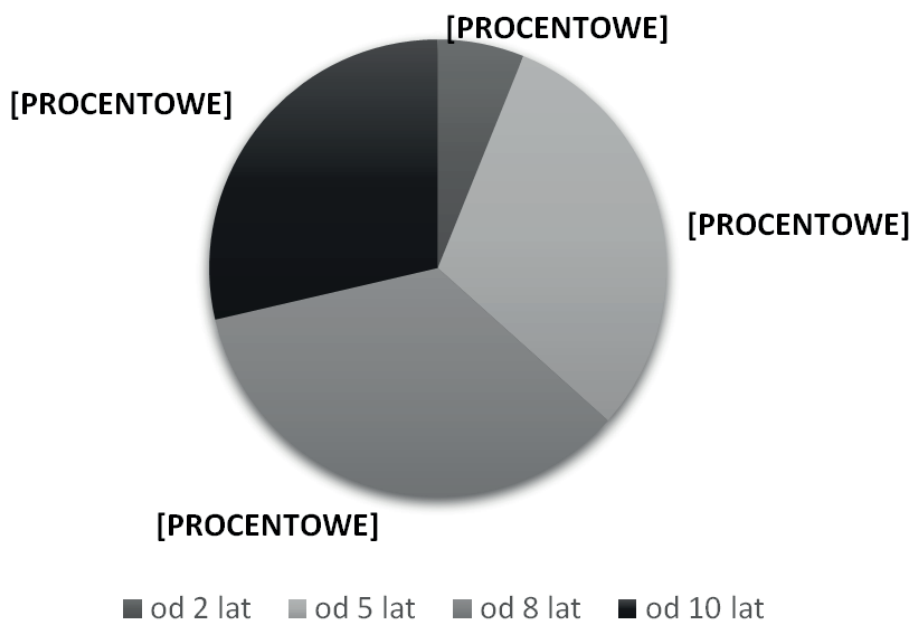
Źródło: Opracowanie własne

wyboru (ryc. 3). Ze względu na to, że większość ankietowanych wybiera się na grzybobranie z osobami mającymi doświadczenie w tej dziedzinie, porada takiej osoby jest najszybszym i dość zaufanym źródłem, dlatego też ta odpowiedź była udzielana najczęściej (63,7%). Natomiast 48,1% ankietowanych wspomaga się w identyfikacji grzybów danymi z Internetu. Część badanych (7,5%) chodzących na grzybobranie twierdzi jednak, że zabrałaby znaleziony grzyb ze sobą, nie mając pewności, że jest jadalny.

Na pytanie dotyczące wieku dzieci, które mogą spożywać grzyby, ankietowani nie odpowiadali jednoznacznie (ryc. 4). Studenci zdają sobie sprawę, że dla małych dzieci spożycie grzybów może być niebezpieczne, jednak znaczna część nie potrafi sprecyzować wieku, od którego można podawać dzieciom potrawy zawierające grzyby.

Pytania o mykoryzę ukazały, że duża część studentów zna zależności symbiotyczne między konkretnymi rodzajami grzybów a drzewami. Ankietowani powiązali borowika i podgrzybka z takimi drzewami, jak: sosna (*Pinus* ssp.) (47,4%), brzoza (*Betula* spp.) (42,2%), dąb (*Quercus* ssp.) (31,3%), topola (*Populus* ssp.) (11,4%). Podczas gdy te rodzaje grzybów mykoryzują jedynie z dębem i sosną. Natomiast studenci kojarzą maślaka głównie z sosnami (43,6%) oraz brzozami (41,7%) i w niewielkiej części również z topolą (19,5%) czy

Rycina 4. Wiek, w którym, według ankietowanych, dzieci mogą spożywać grzyby.



Źródło: Opracowanie własne

dębem (9%). Jednak maślak wchodzi w mykoryzę, spośród wymienionych w ankiecie drzew, jedynie z młodą sosną.

Dyskusja

Polacy są narodem mykofilnym. Często spożywają potrawy zawierające w swym składzie grzyby, zarówno hodowlane jak i leśne, które są uznawane za wyjątkowo smaczne. Obecnie grzyby pochodzące z terenów leśnych bez większego problemu można zakupić w popularnych sklepach spożywczych lub od grzybiarzy stojących przy drogach z koszami wypełnionymi po brzegi smakowitymi darami lasu. Dawniej miłośnicy rekreacji na świeżym powietrzu sami udawali się do lasu, aby zdobyć niezbędne do licznych potraw grzyby jadalne czy wiele innych roślin. Wiele gatunków grzybów cenione jest przez smakoszy za niezwykle aromat (Müller, Loeffler 1987). Wiedzę na temat grzybobrania czerpali od starszych pokoleń, ponieważ stanowiły one rzetelne źródło wiedzy. Jak wynika z ankiety, porada bliskiej osoby nadal jest uznawana za element oceny przydatności do spożycia znalezionych grzybów. Być może właśnie

dlatego część osób zabiera grzyby ze sobą z zamiarem pokazania ich osobom doświadczonym, nie identyfikując ich osobiście. Ponadto, być może niewiele osób posiadało atlasy grzybów, a społeczeństwo nie wiedziało, iż można udać się z niezidentyfikowanym grzybem do najbliższej Wojewódzkiej Stacji Sanitarnej-Epidemiologicznej, aby zasięgnąć porady grzyboznawcy. Do tej pory atlasy w swoich domach ma niewielka liczba osób. Również technologia minionych lat nie była na tak wysokim poziomie jak aktualnie, więc nie było możliwe znalezienie informacji o zebranych grzybie. Cenną pomocą w poszukiwaniu dobrze znanych i smacznych grzybów była znajomość zależności symbiotycznych między pożądanym gatunkiem grzyba a drzewami. Jak pokazują wyniki ankiety, dzisiejsze młode pokolenie z powodzeniem dopasowało mykoryzujące gatunki. Jednak duża część ankietowanych niesłusznie powiązała wymienione grzyby z brzożami (*Betula* spp.). Studenci prawidłowo kojarzyli brzozy jako drzewa żyjące w symbiozie z grzybami. Jednak mykoryzującymi z nimi grzybami są ogólnie znane koźlarze (*Leccinum* spp.).

Grzyby nie tylko są cenione za ich walory smakowe i zapachowe, ale także działanie przeciwnowotworowe. Antynowotworowe właściwości borowika szlachetnego potwierdzono w połowie XX w. Z uwagi na dużą zawartość błonnika oraz małą zawartość tłuszczu, grzyby mogą stanowić element diety przeciwdziałającej miażdżycy. Dodatkowo, są one źródłem substancji wykazujących zdolność zmniejszania syntezy cholesterolu LDL oraz triacylogliceroli, nie wpływając na stężenie frakcji HDL (Siwulski i in. 2014). Zatem spożywanie grzybów gwarantuje nie tylko doznania kulinarne, ale również korzyści zdrowotne. Ogromne tereny leśne, zwłaszcza na obszarze województwa warmińsko-mazurskiego, sprzyjają wyprawom na grzybobranie, które dla wielu osób jest czasem spędzonym z bliskimi oraz chwilą kontaktu z naturą, a zbierane grzyby po odpowiedniej obróbce termicznej czy wysuszeniu, cieszą smakiem przez cały rok. Dla niektórych sprzedaż zebranych grzybów jest dodatkową formą zarobku. Niestety wiedza i umiejętność rozpoznawania i rozróżniania grzybów jadalnych od ich trujących sobowtórów bywa niewystarczająca, co prowadzi do wielu zatruć odnotowywanych co roku.

Niestety dzisiejsze młode pokolenie nie traktuje zbierania grzybów i poszerzania wiedzy na ich temat jako niezbędnej wartości. Istnieje wiele powodów tego zjawiska. Pierwszym z nich może być fakt, iż młodzi ludzie nie posiadają dużej ilości wolnego czasu, w którym mogliby się udać do lasu. Następnym powodem jest łatwy dostęp do grzybów leśnych w sprzedaży detalicznej przez cały rok. W dzisiejszych czasach nie musimy udać się do lasu, aby zebrać ten dar natury. Wystarczy krótki spacer do najbliższego sklepu spożywczego, gdzie najczęściej spotkamy świeżego pieprznika jadalnego (*Cantharellus cibarius* Fr.

1821) w plastikowym opakowaniu lub borowika szlachetnego (*Boletusedulis* Bull. 1781) w formie suszu.

Ważnym aspektem, o którym warto wspomnieć, jest zauważalnie wyższy poziom wiedzy na temat grzybobrania wśród ludności zamieszkującej wieś niż miasta. Może to być spowodowane tym, iż tereny wiejskie są położone stosunkowo bliżej lasów niż tereny miejskie, co skutkuje częstszym odwiedzaniem ich przez mieszkańców wsi. Dla ludzi żyjących w dużych aglomeracjach wizyta w lesie często wiąże się z dalszą wyprawą i koniecznością udania się tam samochodem. Na tego typu aktywności większość społeczeństwa może sobie pozwolić wyłącznie w weekendy. Poza tym należy podkreślić fakt, iż ludność wiejska kładzie mocny nacisk na propagowanie tradycji, więc oczywistym dla nich jest uczenie młodego pokolenia świadomego zbierania grzybów oraz dbania o lasy jako dobro narodowe.

Zgodnie z założeniami nauczycieli akademickich, wiedza studentów z roku na rok powinna się pogłębiać. Niestety wiedza studentów z drugiego stopnia kształcenia była na podobnym poziomie co ich młodszych kolegów z pierwszego stopnia. W toku nauczania na kierunkach mikrobiologia, biologia i biotechnologia temat grzybobrania, jak wskazują wyniki ankiet, jest zbyt rzadko poruszany na zajęciach. Wypełniając ankietę, studenci bazowali na wiedzy ze szkoły podstawowej. Wiedza i umiejętności nie utrwalane z czasem zanikają, co pokazują wyniki uzyskane przez młodzież w ankiecie. Dodatkowym problemem wśród studentów jest brak wolnego czasu na poszerzanie wiedzy spoza tematów związanych ze studiowaniem. Jeśli nawet znajdą chwilę przerwy od nauki to wolą ją poświęcić na odpoczynek czy rozrywkę.

Obecność i możliwość zbierania grzybów przyczynia się do wzrostu funkcji pozaprodukcyjnych, a w szczególności rekreacyjnej funkcji lasu. Natomiast należy zwrócić uwagę na fakt, iż pozyskiwanie darów przyrody znacząco oddziałuje na środowisko. Wymagane jest wprowadzenie odpowiednich uregulowań prawnych i właściwego ukierunkowania, w tym specjalistycznego zagospodarowania lasu. Nawet w sytuacji, w której zasady te są jednoznacznie określone, w praktyce często obserwuje się łamanie tych przepisów i niekontrolowany sposób pozyskiwania grzybów. Dlatego w dzisiejszych czasach potrzebna jest szeroko pojęta edukacja społeczeństwa, zwłaszcza najmłodszych. Poważnym problemem jest fakt nierespektowania przez grzybiarzy zasad mówiących o bezpiecznym i nieszkodzącym środowisku poruszaniu się po lesie (Janeczko, Woźnicka 2014).

Podsumowanie

Badanie ankietowe przeprowadzone wśród studentów Wydziału Biologii i Biotechnologii Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie pokazało, jak ważne jest kultywowanie tradycji zbierania grzybów. Aktualny poziom wiedzy na temat grzybobrania młodego pokolenia jest niski, więc możemy przypuszczać, że kolejnych będzie jeszcze niższy, aż w końcu aktywność, jaką jest zbieranie grzybów, zaniknie. Dlatego niezmiernie istotnym elementem jest edukacja młodych ludzi i rozwijanie w nich zamiłowania do natury oraz darów, które oferuje.

Literatura:

- Gerhardt E. 2006. Grzyby. Wielki ilustrowany przewodnik. KDC.
- Janeczko E., Woźnicka M. 2014. Użytki leśne w zagospodarowaniu rekreacyjnym lasu. *Studia i Materiały CEPL w Rogowie*, 16(38/1): 41-45.
- Müller E., Loeffler W. 1987. Zarys mikologii. Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, s. 184-186.
- Siwulski M., Sobieralski K., Sas-Golak I. 2014. Wartość odżywcza i prozdrowotna grzybów. *Żywność.Nauka. Technologia. Jakość*, 1(92): 16-28.
www.indexfungorum.org

ABSTRACT

RESEARCH ON THE LEVEL OF MYCOLOGICAL KNOWLEDGE AMONG STUDENTS OF THE FACULTY OF BIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY AT THE UNIVERSITY OF WARMIA AND MAZURY IN OLSZTYN ON THE SUBJECT OF SAFE MUSHROOMING

The aim of the research was to find out the level of knowledge of students of the Faculty of Biology and Biotechnology of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn, regarding knowledge of edible and inedible mushrooms, principles of their proper collection and awareness of the effects of poisonous mushrooms consumption.

Among the students of the Faculty of Biology and Biotechnology UWM in Olsztyn, a survey was conducted in electronic form using the Google platform. 215 people responded. Most respondents participate in the collection of mushrooms (89.8%), but not everyone can

distinguish between edible and poisonous mushrooms (53% of correct answers), and during mushroom picking they rely on the knowledge of other, more experienced people (68.1%). Some admit that they choose to pick mushrooms with people with little knowledge about mushrooms (26%). People living in the countryside gave more correct answers (34.1%) than those living in cities (12.1%).

Słowa kluczowe: grzybobranie, grzyb jadalny, grzyb trujący

Keywords: mushrooming, edible mushroom, poisonous mushroom

Dane do kontaktu z autorem:

Katarzyna Anna Grosz, e-mail: groszek786@wp.pl

Julia Subda, e-mail: subda.julia@gmail.com

Rafał Hrynkiewicz, Dominika Bębnowska, Mikołaj Wołłowicz

Uniwersytet Szczeciński w Szczecinie

Studenckie Koło Naukowe Immunologów

Opiekun: dr hab. Paulina Niedźwiecka-Rystwej, prof. US

**MIELOPEROKSYDAZA (MPO) I LIZOZYM
(LZM) W NEUTROFILACH KRÓLIKÓW
(*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) ZAKAŻONYCH
EKSPERYMENTALNIE SZCZEPEM ROSSI WIRUSA
LAGOVIRUS EUROPAEUS GI.1A**

Wstęp

Wirus *Lagovirus europaeus* GI.1 jest czynnikiem etiologicznym odpowiedzialnym za wywoływanie wirusowej choroby krwotocznej królików (RHD, Rabbit Haemorrhagic Disease), zwanej potocznie pomorem (Fitzner, Niedbalski 2017; Niedźwiedzka-Rystwej 2013). Króliki, poza tym, że stanowią kluczowy element gospodarki wielu państw, są również istotnym ogniwem w łańcuchu troficznych ekosystemów śródziemnomorskich (Abrantes i in. 2014). Dodatkowo wykorzystywane są jako zwierzęta laboratoryjne w badaniach laboratoryjnych i analizach diagnostycznych (Abrantes i in. 2014). Ogromne straty w liczebności tych zwierząt zapoczątkował pierwszy udokumentowany wybuch epidemii RHD, odnotowany w 1984 roku w Chinach w prowincji Jiangsu (Liu i in. 1984). Wybuch pomoru doprowadził do poważnych strat ekonomicznych, jak i zmniejszenia liczebności gatunków, dla których królik stanowi główny składnik pożywienia.

Zaistniała sytuacja doprowadziła do tego, że *Lagovirus europaeus* stał się obiektem badań na całym świecie (Abrantes i in. 2014). Eksperymentalne zakażenie królików tym patogenem stanowi model badawczy pomocny w zgłębianiu wiedzy na temat ludzkich gorączek krwotocznych (Niedźwiedzka-Rystwej 2013). Warto wspomnieć, że wystąpienie wirusowych gorączek krwotocznych u królika i człowieka charakteryzuje się podobnymi cechami klinicznymi, w tym

również jednakowo gwałtownym przebiegiem zakażenia. Podobieństwa te powodują, że badania nad wirusem pomoru królików, mające na celu przybliżenie zachodzących w organizmie zjawisk immunologicznych w trakcie zakażenia, dają szansę na opracowanie w przyszłości nowych skutecznych metod walki i profilaktyki z ludzkimi gorączkami krwotocznymi. Ponadto zmiany patomorfologiczne w komórkach wątroby, obserwowane posekcyjnie wśród królików eksperymentalnie zakażonych wirusem *Lagovirus europaeus*, stanowią przedmiot badań w analizie niewydolności tego narządu, co odnosi się do patogenego wpływu czynników wywołujących wirusowe zapalenia wątroby u ludzi, a także przy określaniu skuteczności środków o działaniu hepatoprotekcyjnym (Niedźwiedzka-Rystwej 2013).

Poznanie procesów immunologicznych zachodzących podczas zakażenia *Lagovirus europaeus* jest niezbędnym krokiem w kierunku pełnego zrozumienia patogenezы RHD. Dotychczas pod względem immunologicznym przebadano jedynie siedem wariantów antygenowych *Lagovirus europaeus* GI.1a (Niedźwiedzka-Rystwej 2013; Hrynkiewicz, Boniek 2018). Podczas badań oceniano kluczowe parametry dla odporności wrodzonej i nabytej. Badania wykazały, że w obrębie aktywności MPO oraz stężenia i aktywności LZM wcześniej badane warianty antygenowe *Lagovirus europaeus* GI.1a w większości przypadków wykazywały zróżnicowany obraz immunologiczny.

Cel

Celem przeprowadzonych badań była ocena aktywności mieloperoksydazy (MPO) oraz stężenia i aktywności lizozymu (LZM) u królików, które zostały eksperymentalnie zakażone szczepem Rossi, będącym wariantem antygenowym wirusa *Lagovirus europaeus* GI.1a. Wykonano także badania wirusologiczne, kliniczne oraz zoohigieniczne, których parametry mogłyby mieć wpływ na stan zdrowia zwierząt zakażonych i przebieg przeprowadzonego doświadczenia.

Material i metody

Badania przeprowadzono na królikach ($n = 10$), będących mieszańcami polskimi z gatunku *Oryctolagus cuniculus* o masie początkowej 2,60-4,55 kg. Zwierzęta te pochodziły z licencjonowanej hodowli i według norm krajowych zostały zakwalifikowane jako zwierzęta konwencjonalne (CV). Przed rozpoczęciem doświadczenia zwierzęta charakteryzowały się dobrym stanem zdrowia i nie wykazywały objawów chorobowych. Zwierzęta przez cały czas trwania doświadczenia przebywały w wiwarium należącym do Instytutu Biologii Uni-

wersytetu Szczecińskiego. Podczas badań zwierzętom zapewniono odpowiednie warunki spełniające wszystkie normy zoohigieniczne zgodne z zapisami Dyrektywy Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE (Annon 2010). Zwierzęta utrzymywane były w specjalnie przystosowanych klatkach, miały nieograniczony dostęp do świeżej wody oraz żywione były pełnowartościową paszą LSK Motycz. Zapewniono im również stały nadzór weterynaryjno-zoohigieniczny. Wszystkie procedury przeprowadzono za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Szczecinie (pozwolenie nr 1/2009).

Grupa królików (n = 5), zakwalifikowanych jako zwierzęta zakażone, otrzymała domięśniowe iniekcje liofilizatu szczepu Rossi wirusa *Lagovirus europaeus* GI.1a rozpuszczonego w soli fizjologicznej (1 ml), o mianie wynoszącym 1280 i odczynie HA+. Antygeny badanego szczepu wirusa *Lagovirus europaeus* GI.1a przygotowano według metody opracowanej przez Fitznera i in. (Fitzner i in. 2000).

Grupę kontrolną (n = 5) stanowiły zwierzęta, którym domięśniowo podano placebo w postaci roztworu soli fizjologicznej (1 ml).

Od zwierząt grupy badanej i grupy kontrolnej pobierano krew (2 ml) do badań z żyły brzeżnej ucha w godzinie „0”, tj. przed wykonaniem iniekcji oraz po 8, 12, 24, 36, 48, 52, 56, 60 godzinach od podania iniekcji. U każdego królika z grupy badanej krew pobierano do momentu wystąpienia pierwszych objawów choroby lub śmierci konkretnego królika, natomiast w przypadku królików z grupy kontrolnej krew pobierano do momentu zakończenia doświadczenia.

W granulocytach krwi obwodowej królików zakażonych i kontrolnych oznaczono aktywność mieloperoksydazy (MPO) według metody Grahama, która została opisana przez Zawistowskiego (Zawistowski 1977). Metoda ta opiera się na wykonaniu rozmazu z krwi pełnej, pobranej do probówki z antykoagulantem w postaci heparyny, a następnie wybarwieniu preparatu. W pierwszym etapie barwienia wykonany wcześniej rozmaz krwi utrwalało się przez 5 minut w roztworze formaliny z etanolem, a następnie przez 25 minut poddawano działaniu benzydyny, którą po upływie czasu (25 minut) wypłukiwano roztworem etanolu (40%). Po wysuszeniu preparatów barwiono je 7-procentowym roztworem Giemsy (15 minut). Przygotowane preparaty obserwowano pod mikroskopem optycznym (pow. 100-krotnym) z użyciem płynu immersyjnego. W każdym rozmazie poszukiwano 100 kolejnych granulocytów. Każdy granulocyt poddawano obserwacji i przyporządkowano do jednej z pięciu kategorii opisanych w kluczu, a następnie aktywność MPO wyrażono współczynnikiem wyliczonym wzorem wg Afanasjewa (Afanasjew, Kolot 1971).

Stężenie lizozymu (LZM) oznaczono w surowicy krwi królików metodą dyfuzji płytkowej, opisaną przez Hankiewiczza (Hankiewicz, Świerczek 1975).

Jest to metoda polegająca na badaniu właściwości bakteriolitycznych lizozymu na szczep bakteryjny *Micrococcus lysodeikticus*, który jest wrażliwy na działanie tegoż enzymu. Przed rozpoczęciem oznaczania stężenia LZM przygotowano zawiesinę bakteryjną poprzez rozpuszczenie 150 mg liofilizatu, zawierającego *Micrococcus lysodeikticus* (SigmaM-3770, USA) w 15 ml przygotowanego wcześniej 0,067 M buforu fosforowego o pH 6,2. Otrzymaną zawiesinę dodano do 1% żelu agarozowego. Do przygotowania żelu wykorzystano 1 g chlorku sodu (NaCl) oraz 1 g sproszkowanej agarozy, które zostały rozpuszczone w 50 ml wody destylowanej. Następnie do powstałej mieszaniny dodano 50 ml buforu fosforanowego. Powstałą mieszaninę wylano pomiędzy wcześniej oczyszczone alkoholem etylowym dwie szklane płytki i odczekano do momentu pełnego stężenia agarozy. W kolejnym etapie przygotowano serię rozcieńczeń, które następnie wykorzystano do wykonania krzywej wzorcowej. Do wykonania serii rozcieńczeń wykorzystano 3,6 ml buforu fosforanowego oraz 6,4 ml wzorca lizozymu (LZM). Do wyżłobionych, w żelu agarozowym, dołków o objętości 17 μ l naniesiono serię rozcieńczeń oraz surowicę krwi królików zakażonych oraz kontrolnych. Tak przygotowane gotowe płytki przeniesiono do komory wilgotnej, a następnie inkubowano je w cieplarni w 37°C przez 18-24 h. Po zakończonej inkubacji odczytano wyniki. Przy odczycie wzięto pod uwagę średnicę lizy, którą obserwuje się jako przejaśnienia wokół wyżłobionych dołków. Po odczycie wyników rozcieńczeń seryjnych wykreślono krzywą wzorcową, na podstawie której odczytano stężenie lizozymu każdej badanej surowicy. Aktywność LZM wyliczono na podstawie wzoru wg Szmigielskiego (Szmigielski 1972).

Podczas doświadczenia rejestrowano również objawy kliniczne oraz procentową śmiertelność zwierząt. Otrzymane wyniki aktywności MPO oraz stężenia i aktywności LZM poddano analizie statystycznej testem t-Studenta przy zachowaniu poziomu istotności $p = 0,05$.

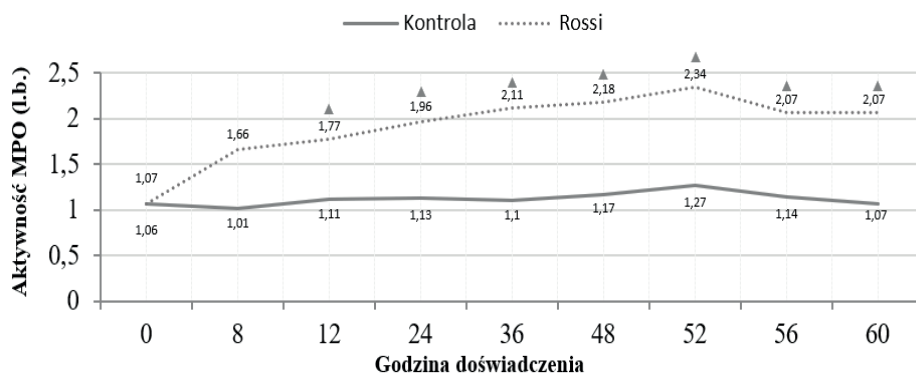
Wyniki badań

Wyniki badań immunologicznych przedstawiono jako aktywności mieloperoksydazy (MPO) oraz stężenie i aktywność lizozymu (LZM) we krwi obwodowej królików eksperymentalnie zakażonych szczepem Rossi wirusa *Lagovirus europaeus* GI.1a. Omawiane wyniki przedstawiono w postaci wykresów dynamiki zmian aktywności MPO (wykres 1) oraz stężenia (wykres 2) i aktywności (wykres 3) lizozymu.

W badaniach stwierdzono, że wartości aktywności MPO u królików zakażonych szczepem Rossi wirusa *Lagovirus europaeus* GI.1a wahały się w przedziale od 1,07 do 2,34 (wykres 1). U królików kontrolnych wartości aktywności MPO

znajdują się w przedziałach od 1,01 do 1,27 (wykres 1). Analizując dynamikę zmian parametru, zaobserwowano, że wartości badanego parametru u zwierząt zakażonych od początku trwania doświadczenia wykazywały tendencję wzrostową względem królików kontrolnych (wykres 1). Otrzymane wyniki aktywności MPO poddano analizie statystycznej, która wykazała, że badany wariant antygenowy wirusa *Lagovirus europaeus* GI.1a u królików zakażonych, spowodował siedem istotnych statystycznie wzrostów aktywności MPO, które przypadały na godziny: 12, 24, 36, 48, 52, 56 oraz 60 od momentu zakażenia zwierząt (wykres 1).

Wykres 1. Dynamika zmian aktywności MPO u królików zakażonych eksperymentalnie wariantem antygenowym Rossi *Lagovirus europaeus* GI.1a.

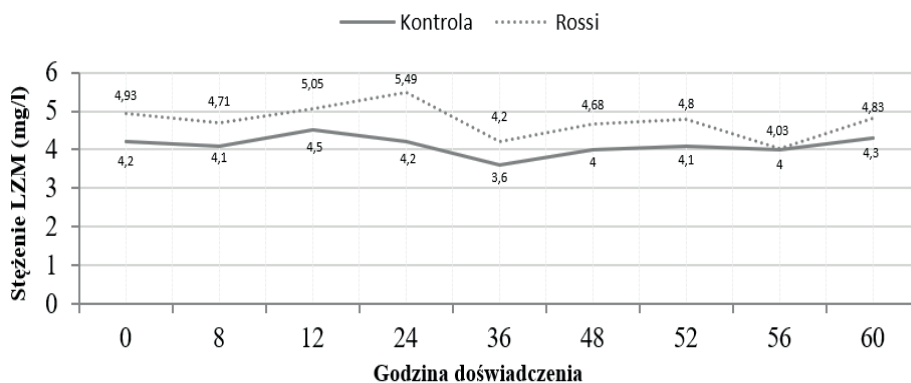


Źródło: Opracowanie własne

Stężenie LZM wahało się od 4,03 mg/l do 5,49 mg/l (wykres 2). U królików kontrolnych, wartości stężenia LZM mieściły się w przedziale od 3,60 mg/l do 4,50 mg/l (wykres 2). Z analizy dynamiki zmian wartości stężenia LZM wynika, że wartości badanego parametru u zwierząt z grupy zakażonej od początku trwania doświadczenia wykazywały tendencję wzrostową względem królików kontrolnych (wykres 2). Wyniki badań stężenia LZM poddano analizie statystycznej, która wykazała, że zakażenie szczepem Rossi wirusa *Lagovirus europaeus* GI.1a nie powoduje zmian statystycznie istotnych w przypadku badanego parametru (wykres 2).

W badaniach stwierdzono, że wartości aktywności LZM, u królików zakażonych szczepem Rossi wirusa *Lagovirus europaeus* GI.1a mieściły się w przedziale od 0,0004 do 0,0014 (wykres 3). U królików kontrolnych warto-

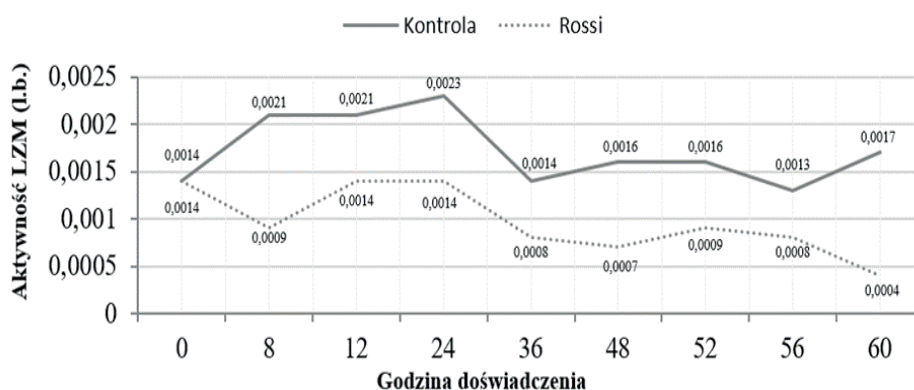
Wykres 2. Dynamika zmian stężenia LZM u królików zakażonych eksperymentalnie wariantem antygenowym Rossi *Lagovirus europaeus* GI.1a.



Źródło: Opracowanie własne

ści aktywności LZM wahały się przedziale od 0,0013 do 0,0023 (wykres 3). Analizując dynamikę zmian wartości aktywności LZM u zwierząt zakażonych, zaobserwowano, że wartości badanego parametru w stosunku do królików z grupy kontrolnej wykazywały tendencję spadkową (wykres 3). Otrzymane wyniki aktywności LZM poddano analizie statystycznej, która wykazała, że zakażenie szczepem Rossi *Lagovirus europaeus* GI.1a nie powoduje zmian statystycznie istotnych w przypadku aktywności LZM (wykres 3).

Wykres 3. Dynamika zmian aktywności LZM u królików zakażonych eksperymentalnie wariantem antygenowym Rossi *Lagovirus europaeus* GI.1a.



Źródło: Opracowanie własne

Podczas doświadczenia zaobserwowano wiele objawów klinicznych, m.in. kichanie, zgęstnienie krwi, brak reakcji na bodźce zewnętrzne, przyspieszenie oddechu, ogólną sztywność ciała, ospałość, zwiększone pragnienie, zwiększoną krzepliwość krwi oraz brak apetytu. Pierwsze objawy u zwierząt zaobserwowano już w 8. godzinie doświadczenia. W kolejnych godzinach doświadczenia objawy zaczęły się nasilać i występowały aż do 60. godziny doświadczenia. W trakcie przeprowadzonego doświadczenia temperatura wewnętrzna królików wynosiła od 36,9°C do 39,5°C (tabela 1). U większości zwierząt zainfekowanych szczepem Rossi wirusa *Lagovirus europaeus* GI.1a w drugiej dobie odnotowano spadek masy ciała w stosunku do królików kontrolnych, u których waga pozostała niezmienna. Przed zgonem zwierząt zaobserwowano spadek temperatury ciała. Pomiędzy godziną 12. a 24. nastąpił zgon pierwszego królika, u pozostałych królików odnotowano nasilone objawy zakażenia. Następnie pomiędzy godziną 24. a 36. odnotowano zgon kolejnego królika. Od godziny 36. do zakończenia doświadczenia (tj. godziny 60.) nie odnotowano już zgonów zwierząt zakażonych. Śmiertelność zwierząt w 60. h doświadczenia wyniosła 40% (tabela 2).

Tabela 1. Temperatura wewnętrzna oraz masa królików eksperymentalnie zakażonych wariantem antygenowym Rossi *Lagovirus europaeus* GI.1a oraz królików kontrolnych.

		Rossi <i>Lagovirus europaeus</i> GI.1a					Grupa królików kontrolnych				
Badany parametr	Dzień	Numer królika					Numer królika				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Temperatura wewnętrzna ciała królików[°C]	I	39,5	38,1	36,9	39,4	37,1	38,4	37,2	37,5	37,8	38,4
	II	37,1	37,9	38,5	38,5	38,6	39,6	39,4	39,0	38,2	39,7
	III	38,6	–	37,4	–	37,4	39,1	38,9	38,6	38,7	38,9
Waga królików [kg]		2,60	3,30	2,80	2,80	2,80	2,60	4,55	4,45	2,90	2,70

Źródło: Opracowanie własne

Tabela 2. Śmiertelność królików zakażonych eksperymentalnie wariantem antygenowym Rossi *Lagovirus europaeus* GI.1a

Godzina od zakażenia		0h	8h	12h	24h	36h	48h	52h	56h	60h
Liczba zakażonych zwierząt		5	5	5	4	3	3	3	3	3
Godziny zgonu zwierząt od zakażenia		–	–	–	12/24	24/36	–	–	–	–
Liczba padłych zwierząt	w danej godzinie	0	0	0	1	1	0	0	0	0
	od momentu zakażenia	0	0	0	1	2	2	2	2	2
Procent śmiertelności (%)	w danej godzinie	0	0	0	20	25	0	0	0	0
	od momentu zakażenia	0	0	0	20	40	40	40	40	40

Źródło: Opracowanie własne

Dyskusja

Wyniki własnych badań dotyczących wybranych wskaźników odporności naturalnej, takich jak: aktywność MPO oraz stężenie i aktywność LZM, uzyskanych podczas eksperymentalnego zakażenia królików wariantem antygenowym Rossi *Lagovirus europaeus* GI.1a zestawiono i porównano z wynikami dotyczącymi aktywność MPO oraz stężenia i aktywność LZM przedstawionymi przez innych autorów (tabela 3), które dotyczyły siedmiu wariantów antygenowych: Vt97, Triptis, Hartmannsdorf, Pv97, 9905 i 72V/2003 (Niedźwiedzka-Rystwej 2013) oraz Erfurt (Hrynkiewicz, Boniek 2018).

Tabela 3. Zestawienie własnych wyników badań z wynikami badań wybranych autorów dotyczących aktywności MPO, stężenia i aktywności LZM u królików eksperymentalnie zakażonych wariantami antygenowymi wirusa *Lagovirus europaeus* GI.1a (Niedźwiedzka-Rystwej 2013; Hrynkiewicz, Boniek 2018).

Szczep wirusa <i>Lagovirus europaeus</i> GI.1a	Badany parametr					
	Aktywność MPO		Stężenie LZM		Aktywność LZM	
	wzrosty ↑	spadki ↓	wzrosty ↑	spadki ↓	wzrosty ↑	spadki ↓
Rossi*	12,24,36, 48,52,56,60	–	b. z.		b. z.	
Vt97	b. z.		4,12,24,36	–	–	8,36
Triptis	–	8,12,24	b. z.		b. z.	
Hartmannsdorf	b. z.		4,8	–	–	24
Pv97	–	8,12,24,36	–	4,8,12, 24,36	b. z.	
9905RHDVa	–	12,24	b. z.		–	36
72V/2003	–	12,24	24	–	–	24
Erfurt	36–60	–	24,56,60	–	48,52,56	–

Objaśnienia: * – wyniki omawianego szczepu; ↑/↓ – statystycznie istotny wzrost/spadek przy $p = 0,05$; b.z. – brak zmian statystycznie istotnych

Źródło: Opracowanie własne

Analizując uzyskane wyniki dynamiki zmian aktywności MPO (wykres 1), stwierdzono, że badany wariant antygenowy Rossi *Lagovirus europaeus* GI.1a kluczowo wpływa na aktywność całego systemu MPO, gdyż odnotowano aż siedem zmian statystycznie istotnych, objawiających się statystycznie istotnym wzrostem aktywności MPO w 12, 24, 36, 48, 52, 56 oraz 60 godzinie doświadczenia (wykres 1). Porównując uzyskane wyniki aktywności MPO z wynikami innych autorów (tabela 3), stwierdzono, że spośród siedmiu przebadanych dotychczas wariantów antygenowych tylko szczep Erfurt wykazuje statystycznie

istotne wzrosty aktywności MPO, które odnotowano w 36, 48, 52, 56 oraz 60 godzinie doświadczenia (Hrynkiewicz, Boniek 2018). Przy szczepach Triptis, Pv97, 9905 RHDVa oraz 72V/2003 wystąpiły wyłącznie statystycznie istotne spadki aktywności MPO, natomiast w przypadku szczepów Vt97 oraz Hartmannsdorf nie odnotowano zmian statystycznie istotnych (Niedźwiedzka-Rystwej 2013).

Oceniając uzyskane wyniki dynamiki zmian stężenia LZM (wykres 2) dla wariantu antygenowego Rossi *Lagovirus europaeus* GI.1a, zaobserwowano, iż szczep Rossi nie wykazuje istotnego wpływu na zmiany w wartościach stężenia LZM, gdyż nie odnotowano jakichkolwiek zmian statystycznie istotnych (wykres 2). Porównując otrzymane wyniki stężenia LZM z wynikami badań wariantów antygenowych uzyskanymi przez innych autorów (tabela 3), wykazano, że spośród siedmiu przebadanych dotychczas wariantów antygenowych również w przypadku szczepu Triptis oraz 9905 RHDVa nie zaobserwowano zmian statystycznie istotnych (Niedźwiedzka-Rystwej 2013). Przy czterech szczepach: Vt97, Hartmannsdorf, 72V/2003 (Niedźwiedzka-Rystwej 2013) oraz Erfurt (Hrynkiewicz, Boniek 2018) odnotowano wyłącznie statystycznie istotne wzrosty stężenia LZM, natomiast tylko szczep Pv97 wykazał statystycznie istotne zmiany w postaci spadków stężenia LZM (Niedźwiedzka-Rystwej 2013).

Analizując uzyskane wyniki dynamiki zmian w obrębie aktywności LZM (wykres 3), wykazano, iż badany szczep Rossi *Lagovirus europaeus* GI.1a, tak samo jak w przypadku stężenia LZM, nie wpłynął znacząco na badany parametr, gdyż nie odnotowano ani jednej zmiany statystycznie istotnej (wykres 3). Porównując własne wyniki aktywności LZM z wynikami przedstawionymi przez innych autorów (tabela 3), zaobserwowano, że spośród wszystkich dotychczas przebadanych szczepów tylko w przypadku szczepów Triptis oraz Pv97 nie odnotowano zmian statystycznie istotnych (Niedźwiedzka-Rystwej 2013). Statystycznie istotne wzrosty aktywności LZM odnotowano w przypadku wariantu antygenowego Erfurt (Hrynkiewicz, Boniek 2018), natomiast przy czterech szczepach: Vt97, Hartmannsdorf, 9905RHDVa oraz 72V/2003 odnotowano wyłącznie statystycznie istotne spadki aktywności LZM (Niedźwiedzka-Rystwej 2013).

Analizując własne wyniki badań klinicznych zarejestrowanych podczas doświadczenia, stwierdzono, że pierwsze objawy kliniczne obserwowane przy szczepie Rossi *Lagovirus europaeus* GI.1a odnotowano już w 8. godzinie doświadczenia i utrzymywały się do godziny 60. (tj. do zakończenia doświadczenia). Wariant Rossi *Lagovirus europaeus* GI.1a powodował przede wszystkim wystąpienie takich objawów, jak kichanie, zgęstnienie krwi, brak reakcji na bodźce zewnętrzne, przyspieszenie oddechu, ogólną sztywność ciała oraz ospa-

łość. Wszystkie odnotowane objawy kliniczne występujące podczas zakażenia były typowe dla choroby pomoru królików (RHD).

Śmiertelności królików zakażonych szczepem Rossi *Lagovirus europaeus* GI.1a pod koniec doświadczenia (tj. w godzinie 60.) wyniosła 40%. W porównaniu do śmiertelności uzyskanych w badaniach innych autorów, która mieściła się w przedziale od 77 do 100%, szczep Rossi charakteryzuje się podostrym przebiegiem choroby i niską śmiertelnością.

Podsumowanie

Podsumowując badania, można stwierdzić, że wyniki uzyskane przy wariacie antygenowym Rossi wirusa *Lagovirus europaeus* GI.1a w znaczny sposób odbiegają od wyników uzyskanych przy zastosowaniu innych wariantów antygenowych, co potwierdza hipotezę odmienności immunologicznej *Lagovirus europaeus* GI.1a. Śmiertelność królików zakażonych w przypadku wariantu antygenowego Rossi *Lagovirus europaeus* GI.1a wyniosła 40%, co w porównaniu do innych wariantów antygenowych, przy których śmiertelność wynosiła od 77 do 100%, *świadczy o niskiej zjadliwości badanego wariantu antygenowego.*

Literatura

- Abrantes J., Lopes A. M., Dalton K. P., Parra F. F., Esteves P. J. 2014. Detection of RHDVa on the Iberian Peninsula: isolation of an RHDVa strain from a Spanish rabbit. Arch. Virol., 159, 321-326.
- Abrantes J., van der Loo W., Le Pendu J., Esteves P. J. 2012. Rabbit haemorrhagic disease (RHD) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). Vet. Res., 43: 12.
- Afanasjew W. I., Kolot L. I. 1971. Zmiany peroksydazy i cytochromoksydazy w krwi Karpow *Cyprinus Carpio* L. prikrasnuchie. Woprosy Ichtiologii, 11: 940-943.
- Anon 2010. Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady 2010/63/UE z dnia 22 września 2010 r. w sprawie ochrony zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych. Dziennik Urzędowy Unii Europejskiej L267/33.
- Fitzner A., Kęsy A., Niedbalski W., Paprocka G. 2000. Wykrywanie wirusa krwotocznej choroby królików w chorych zwierzętach. Med. Wet., 56: 43-48.
- Fitzner A., Niedbalski W. 2017. Różnorodność wirusa RHD – znaczenie epidemiologiczne, diagnostyczne i immunologiczne. Med. Weter., 73: 811-818.
- Hankiewicz J., Świerczek E. 1975. Porównawcze oznaczenie lizozymu metodą dyfuzji płytkowej i metodą nefelometryczną. Przegl. Lek., 32: 376-378.

- Hrynkiewicz R., Boniek M. 2018. Parametry odporności naturalnej (MPO, LZM) u królików eksperymentalnie zakażonych wariantem antygenowym Erfurt wirusa RHD (rabbit haemorrhagic disease), Mat. Konf, Biotechnologia – problemy i wyzwania, Szczecin.
- Liu S. J., Xue H. P., Pu B. Q., Quian N. H. 1984. A new viral disease in rabbits. Anim. Hus. Vet. Med., 16: 253-255.
- Niedźwiedzka-Rystwej P. 2013. Zjawiska immunologiczne u królików zakażonych wirusem RHD (Rabbit Haemorrhagic Disease). Praca habilitacyjna, Wyd. ZAPOL, Szczecin.
- Szmigielski S. 1972. Ocena stanu czynnościowego układu granulocytów w warunkach pobudzenia i zahamowania, Wyd. Wojskowy Inst. Med. Lotn., Warszawa.
- Zawistowski S. 1977. Techniki histologiczne, histologia oraz podstawy histopatologii. PZWL, Warszawa.

ABSTRACT

MYELOPEROXIDASE (MPO) AND LYSOZYME (LZM) IN RABBIT NEUTROPHILS (*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*) EXPERIMENTALLY INFECTED WITH ROSSI STRAIN OF *LAGOVIRUS EUROPAEUS* GI.1A VIRUS

This work presents the results of research on selected indicators of natural immunity - MPO activity coefficient and the number and concentration of LZM in rabbits experimentally infected with the German Rossi strain of virus *Lagovirus europaeus* GI.1a. It was observed, that the infection causes changes in the form of statistically significant increases only in MPO activity. These changes occurred at 12, 24, 36, 48, 52, 56, 60 hours after inoculation. Statistically significant changes in the assessment of LZM activity and concentration were not recorded. Clinical manifestations during infection were typical and animal mortality in a 60-hour experiment was 40%. The tested Rossi strain of *Lagovirus europaeus* GI.1a shows a different immunological picture in the tested natural immunity indicators. In infection caused by other strains of *Lagovirus europaeus* GI.1a, mainly decreases in MPO and LZM activity were observed. Also mortality of infected animals with Rossi strain was lower, because in the case of *Lagovirus europaeus* GI.1a strain, which were previously analyzed, it was from 77 to 100% already in 24-36 hours of the experiment.

Słowa kluczowe: królik, *Lagovirus europaeus*, odporność naturalna, MPO, LZM.

Keywords: rabbit, *Lagovirus europaeus*, natural resistance, MPO, LZM.

Dane do kontaktu z autorem: rafal.hrynkiewicz@gmail.com

Jakub Hubeny

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Koło Naukowe Mikrobiologów Molekularnych „Coccus”

Opiekun: dr inż. Monika Harnisz

ENTEROTOKSYCZNOŚĆ SZCZEPÓW STAPHYLOCOCCUS SP. WYIZOLOWANYCH Z ŻYWNOŚCI

Wstęp

Charakterystyka bakterii z rodzaju *Staphylococcus*

Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* należą do drobnoustrojów Gram-dodatnich, wykazujących brak ruchu oraz brak możliwości wytwarzania przetrwalników (Salyers, Whitt 2012). Zaliczane są one do bakterii fakultatywnie beztlenowych, które potrzebują tlenowych warunków do wzrostu na podłożach hodowlanych. Komórki bakteryjne w obrazie mikroskopowym występują jako pojedyncze formy ziarniakowate, formujące się w postaci gron (Harris, Richards 2006). Bakterie z rodzaju *Staphylococcus* można podzielić na dwie grupy: koagulazo pozytywne oraz koagulazo negatywne (CDC 2003). Koagulazo pozytywne gronkowce posiadają zdolność wytwarzania koagulazy, która powoduje aglutynację elementów krwi, w efekcie czego powstają skrzepy krwi. Do gronkowców wytwarzających koagulazę należy *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, natomiast do gronkowców nie wytwarzających koagulazy zaliczają się *Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus* (Howard, Kloss 1987). Ściana komórkowa gronkowców jest zbudowana z warstw peptydoglikanu oraz kwasu teichojowego, dodatkowo na powierzchni występują adhezyny i toksyny.

Gronkowce są często izolowane spośród ludzkiej mikrobioty skóry oraz błon śluzowych górnych dróg oddechowych (Crossleyin. 2009). Wśród wielu wytwarzanych czynników wirulencji przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, do najczęściej wymienianych należą enterotoksyny. Stanowią one pomoc dla drobnoustrojów w lokalnej kolonizacji tkanek oraz, co najważniejsze, stanowią

jeden z najczęstszych powodów występowania zatruc pokarmowych na świecie (Zecconi, Scali 2013). Obecne ustawy o bezpieczeństwie konsumentów nakazują badania żywności w kierunku obecności enterotoksyn SEA, SEB, SEC, SED i SEE. Najnowsze informacje z literatury opisującej masowe zatrucia pokarmowe spowodowane przez enterotoksyczne szczepy *S. aureus* wskazują na inne czynniki niż enterotoksyny z grupy SEA-SEE. Światowa literatura wskazuje, że obowiązujące zalecenia mogą nie zapewniać pełnej ochrony dla konsumentów (Kadariya i in. 2014).

Występowanie *Staphylococcus* sp. w żywności

Jedną z najważniejszych i najczęstszych przyczyn zatruc pokarmowych na świecie u ludzi to występowanie enterotoksycznych szczepów gronkowców (Korpysa-Dzirba i in. 2012; Nia i in. 2016). Zatrucia są wywoływane częściej w sposób pośredni niż bezpośredni przez bakterie. Gronkowce wytwarzają enterotoksyny stwarzające problemy zdrowotne u ludzi. Zdolność do wytwarzania tych metabolitów wtórnych posiadają zarówno gronkowce koagulazo-dodatnie (np. *Staphylococcus aureus*), jak i koagulazo-ujemne (np. *Staphylococcus epidermidis*) (Hennekinne i in. 2010). Aby doszło do gronkowcowego zatrucia pokarmowego, musi wystąpić chociaż jeden z czterech czynników: (1) źródło zawierające enterotoksyczny szczep gronkowca, np. nosiciel zanieczyszczający produkt na różnych etapach jego produkcji albo zwierzę z infekcją gronkowcową; (2) przenoszenie bakterii ze źródła do żywności, np. brak higieny pracowniczej przy linii produkcyjnej; (3) odpowiednie warunki otoczenia oraz właściwości fizyko-chemiczne żywności, umożliwiające szybkie namnożenie się szczepów gronkowca oraz wytworzenie enterotoksyn; (4) spożycie na tyle dużej ilości skażonego pożywienia pozwalającej wywołać objawy kliniczne (Korpysa Dzirbai in. 2012). Najwięcej zatruc pokarmowych następuje z powodu złej praktyki higienicznej podczas procesu produkcyjnego (Asao i in. 2003) i dystrybucji produktów (Pereira i in., 1996). Po kontaminacji utrzymywanie złych warunków przechowywania może indukować wzrost bakterii oraz produkcję enterotoksyn (Hennekinne i in. 2012).

Zatrucia pokarmowe

Zatrucia pokarmowe zostały określone przez Światową Organizację Zdrowia jako rezultat chorobowy spowodowany przez spożywanie produktów zanieczyszczonych elementami biologicznymi czy chemicznymi. Występujące symptomy stanowią szeroki zbiór zależący od czynnika etiologicznego, natomiast najczęściej występującymi są wymioty i biegunka (Wieneke i in. 1993).

Drobnoustroje stanowią dominującą przyczynę występowania chorób na tle pokarmowym. Dane wskazują, że 2/3 przypadków zatruc pokarmowych jest wywołana przez bakterie. Występują trzy rodzaje schorzeń spowodowanych przez zatrucia związane z obecnością gronkowców, zaliczamy do nich wstrząs toksyczny, choroby pokarmowe i choroba Rittera (Murray, 2005). Wstrząs toksyczny spowodowany jest przez enterotoksynę wstrząsu toksycznego (TSST-1). Toksyna jest swojego rodzaju superantygenem, który łącząc się z wieloma receptorami MHC klasy drugiej, wywołuje uogólnioną, silną reakcję układu odpornościowego organizmu gospodarza. Enterotoksyna TSST-1 jest również powiązana z syndromem nagłej śmierci niemowląt, syndromem Kawasaki oraz kilkoma chorobami autoimmunologicznymi (Kotb 1995). Wczesne objawy ukazują się jako wysypka i gorączka, dodatkowo przy interakcji toksyny w układzie pokarmowym odpowiedź organizmu objawia się wymiotami i biegunką. Objawy przy postępującym wstrząsie to nagła niewydolność wielonarządowa. Najczęstszymi ostatecznymi objawami są niewydolność mięśnia sercowego, wstrząs mięśniowy i śpiączka (Schlievert i in. 1981; Kotb 1995). Zatrucie pokarmowe występuje w przypadku spożycia skontaminowanej żywności przez toksyny gronkowcowe. Wszystkie enterotoksyny gronkowcowe powodują wymioty oraz zwiększenie perystaltyki jelit, prowadząc do biegunek (Balaban, Rasooly 2000).

Enterotoksyny gronkowcowe

Enterotoksyny gronkowcowe to krótkie łańcuchy proteinowe wydzielane do środowiska bytowania bakterii. W swoim składzie są bogate w lizynę, kwas asparaginowy, kwas glutaminowy i reszty tyrozyny. Posiadają w większości pętlę cysteinową potrzebną do prawidłowej konformacji (Le Loir i in. 2003). Ich wysoka aktywność utrzymuje się na poziomie od mikrogramów do nanogramów (Larkin i in. 2009). Posiadają one wysoką odporność na warunki środowiskowe, takie jak wysoka temperatura czy niskie pH, które z łatwością niszczą produkujące toksyny bakterie. Dodatkowo toksyny są odporne na enzymy proteolityczne, dzięki czemu utrzymują swoją aktywność po przedostaniu się do przewodu pokarmowego (Bergdoll 1983; Evenson i in. 1988). Toksyny gronkowcowe należą do szerokiej rodziny superantygenowych toksyn. Rozpoznawanie toksyn polega na interakcji z receptorami błonowymi MHC klasy drugiej komórek prezentujących antygeny oraz dalsze przekazanie odpowiedzi dzięki komórkom T (receptor TCR) (Fleischer i in. 1991). Nazwa toksyny gronkowcowe została skorelowana z ich aktywnością do wzbudzenia odruchów wymiotnych (Lina i in. 2004). Jedynie toksyny powodujące wymioty po wprowadzeniu do układu pokarmowego można nazwać toksynami gronkowcowymi (*staphylococcal*

enterotoxins – *SEs*), natomiast toksyny, które nie wykazują efektu wymiotnego lub nie zostały jeszcze przebadane w kierunku takich właściwości określane są jako toksyny gronkowcopodobne (*staphylococcal like-enterotoxins* – *SEIs*) (Argudiniin.2010). Obecnie obydwie grupy enterotoksyn są reprezentowane przez 22 toksyny. Należy do nich 5 podstawowych toksyn SEA, SEB, SEC, SED oraz SEE (Bergoll i in. 1965; Bergdoll i in. 1971), nowe toksyny SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET oraz toksyny gronkowcopodobne, takie jak SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIU, SEIU2, SEIV (Jarraud i in. 2001; Letertre i in. 2003; Ono i in. 2008; Orwin i in. 2001). Toksyna TSST-1, czyli toksyna wstrząsu toksycznego, w przyszłości ma być zakwalifikowana jako SEF (Bergdoll i in. 1981).

Tabela 1. Molekularna charakterystyka enterotoksyn gronkowcowych.

Enterotoksyna	Gen warunkujący	Element genetyczny
SEA	<i>sea</i>	profag
SEB	<i>seb</i>	plazmid, wyspa patogeniczności
SEC	<i>sec</i>	plazmid
SED	<i>sed</i>	plazmid (pIB485)
SEE	<i>see</i>	profag
SEG	<i>seg</i>	operon <i>egc</i> , chromosom
SEH	<i>seh</i>	transpozon
SEI	<i>sei</i>	operon <i>egc</i> , chromosom
SEIJ	<i>selj</i>	plazmid (pIB485)
SEK	<i>sek</i>	wyspa patogeniczności
SEIM	<i>selm</i>	operon <i>egc</i> , chromosom
SEIN	<i>seln</i>	operon <i>egc</i> , chromosom
SEIO	<i>selo</i>	operon <i>egc</i> , chromosom
SEIP	<i>selp</i>	profag (Sa3n)
SEIQ	<i>selq</i>	wyspa patogeniczności
SER	<i>ser</i>	plazmid (pIB485)
SES	<i>ses</i>	plazmid (pIB485)
SET	<i>set</i>	plazmid (pIB485)

Źródło: Hennekinne i in. 2010

Genetyczne podstawy enterotoksyczności

Geny toksyny SE i SEI są zlokalizowane na dodatkowych elementach genetycznych, takich jak plazmidy, profagi, wyspy patogeniczności *S. aureus* czy wyspy genomowe. (Argudiniin 2010). Większość tych elementów należy do grupy mobilnych elementów genetycznych, dlatego stanowi to poważne zagrożenie przy rozprzestrzenianiu się enterotoksyczności w środowisku. Wszystkie znane enterotoksyny gronkowcowe są warunkowane przez odpowiednie geny, które umieszczone są na swoistych nośnikach. Dane na ten temat zostały przedstawione w tabeli 1. Najlepiej znane systemy, które regulują ekspresję genów u gronkowców to *agr*, *sar*, które można podzielić na *sara*, *sarS*, *sarT* i *sarR*, oraz *rot*, który jest represorem wytwarzania toksyn. Wymienione systemy mogą bezpośrednio wpływać na wytwarzanie enterotoksyn gronkowcowych (Peng i in. 1988; McCulloch i in 2006). Mechanizm *agr* jest najlepiej zbadanym locus, który stanowi grupę genów, posiadającą aktywność *quorum sensing*, regulującą ekspresję wielu czynników wirulencji. Locus *agr* jest zbudowany z dwóch operonów. Zawiera co najmniej pięć genów (*agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD*, gen delta hemolizyny *hld*) oraz jest kontrolowany przez dwa promotory P₂ i P₃.

Cel

Celem badań było określenie występowania genów odpowiedzialnych za wytwarzanie enterotoksyn przez szczepy z rodzaju *Staphylococcus* sp. wyizolowane z żywności gotowej do spożycia.

Materiał i metody

Przedmiot badań

Materiał do badań stanowiły wybrane produkty gotowe do spożycia pochodzące ze sklepu spożywczego oraz lokali strefy gastronomicznej jednego z centrów handlowych w Olsztynie. Do produktów ze sklepu spożywczego należały: twaróg swojski oraz ser typu Capri. Pozostałe produkty wykorzystane do badań pochodziły z punktu strefy gastronomicznej, były to: sushi, sałatka z tuńczykiem, sałatka z serem pleśniowym, sałatka z łososiem, sałatka z kurczakiem oraz tatar z łososia, dodatkowo wybrano dressing pesto. Lokal ze strefy gastronomicznej posiada charakter samoobsługowy, w związku z czym wszystkie produkty przechowywane są w otwartej ladzie, gdzie klienci mają bezpośredni kontakt z produktem. Materiał został bezpośrednio przetransportowany do laboratorium, gdzie przystąpiono do analiz.

Izolacja szczepów z rodzaju *Staphylococcus* z żywności

Pierwszym etapem izolacji gronkowców było prenamnażanie. W tym celu odważono po 10 g każdego produktu i przeniesiono do jałowych probówek zawierających wodę peptonową, zworteksowano i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h. W tym samym czasie tą samą metodą wykonano posiew do dwukrotnie stężonego płynnego podłoża Giolitti-Cantoni oraz inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h. Po inkubacji wykonano posiew 0,1 ml z probówek z wodą peptonową na podłoże stałe Baird-Parkera metodą powierzchniową oraz inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 h. Dodatkowo wykonano posiew redukcyjny z płynnego podłoża Giolitti-Cantoni na podłoże stałe Baird-Parkera, po czym prowadzono hodowle w temperaturze 37°C przez 24 h.

Tabela 2. Startery wykorzystane do wykrywania poszukiwanych genów enterotoksyn gronkowców

Gen	Primer	Sekwencja (5' → 3')	Wielkość produktu (bp)
sea	sea-1	gaa aaa agt ctg aat tgc agg gaa ca	560
	sea-2	caa ata aat cgt aat taa ccg aag gtt c	
seb	seb-1	att cta tta agg aca cta agt tag gga	404
	seb-2	atc ccg ttt cat aag gcg agt	
sec	sec-1	ctt gta tgt atg gag gaa taa caa aac atg	275
	sec-2	cat atc ata cca aaa agt att gcc gt	
sed	sed-1	gaa tta agt agt acc gcg cta aat aat atg	492
	sed-2	gct gta ttt ttc ctc cga gag t	
see	see-1	caa aga aat gct tta agc aat ctt agg c	482
	see-2	cac ctt acc gcc aaa gct g	
eta	eta-1	act gta gga gct agt gca ttt gt	190
	eta-2	tgg ata ctt ttg tct atc ttt ttc atc aac	
ser	ser-1	agc ggt aat agc aga aaa tg	363
	ser-2	tct tgt acc gta acc gtt tt	
sei	sei-1	cty gaa ttt tca acm ggt ac	461
	sei-2	agg cag tcc atc tcc tg	
selu	seu-1	aat ggc tct aaa att gat gg	215
	seu-2	att tga ttt cca tca tgc tc	
selp	sep-1	gaa ttg cag gga act gct	182
	sep-2	ggc ggt gtc ttt tga ac	

Źródło: Opracowanie własne

Izolacja materiału genetycznego ze szczepów *Staphylococcus* sp.

Izolacja materiału genetycznego z uzyskanych kolonii gronkowców została wykonana za pomocą zestawu Genomic Mini (A&A Biotechnology) zgodnie z protokołem producenta. Uzyskany wyizolowany materiał genetyczny przechowywano w -20°C do momentu przewidzianych analiz.

Stwierdzenie obecności genów enterotoksyczności

Wyizolowany materiał genetyczny ze szczepów posłużył do określenia obecności genów warunkujących enterotoksyny. Określano obecność genów enterotoksyczności: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* (warunkujących wytwarzanie pięciu podstawowych enterotoksyn A, B, C, D oraz E) oraz geny *sei*, *ser*, *selu* i *selp*. Dodatkowo określono obecność genu *eta* warunkującego produkcję toksyny odpowiedzialnej za wywołanie choroby Rittera. Sekwencje starterów użytych w reakcji PCR zostały przedstawione w tabeli 2. Mieszanina reakcyjna o całkowitej objętości 25 µL zawierała: 3 µL matrycowego DNA, 1 µL każdego ze starterów (10 µM), 1 µL Polimerazy RUN, 2,5 µL buforu RUN, 1 µL mieszaniny dNTPs oraz 15,5 µL sterylnej wody. Zoptymalizowana temperatura przyłączania starterów użyta w reakcji PCR wynosiła 55°C.

Obrazowanie wyników reakcji PCR: otrzymane produkty po przeprowadzonej reakcji PCR obrazowano przy pomocy rozdziału elektroforetycznego. Rozdział elektroforetyczny wykonywano w 1,5-procentowym żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (0,5 mg/ml).

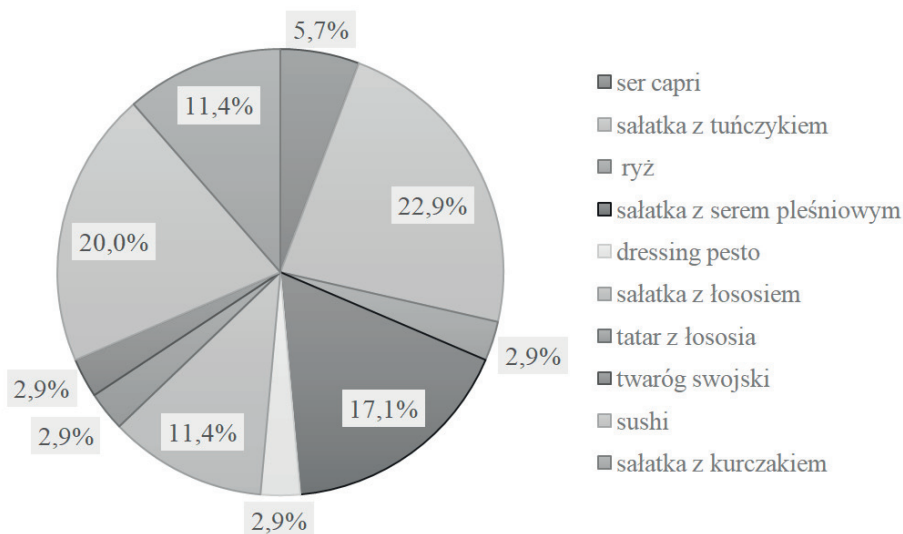
Wyniki

Z badanego materiału uzyskano 35 szczepów bakterii z rodzaju *Staphylococcus*. Najwięcej szczepów wyizolowano z produktów takich jak: sałatka z tuńczykiem, sałatka z serem pleśniowym oraz sushi. Najmniej szczepów wyizolowano z tatarsa z łososia, dressingu pesto, twarogu swojskiego oraz ryżu, który wchodził w skład tatarsa z łososia (ryc. 1).

Przeprowadzone badania wskazały, że u wyizolowanych z żywności gronkowców najczęściej występującym genem enterotoksyczności był gen *sei*, zidentyfikowano go u 23 szczepów. Gen *seb* występował u 8 szczepów, gen *sec* nie wystąpił u żadnego szczepu. Wykazano natomiast obecność genów z grupy SEIs. Gen *selu* wystąpił u dwóch szczepów, gen *selp* zidentyfikowano u pięciu szczepów. Obecność genu *eta* stwierdzono u jednego szczepu (ryc.2).

Biorąc pod uwagę badane produkty spożywcze, najwięcej genów oznaczono w szczepach izolowanych z tych produktów, takich jak: sałatka z serem pleśniowym

Ryc. 1. Odsetek enterotoksycznych gronkowców wyizolowanych z badanych produktów spożywczych.



Źródło: Opracowanie własne

Ryc. 2. Liczba genów enterotoksyczności u wyizolowanych szczepów gronkowców.



Geny	<i>sea</i>	<i>seb</i>	<i>see</i>	<i>sed</i>	<i>sec</i>	<i>eta</i>	<i>sei</i>	<i>ser</i>	<i>selu</i>	<i>selp</i>
Ilość	2	8	3	3	0	1	23	1	2	5
%	4,2	16,7	6,3	6,3	0,0	2,1	47,9	2,1	4,2	10,4

Źródło: Opracowanie własne

wym, skąd wyizolowano sześć szczepów, u których określono obecność genów *seb*, *see*, *sei*, oraz sałatka z tuńczykiem, gdzie wyizolowano osiem szczepów, u których stwierdzono występowanie genów *sed*, *się*, *selu* i *selp*. Najmniej szczepów z genami enterotoksyczności stwierdzono w takich produktach jak: dressing pesto, ryż pochodzący z tataru, tatar z łososia oraz twaróg swojski.

W przeprowadzonych badaniach wyizolowano 6 szczepów (17,1%) z rodzaju *Staphylococcus*, które posiadały 3 geny enterotoksyczności, 10 szczepów (28,6%) posiadających 2 geny, 10 szczepów (28,6%) posiadających 1 gen i 9 szczepów (25,7%), które nie posiadały ani jednego z określanych genów.

Dyskusja

Zatrucia spowodowane spożyciem skażonej żywności stanowią poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego na całym świecie (Karadiya i in. 2014). Światowa Organizacja Zdrowia określa zatrucia pokarmowe (FBD) jako choroby spowodowane poprzez drobnoustrój lub toksynę wnikającą do organizmu poprzez spożycie pokarmu lub wody (Le Lor i in. 2003). Zatrucia pokarmowe spowodowane przez bakterie z rodzaju *Staphylococcus* (SFP) są jednymi z najczęściej występujących na świecie (Hennekinnein 2010). Zatrucia te najczęściej skorelowane są z występowaniem szczepów enterotoksycznych gronkowców, które charakteryzują się wytwarzaniem enterotoksyn. Głównie wskazuje się na gronkowce koagulazo-dodatnie (CPS), najlepszym przykładem jest *Staphylococcus aureus* (Hennekinne i in. 2012). Do szczepów charakteryzujących się cechami enterotoksyczności można zaliczyć również gronkowce koagulazo-ujemne (CNS), wśród nich przykładem jest *Staphylococcus haemolyticus* (Pinheiro i in. 2015).

Najczęstszymi produktami skontaminowanymi toksynami były produkty nabiałowe, potrawy makaronowe, sałatki, mięso i produkty mięsne, jajka i ser (Korsgaard i in. 2012). Częstym źródłem zatruc pokarmowych jest spożycie produktów tzw. „ready-to-eat” (RTE). Shafizi i współpracownicy (2016) w swoich badaniach stwierdzili, że w ponad 50% próbek żywności RTE występował *Staphylococcus aureus*. Najczęstszymi produktami, w których stwierdzono obecność bakterii z rodzaju *Staphylococcus* były sałatki oraz kanapki, które wykonywane są manualnie za pomocą rąk pracowników oraz podawane bez podgrzewania (Colombariini 2007). Kolejnym produktem z kategorii RTE, w którym może dochodzić do kontaminacji bakteriami z rodzaju *Staphylococcus* jest sushi lub sashimi (Puahiin.2016).

Wykonane badania wskazują, że najwięcej szczepów z rodzaju *Staphylococcus* wyizolowano z produktów spożywczych, takich jak: sushi, sałatka z serem

pleśniowym, sałatka z kurczakiem, sałatka z łososia i sałatka z tuńczykiem. Uzyskane wyniki zgadzają się z ogólnościową literaturą, która potwierdza najczęstsze występowanie gronkowców w wyżej wspomnianych produktach (Byrd Bredbenneriiin 2013; Kadariyaiin 2014; Korsgaard i in. 2014). Literatura potwierdza częste występowanie gronkowców w mięsie ryb, takich jak łosoś czy tuńczyk. Kontaminacja dotyczy zarówno mięsa surowego oraz po wstępnych przygotowaniach. Surowce, takie jak łosoś czy tuńczyk, wchodzą w skład potrawy, jaką jest sushi, gdzie również stwierdzone jest częste występowanie *Staphylococcus* spp. Najczęstszą przyczyną zanieczyszczenia stanowi zła obróbka produktu przez personel (Liangiin.2016; Wu i Su 2014). Surowcem, z którego najczęściej izolowane są szczepy z rodzaju *Staphylococcus* sp., jest mięso drobiowe. Badania prowadzone przez Sallama i współpracowników (2015), w których poddawano do badań 200 próbek, wskazały na występowanie *Staphylococcus aureus* w 40% próbek. Nabiał jest również jednym z najczęściej kontaminowanych produktów spożywczych jeżeli chodzi o zanieczyszczenie gronkowcami. W surowym mleku zawsze wykrywa się obecność bakterii gronkowcowych, z uwagi na występowanie tych drobnoustrojów na skórze zwierząt mlecznych (Sudhanthiramani i in. 2015). Johler i in. (2015) w swoich badaniach wskazali obecność bakterii z rodzaju *Staphylococcus* w produktach mlecznych (twardy ser szwajcarski). Występowanie gronkowców w serach jest skorelowane z wykorzystanym surowcem do ich produkcji. Wykorzystanie surowego mleka do wytworzenia sera zwiększa możliwość występowania gronkowców w końcowym produkcie (Schmid i in. 2016). Należy podkreślić, że najczęściej występowanie *Staphylococcus* spp. w artykułach spożywczych wiąże się z zanieczyszczeniem tych produktów przez personel uczestniczący w produkcji produktów spożywczych. Osoby te są ostatnim ogniwem pomiędzy produkcją artykułów spożywczych a dostarczeniem ich do konsumentów, co stanowi najbardziej wrażliwy element.

Podsumowanie

Przeprowadzone badania wykazały zanieczyszczenie produktów spożywczych bakteriami z rodzaju *Staphylococcus*. Obecność tych drobnoustrojów oraz stwierdzone u nich występowanie genów determinujących wytwarzanie enterotoksyn może stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów.

Literatura:

- Argudin M. A., Mendoza M. C., Rodicio M. R. 2010. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. *Toxins*, 2(7): 1751-1772.
- Asao T., Kumeda T., Kawai T., Shibata T., Oda H., Haruki K., Nakazawa H., Kozaki S. 2003. An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk. *Epidemiol Infect*, 130: 33-40.
- Balaban N., Pasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int. J. Food Microbiol.*, 61: 1-10.
- Bergdoll M. S. 1983. enterotoxins. in staphylococci and staphylococcal infections. Academic press inc, London UK, 1983, 2: 559-598.
- Bergdoll M. S., Borja C. R., Avena R.M. 1965. Identification of a new enterotoxin as enterotoxin c. *J. Bacteriol.*, 90: 1481-1485.
- Bergdoll M. S., Borja C. R., Robbins R. N., Weiss K. F. 1971. Identification of enterotoxin E. *Infect. Immun.*, 4: 593-595.
- Bergdoll M. S., Crass B. A., Reiser R. F., Robbins R. N., Davis J. P. 1981. A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin f, associated with toxic-shock-syndrome staphylococcus aureus isolates. *Lancet*, 5: 1017-1021.
- Byrd-Bredbenner C., Berning J., Martin-Biggers J. 2013. Food safety in home kitchens: a synthesis of the literature. *Int. J. Environ. Res. Pub. Health*, 10: 4060-4085.
- Center for Disease Control and Prevention. 2003. Outbreaks of community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus skin infections - Los Angeles county, California, 2002-2003. *Mmwr.*, 52:5, 88.
- Colombari V., Mayer M. D. B., Laicini Z. M. 2007. Foodborne outbreak caused by staphylococcus aureus: phenotypic and genotypic characterization of strains of food and human sources. *J. Food Protect.*, 70: 489-493.
- Crossley K. B., Jefferson K. K., Archer G. L., Fowler V. G. 2009. Staphylococci in human disease. John Willey & Sons.
- Hennekinne J. A., de Buyser M. L., Dragacci S. 2012. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *Fems. Microbiol. Rev.*, 1-22.
- Hennekinne J. A., Ostyn O., Guillier F., Herbin S., Prufer A.L., Dragacci S. 2010. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? *Toxins*, 2: 2106-2116.
- Johler S., Weder D., Bridy C., Huguenin M. C., Robert L., Hummerjohan J., Stephan R. 2015. Outbreak of staphylococcal food poisoning among children and staff at a swiss boarding school due to soft cheese made from raw milk. *J. Dairy Sci.*, 98(5): 2944-2948.

- Kadariya J., Smith T. C., Thapaliya D. 2014. Staphylococcus aureus and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. Biomed. Res. Int.
- Korpysa-Dzirba W., Rola J. G., Osek J. 2012. Enterotoksyny gronkowcowe. Część I. Epidemiologia i znaczenie dla zdrowia publicznego. Życie Weterynaryjne, 87: 8.
- Nia Y., Mutel I., Assere A., lombard B., Auvray F., Hennekinne J. A. 2016. Review over 3-year period of european union proficiency tests for detection of staphylococcal enterotoxins in food matrices. Toxins, 8: 107.
- Pinheiro L., Brito C. I., de Oliveira A., Martins P. Y. F., Pereira V. C., da Cunha M. D. L. R. D. S. 2015. Staphylococcus epidermidis and staphylococcus haemolyticus: molecular detection of cytotoxin and enterotoxin genes. Toxins, 7(9): 3688-3699.
- Puah S. M., Chua K. H., Tan J. A. M. A. 2016. Virulence factors and antibiotics susceptibility of staphylococcus aureus isolates in ready-to-eat foods: detection of S.aureus contamination and a high prevalence of virulence genes. Int.J. Environ.Res.Pub.Health, 13(2): 199.
- Salyers A. A., Whitt D. D. 2012. Mikrobiologia. różnorodność, chorobotwórczość i środowisko. PWN, Warszawa.
- Shafizi A. W., Ridzuan M., Ubong A., New C. Y., Mohhiddin O., Toh P. S., Son R. 2016. Assessing staphylococcus aureus in ready to eat (rte) food and risk assessment of food premises in putrajaya. Int. F. Res. J., 23: 4.
- Sudhanthiramani S., Swetha C. S., Bharathy S. 2015. Prevalence of antibiotic resistant Staphylococcus aureus from raw milk samples collected from the local vendors in the region of Tirupathi, India. Veterinary World, 8(4): 478-481.
- Schmid M., Oresi P., Schorer M., Berger T., Breidenbach E. 2016. Risk factors involved in the contamination of swiss cheeses by listeria monocytogenes and coagulase-positive staphylococci.

ABSTRACT

ENTEROTOXICITY OF *STAPHYLOCOCCUS* SP. STRAINS ISOLATED FROM FOOD

Bacteria from *Staphylococcus* sp. are pointed as a frequent cause of the food contamination. They carried very important feature in food area by enterotoxins development. The aim of the study was to determine the occurrence of enterotoxicity genes in strains from *Staphylococcus* species isolated from ready-to-eat food articles. Research involved 20 different food articles. Isolation of researched strains was made by simple culture method. Isolated strains were used to determine the presence of enterotoxicity genes, such as: *sea-see*, *eta*,

ser, *sei*, *selu* and *selp*. Most of the strains were isolated from salad with tuna, salad with blue cheese and sushi. 26 from 35 strains (74%) harboured at least one of the determined enterotoxigenicity genes. Most recent was *sei* gene (47,9%), however there were no presence of *sec* gene. Gene *eta* were found in one strain. Results of own research, confirmed the essence of the problem of food contamination with strains of *Staphylococcus* sp. This threat can be derived from possibility of enterotoxigenicity genes possess and their expression of staphylococci coagulase-positive as also coagulase-negative strains.

Słowa kluczowe: enterotoksyczność, żywność, enterotoksyny, gronkowce

Keywords: enterotoxigenicity, food, enterotoxins, staphylococci

Dane do kontaktu z autorem:

jakub.hubeny@uwm.edu.pl

Klaudia Kurczaba, Weronika Kozłowiecka, Maria Szmidt

Uniwersytet Wrocławski

Studenckie Koło Naukowe Mykologów „Mykobiota”

Opiekun: dr Mariusz Dyląg, dr inż. Rafał Ogórek

GRZYBY KERATYNOFILNE I KERATYNOLITYCZNE ZASIEDLAJĄCE PLACE ZABAW W WYBRANYCH PARKACH WROCŁAWIA

Wstęp

Keratyna jest nierozpuszczalnym w wodzie białkiem. Cechuje się wysoką trwałością – zarówno mechaniczną, jak i chemiczną. Białko to powszechnie występuje w tkankach nabłonkowych człowieka oraz innych zwierząt. W komórkach tych tkanek znajduje się w postaci tzw. „keratyny miękkiej”, stosunkowo bardziej podatnej na rozkład niż „keratyna twarda” – budująca takie struktury jak włosy, paznokcie, pióra czy rogi i kopyta (Staroń i in. 2011).

Naturalnym i powszechnym zjawiskiem jest obecność w środowisku źródeł keratyny pochodzenia ludzkiego oraz zwierzęcego. Zasobność środowiska w tego rodzaju substraty stwarza odpowiednie warunki do rozwoju grzybów keratynolitycznych oraz keratynofilnych (Ulfig 2003).

W królestwie grzybów można wyróżnić wysoce wyspecjalizowaną grupę, jaką stanowią dermatofity. Są to grzyby strzępkowe charakteryzujące się zdolnością do pozyskiwania substancji odżywczych z trudno dostępnego białka, jakim jest keratyna (Dworecka-Kaszak, Dąbrowska 2017). Gatunki keratynolityczne posiadają zdolność do rozkładu wyżej wspomnianego białka, natomiast keratynofilne są grupą mniej wyspecjalizowaną – nie inicjują rozkładu bogatych w keratynę struktur, ale wykorzystują produkty pośrednie. Z tego względu w środowisku gatunkom keratynolitycznym towarzyszą grzyby keratynofilne (Ulfig 2003).

Dotychczasowa klasyfikacja dermatofitów uwzględniała trzy rodzaje – *Trichophyton*, *Microsporum* oraz *Epidermophyton*. Ostatnio pojawiły się informacje o znowelizowanej taksonomii tych mikroorganizmów. Dzięki odpowiednim

metodom molekularnym możliwe było wyodrębnienie aż dziewięć rodzajów – *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Microsporium*, *Lophophyton*, *Arthroderma*, *Ctenomyces*, *Guarromyces*, *Paraphyton* (Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes 2016, Dworecka-Kaszak, Dąbrowska 2017). Pomimo iż w obecnej taksonomii zwiększyła się liczba rodzajów, to jej założeniem jest ułatwienie identyfikacji. Poprzez takie działanie zmniejszyła się ilość gatunków blisko spokrewnionych w obrębie jednego rodzaju.

Ze względu na naturalne środowisko bytowania, wśród dermatofitów wyróżniamy trzy grupy ekologiczne: dermatofity antropofilne, zoofilne i geofilne (Hainer 2003). Gatunki antropofilne są związane z człowiekiem, co znajduje odzwierciedlenie w łańcuchach epidemiologicznych, w których to człowiek stanowi główne źródło. Są przyczyną przewlekłych zakażeń skóry o łagodnym przebiegu, bez nasilonego odczynu zapalnego. Problem pojawia się, gdy gatunki zoofilne (których rezerwuarem są zwierzęta), bądź geofilne (których rezerwuarem jest gleba) powodują infekcje u ludzi (*Tinea corporis* caused by *Trichophyton equinum* transmitted from asymptomatic dogs to two siblings 2019, Unusual dermatomycoses caused by *Nannizzia nana*: the geophilic origin of human infections 2020). Takie zakażenia zwykle przejawiają się nasilonym odczynem zapalnym. Grzyby te cechuje niezwykła łatwość transmisji, nie tylko międzypersonalnej, ale także międzygatunkowej. Zwykle nie zagrażają one życiu zaatakowanego gospodarza, aczkolwiek obniżają komfort jego życia, powodując problemy natury estetycznej u ludzi oraz straty ekonomiczne wśród hodowli zwierząt (Dworecka-Kaszak, Dąbrowska 2017). Wszystkie wyżej wymienione cechy grzybów z grupy dermatofitów pozwalają zaliczyć je do grupy patogenów ludzi i zwierząt. Grzyby z tej grupy ekologicznej mają istotny wpływ na jakość życia ludzi oraz mogą istotnie wpływać na wydajność produkcji rolniczej.

Chorobotwórczość związana jest zwykle z warstwą rogową skóry i paznokciami. Częściej powodują grzybice powierzchniowe, jednak zdarzają się też grzybice głębokie, wywoływane przez gatunki zoofilne. Infekcje powodowane przez dermatofity nazywamy dermatomykozami. W przypadku człowieka powszechne są takie jednostki chorobowe jak: grzybica owłosionej skóry głowy (*Tineacapitis*), grzybica brody (*Tineabarbae*), grzybica stóp (*Tineapedum*) itp. Wszystkie związane są z przykrymi zmianami skórnymi, którym nierzadko towarzyszy świąd, stan zapalny czy nawet wydzielina ropna w przypadku infekcji typu kerion Celsi. Opisywano też jednostki chorobowe powodowane jednocześnie przez dwa różne gatunki dermatofitów, chociaż należy zaznaczyć, że tego typu infekcje zdarzają się rzadko (Trzmiel i in. 2011).

Źródła literaturowe wskazują osoby z upośledzeniami odporności, jako szczególną grupę ryzyka podatną na zakażenia (Hainer 2003; Sharma i in. 2015;

Dworecka-Kaszak, Dąbrowska 2017). Należy zwrócić również uwagę, iż w grupie tej znajdują się nie tylko osoby z chorobami dotyczącymi układu immunologicznego, ale również osoby starsze z osłabionym układem odpornościowym, jak i dzieci, które układ ten mają jeszcze nie do końca wykształcony.

Literatura opisuje populację dzieci jako szczególnie narażoną na grzybice o podłożu etiologicznym związanym z dermatofitozami. Szczególnie wysoki procent dzieci dotkniętych tym problemem znajduje się w grupie wiekowej między 3 a 9 rokiem życia (Clinicomycological study of dermatophytoses in children: Presenting at a tertiary care center 2018).

Cel badań

Przeprowadzone badania miały na celu dokonanie oceny zagrożenia epidemiologicznego ze strony grzybów keratynofilnych i keratynolitycznych obecnych na placach zabaw zlokalizowanych w wybranych parkach we Wrocławiu. Miejsca te są szczególnie często odwiedzane przez dzieci. Gleba czy piasek (w piaskownicach) mogą być siedliskiem dla dermatofitów, które stanowią potencjalne zagrożenie dla tej grupy wiekowej. Ważne było zatem przeprowadzenie badań kontrolnych w celu ustalenia stopnia ryzyka. Celem zainicjowanych badań było wykazanie, czy na placach zabaw w wybranych parkach we Wrocławiu obecne są grzyby keratynofilne i keratynolityczne i określenie ich prewalencji. W niniejszej pracy prezentowane są wyniki wstępnych badań. Stanowią one wstęp do dalszych działań naukowych.

Material i metody

Opis miejsc badań

Do poboru materiału wybrano 4 wrocławskie parki, o następujących lokalizacjach geograficznych: Szczytnicki (51°06'52,45"N 17°04'56,83"E), Południowy (51°04'37,19"N 17°00'39,13"E), Wschodni (51°05'07"N 17°04'59"E) oraz Zachodni (51°07'51"N 16°58'24"E).

Park Szczytnicki zajmuje powierzchnię blisko 100 ha, plasując się tym samym na pierwszym miejscu pod względem wielkości. Znajduje się we wschodniej części miasta. Ma on charakter krajobrazowy. Na jego terenie można znaleźć około 400 gatunków drzew oraz krzewów, co czyni go czwartym parkiem w Europie pod względem różnorodności drzewostanu. Rosną tu drzewa, które są pomnikami przyrody, tj. jarzab brekinia (*Sorbustorminalis*) oraz kasztan jadalny (*Castaneasativa*). Ciekawostką dendrologiczną są cypryśniki błotne (*Taxodium-*

distichum) z charakterystycznymi korzeniami oddechowymi (pneumatoforami), rosnące wzdłuż stawu. Nazywany jest perłą wrocławskich parków (<http://www.parki.org.pl/parki-miejskie/park-szczytnicki-we-wroclawiu>).

Park Wschodni został założony w latach 20. XX w. w rejonie osiedla Księża Małe na dwóch wyspach pomiędzy odnogami rzeki Oławy – Dolnej i Górnej. Jego powierzchnia liczy ponad 30 ha. Ze względu na obecność licznych cieków, rozlewisk i terenów podmokłych na terenie parku można spotkać wiele ptaków związanych ze środowiskiem wodnym oraz płazów, np. żabę jeziorkową (*Pelodytes lessonae*) i rzekotkę (*Hyla spp.*). Drzewostan parku to przede wszystkim olchy (*Alnus glutinosa*), dąb (*Quercus robur*), klon polny (*Acer campestre*), jesion wyniosły (*Fraxinus excelsior*) (<https://www.tuwroclaw.com/wiadomosci,odkrywamy-wroclaw-park-wschodni,wia5-3266-12741.html>).

Park Południowy zlokalizowany jest w dzielnicy Krzyki, w południowej części miasta, zajmując powierzchnię 28,5 ha. Figuruje w rejestrze zabytków jako przykład XIX-wiecznej sztuki ogrodowej. Dendroflora charakteryzuje się bogactwem gatunków i odmian drzew parkowych, w tym egzotycznych, jak również rzadkich, takich jak: dwa okazałe cyprysniki błotne (*Taxodium distichum*), orzesznik pięciolistkowy (*Carya opata*), wiekowe platany klonolistne

Rysunek 1. Miejsce poboru próbek do badań.



Źródło: Opracowanie własne

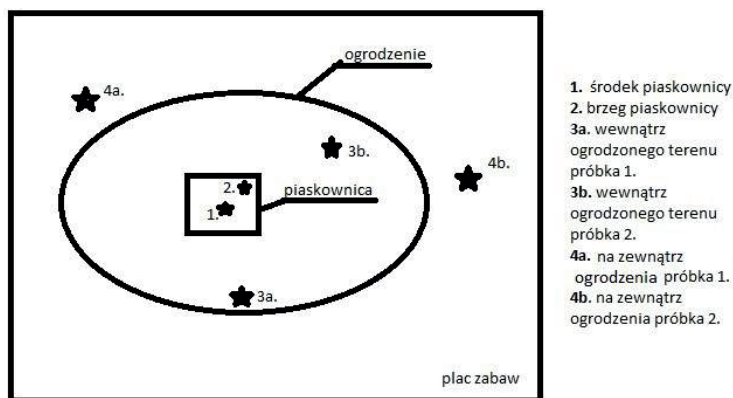
(*Platanus x hispanica*), jak również wiele innych rzadko spotykanych gatunków (<https://visitwroclaw.eu/miejsce/park-poludniowy-wroclaw>).

Park Zachodni znajduje się w rejonie osiedli Kozanów i Popowice, w zachodniej części miasta i zajmuje powierzchnię 72 ha. Przy tworzeniu tego parku w latach 1905-1910 wykorzystano naturalne zalesienie terenu, którego charakter utrzymał się do dziś. Drzewostan parku stanowią brzozy (*Betulaspp.*), dęby (*Quercusspp.*), graby (*Carpinuspp.*), klony (*Acerspp.*), kasztanowce (*Aesculuspp.*) oraz robinie akacjowe (*Robiniapseudoacacia*). Obecność żywotników (*Thujaspp.*), cyprysików (*Chamaecyparis*) i cisów (*Taxusspp.*) przypomina, że park powstał na terenach po zlikwidowanych cmentarzach. W 2011 r. ochroną pomnikową objęto grupę dwóch leszczyn tureckich (*Coryluscolluma*) (<https://www.wroclaw.pl/srodowisko/zielen-miejska>).

Pobór materiału biologicznego

Badania terenowe wykonano 11 grudnia 2019 r. Glebę pobrano ze strategicznych miejsc (w trzech powtórzeniach), tj. z wnętrza piaskownicy, wnętrza ogrodzonego terenu (jeśli takie ogrodzenie występowało) oraz spoza ogrodzonego terenu (lub w przypadku braku ogrodzenia – w dużej odległości od centrum placu zabaw). Próbkę (ok. 0,5-1 kg) pobrane zostały do odpowiednio opisanych, sterylnych woreczków strunowych, a następnie przewieziono do Zakładu Mykologii i Genetyki Uniwersytetu Wrocławskiego, gdzie przetrzymywano je w chłodni (około $10 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) do czasu dalszych analiz.

Rysunek 2. Schemat przykładowego placu zabaw z uwzględnieniem miejsc pobierania próbek gleby.

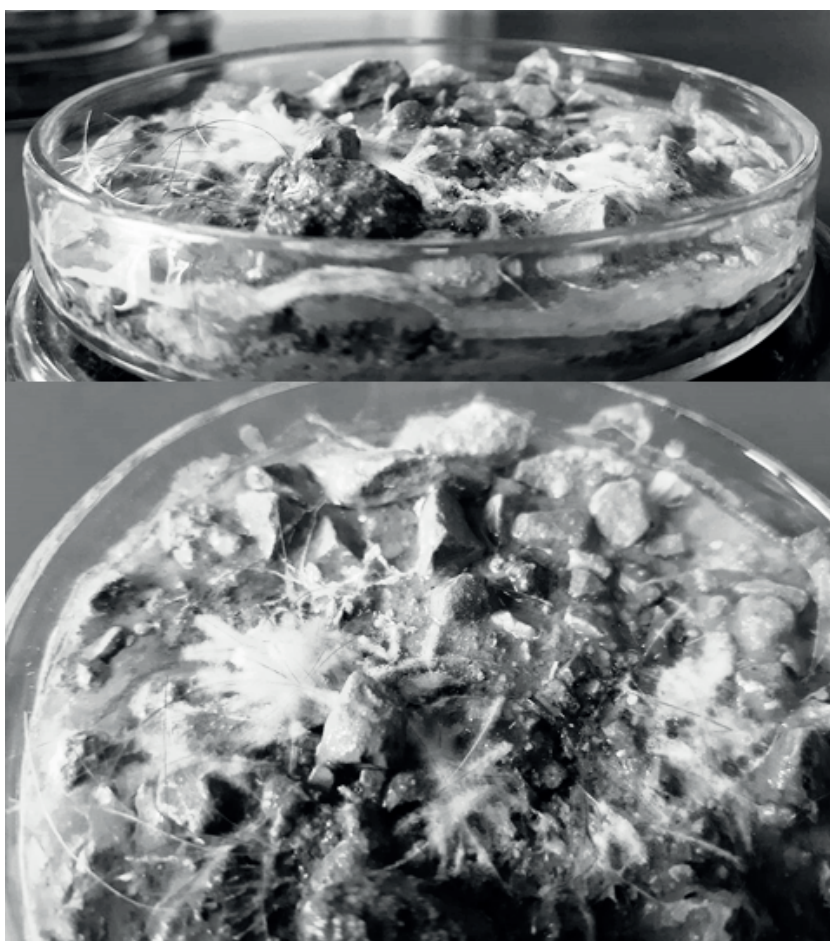


Źródło: Opracowanie własne

Izolacja grzybów keratynofilnych i keratynolitycznych z gleby

Do przeprowadzania badań użyto pułapki włosowej – tzw. pułapki Vanbreuseghema. W tym celu do sterylnych, szklanych szalek Petriego, w warunkach aseptycznych, dodano badane próbki gleby, w których następnie umieszczono sterylne włosy ludzkie za pomocą również sterylnej pęsety. Glebę w tak wykonanych pułapkach zwilżano wodą Milli-Q. Przygotowany w ten sposób materiał inkubowano trzy miesiące w temperaturze pokojowej ($24 \pm 0,5^\circ\text{C}$), stale utrzymując wilgotne środowisko, poprzez systematyczne podlewanie jałową wodą dejonizowaną.

Zdjęcie 1. Przykładowa pułapka włosowa z wyrosłymi strukturami grzybowymi.



Źródło: Opracowanie własne

Po tym czasie kolonie, które wyrosły na włosach przesiano na podłoże Sabourauda (SAB, 1000 ml woda destylowana, 10 g pepton, 40 g glukoza, 15 g agar), które po wyjałowieniu były suplementowane chloramfenikolem (50 mg/l) oraz ampicyliną (50 mg/l). Związki te dodawano w celu zapobiegania kontaminacji próbek przez bakterie środowiskowe. Hodowlę prowadzono przez 14 dni w temperaturze pokojowej ($24 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$).

Identyfikacja uzyskanych kultur grzybowych

Identyfikację czystych kultur grzybowych przeprowadzono w oparciu o obserwacje makro- i mikroskopowe zgodnie z przyjętymi metodami stosowanymi przez laboratoria mykologiczne i opisanymi w monografiach oraz kluczach diagnostycznych (Krzyściak i.in. 2011; Lakshmipathy, Kannabiran 2010; Weitzman, Summerbell 1995).

Obserwacje mikroskopowe wykonano po wybarwianiu preparatów za pomocą laktofenolu z dodatkiem błękitu bawełnianego, LPCB (lactophenolcotton blue, Sigma-Aldrich), używając mikroskopu Zeiss Axio Imager M1.

Wyniki

Z każdego parku uzyskano po 18 próbek, co łącznie z wszystkich czterech wziętych pod uwagę dało 72 powstałe pułapki. Po 3-miesięcznym okresie inkubacji w większości z nich zaobserwowano wzrost charakterystyczny dla grzybów wykorzystujących substraty keratynowe. Takie próbki przesiewano na podłoże SAB z antybiotykami, celem uzyskania czystych kultur niezbędnych do dalszych analiz. Pułapki glebowe, w których wzrostu nie zaobserwowano na powierzchni włosów, poddawano dalszej inkubacji.

Analiza próbek w oparciu o ich makro- i mikromorfologię pozwoliła na ich wstępne zaklasyfikowanie do rodzaju. Uzyskano 25 izolatów branych

Tabela 1. Liczba uzyskanych poszczególnych izolatów.

NAZWA KULTURY GRZYBOWEJ	LICZBA IZOLATÓW
<i>Arthroderma sp.</i>	5
<i>Fusarium sp.</i>	2
<i>Lecanillum sp.</i>	3
<i>Mortiella sp.</i>	4
<i>Trichophyton sp.</i>	11

Źródło: Opracowanie własne

pod uwagę w dalszych analizach. Większość z nich (11) należała do rodzaju *Trichophyton*. Potwierdza to obecność grzybów wykorzystujących substraty bogate w keratynę w pobranych próbkach gleby. W nieco mniejszych ilościach wyizolowano także kolonie, które wstępnie zaklasyfikowano do rodzajów: *Lecanicillium*, *Arthroderma*, *Mortierella* oraz *Fusarium*. Duża liczba próbek uległa kontaminacji przez grzyby pleśniowe, co uniemożliwiło dalszą diagnostykę pożądaných kultur.

Wyniki, pomimo wstępnego charakteru, nakreślają problem, jakim jest występowanie potencjalnych patogenów w otoczeniu dzieci i potwierdzają słuszność kontynuacji prowadzonych badań.

Dyskusja

Obecność grzybów keratynofilnych oraz keratynolitycznych, w tym dermatofitów, i ich rozmieszczenie w środowisku zależy między innymi od obecności ludzi i zwierząt (Khanam, Jain 2002). Miejsca takie jak parki publiczne i place zabaw często są odwiedzane przez lokalne społeczeństwo, dlatego gleby w tych miejscach bogate są w substraty keratynowe. Sprawia to, że stanowią one idealne nisze ekologiczne dla rozwoju grzybów keratynofilnych oraz keratynolitycznych. Grzyby te mogą być zarówno saprotrofami (przyczyniać się do rozkładu martwej materii organicznej) jak i patogenami powodującymi infekcje ludzi i zwierząt (Ali-Shtayeh i Arda 1989). Skład mykobioty gleby różni się w zależności od miejsca izolacji. Rodzaj oraz gatunek wyizolowanego grzyba keratynofilnego czy keratynolitycznego będzie więc odmienny dla gleby pochodzącej nie tylko z różnych krajów, ale także innych miast w obrębie tego samego państwa. Związane jest to z odmiennymi warunkami klimatycznymi danego miejsca (różnice dotyczące temperatury czy wilgotności powietrza), ale również z odmienną fauną i florą danego regionu (Ali-Shtayeh, Jamous 2000).

W naszych badaniach najwięcej wyizolowanych gatunków (11) należało do rodzaju *Trichophyton*. Z danych literaturowych wynika, że grzyby należące do tego rodzaju nie występują licznie w glebie. Zdecydowanie częściej spotykane są grzyby keratynofilne należące do rodzaju *Chrysosporium*. Natomiast jeśli chodzi o dermatofity to nieco częściej w glebie spotykane są gatunki z rodzaju *Microsporium* (Ali-Shtayeh i Arda 1989, Rizwana i in. 2012). Grzyby z rodzaju *Arthroderma* również są szeroko rozpowszechnione w środowisku. W sprzyjających warunkach mogą stanowić one najczęściej izolowany rodzaj dermatofitów, takie zjawisko zaobserwowano w badaniach placów szkolnych w Palestynie (Ali-Shtayeh i Arda 1989). W naszym przypadku *Arthroderma* była drugim najbardziej licznie izolowanym dermatofitem. Wśród uzyskanych izolatów

stwierdzono także rodzaje grzybów wykazujących właściwości keratynofilne, mianowicie: *Lecanicillum*, *Mortierella* oraz *Fusarium*.

Ze względu na fakt, że grzyby występujące w glebie mogą być bezpośrednim zagrożeniem dla ludzi i zwierząt, badania polegające na wyizolowaniu i zbadaniu mykobioty odpowiedzialnej za wywoływanie chorób są dosyć powszechnie wykonywane. Rizwana i wsp. w swoich badaniach przeanalizowali glebę z różnych miejsc Rijadu, w Arabii Saudyjskiej. Łącznie przebadano 80 próbek z ogrodów, parków oraz placów zabaw, na obecność dermatofitów i grzybów keratynofilnych. W przeciwieństwie do naszych badań, tutaj wykazano, że najczęściej izolowany grzyb należał do rodzaju *Chrysosporium*, podczas gdy najczęściej izolowanym dermatofitem był *Microsporum gypseum*. W badaniach tych, podobnie jak w naszych, wyizolowano również gatunki należące do rodzaju *Trichophyton* oraz *Fusarium*, a także zaobserwowano wzrost mieszany w niektórych próbkach (Rizwana i in. 2012). Podobne wyniki do badań przeprowadzonych w Arabii Saudyjskiej uzyskano podczas analizy próbek gleby pobranej w Tunezji. Dominującym tu gatunkiem był grzyb z rodzaju *Chrysosporium*, natomiast najczęściej izolowanym dermatofitem był *Microsporum gypseum*. Duże podobieństwo mykobioty wyizolowanej z obu krajów może wynikać z podobnego klimatu panującego w tych miejscach (Distribution of keratinophilic fungi in soil across Tunisia: a descriptive study and review of the literature 2015).

Stwierdzono, że występowanie grzybów keratynofilnych jest uzależnione od występowania materii organicznej w glebie. Im więcej substancji w glebie występuje, tym większa ilość grzybów ją zasiedla (The influence of some ecological factors on keratinophilic fungi in the soil 1972). W Palestynie badano rozmieszczenie grzybów keratynofilnych w glebie 57 placów szkolnych na terenie Nablusu. Zaobserwowano różnice w ilości oraz składzie gatunkowym grzybów występujących na placach szkolnych, na których bawiły się tylko dziewczynki od tych, na których bawili się głównie chłopcy. Większą ilość izolatów otrzymano w miejscach, w których bawiły się dziewczynki. Gleba ta zawierała procentowo więcej materii organicznej, niż gleba w miejscach, w których bawili się głównie chłopcy, co może stanowić przyczynę uzyskania większej ilości kultur grzybowych (Ali-Shtayeh, Arda 1989).

Podsumowanie

Można stwierdzić, iż grzyby keratynofilne i keratynolityczne powszechnie występują w glebie. Stanowią realne zagrożenie dla zdrowia zarówno zwierząt jak i ludzi, a w szczególności dzieci.

Uzyskana ilość izolatów nie była wystarczająca, aby na tym etapie badań zweryfikować wszystkie założenia. Przedstawione w niniejszej pracy wyniki wstępnie nakreślają problem, ale nie mogą być wykorzystane w bardziej zaawansowanych analizach statystycznych. Prowadzone badania są czasochłonne, a dermatofity należą do grzybów trudnych w hodowli w warunkach laboratoryjnych ze względu na możliwą kontaminację próbek grzybami pleśniowymi.

Literatura:

- Ali-Shtayah M. S, Arda H. 1989. Isolation of keratinophilic fungi from floor dust in Arab elementary and preparatory schools in the West Bank of Jordan. *Mycopathologia*, 106(1): 5-11.
- Ali-Shtayah M. S, Jamous R. M. 2000. Keratinophilic fungi and related dermatophytes in polluted soil and water habitats. *Rev. Iberoam. Micol.*, 17: 51-59.
- Anane S., Al-Yasiri M., Normand A., Ranque S. 2015. Distribution of keratinophilic fungi in soil across Tunisia: a descriptive study and review of the literature. *Mycopathologia*, 180(1-2): 61-68.
- Chmel L., Hasilíková A., Hrasco J., Vláciííková A. 1972. The influence of some ecological factors on keratinophilic fungi in the soil. *Sabouraudia*, 10(1): 26-34.
- De Hoog S. G., Dukik K., Monod M., Packeu A., Stubbe D., Hendrickx M., Kupsch C., Stielow J. B., Freeke J., Göker M., Rezaei-Matehkolaei A., Mirhendi H., Gräser Y. 2016. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*, 182: 5-31.
- Dworecka-Kaszak B., Dąbrowska I. 2017. Dermatofity – nowa taksonomia i współczesne metody różnicowania. Przegląd aktualnego stanu wiedzy o mechanizmach patogenezы i interakcjach patogen–gospodarz. *Med. Weter.*, 73(10): 613-617.
- Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Dyląg M. 2019. Tinea corporis caused by *Trichophyton equinum* transmitted from asymptomatic dogs to two siblings. *Braz. J. Microbiol.*, DOI:10.1007/s42770-019-00204-0.
- Gnat S., Łagowski D., Nowakiewicz A., Dyląg M. 2020. Unusual dermatomycoses caused by *Nannizzia nana*: the geophilic origin of human infections. *Infection*, 48(3): 429-434.
- Hainer B. I. 2003. Dermatophyte Infections. *Am. Fam. Physician*, 67(1): 101-108.
- Khanam S., Jain P. 2002. Isolation of keratin degrading fungi from soil of Damoh, India. *Asian J. Microbiol. Biotechnol. Environ. Sci.*, 4: 251-254.
- Krzyściak P., Skóra M., Macura A. B. 2011. Atlas grzybów chorobotwórczych człowieka. Medharm Polska, Wrocław.

- Lakshmipathy D. T., Kannabiran K. 2010. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. *NS.*, 2(7): 726-731.
- Mishra N., Rastogi M. K., Gahalaut P., Yadav S., Srivastava N., Aggarwal A. 2018. Clinicomycological study of dermatophytoses in children: Presenting at a tertiary care center. *Indian J. Paediatr. Dermatol.*, 19: 326-330.
- Parki i ogrody. <http://www.parki.org.pl/parki-miejskie/park-szczytnicki-we-wroclawiu> (dostęp 20.03.2020).
- Rizwana H., Al Hazzani A. A., Siddiqui I. 2012. Prevalence of dermatophytes and other keratinophilic fungi from soils of public parks and playgrounds of Riyadh, Saudi Arabia. *J. Anim. Plant. Sci.*, 22(4): 948-953.
- Sharma V., Kumawat T. K., Sharma A., Seth R., Chandra S. 2015. Dermatophytes: Diagnosis of dermatophytosis and its treatment. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 9(19): 1286-1293.
- Staroń P., Banach M., Kowalski Z. 2011. Keratyna – źródła, właściwości, zastosowanie. *CHEMIK*, 65(10): 1019-1026.
- Trzmiel D., Lis-Święty A., Bergler-Czop B. 2011. Klinika zakażeń grzybiczych skóry i jej przydatków w praktyce lekarza rodzinnego – problem ciągle aktualny. *Med. Og. Nauk. Zdr.*, 17(4): 212-217.
- TuWrocław.com. <https://www.tuwroclaw.com/wiadomosci,odkrywamy-wroclaw-park-wschodni,wia5-3266-12741.html> (dostęp 20.03.2020).
- Ulfig K. 2003. Czynniki wpływające na występowanie grzybów keratynolitycznych i keratynofilnych w osadach ściekowych. *Zeszyty Naukowe. Rozprawy Naukowe / Politechnika Łódzka*, 328: 3-143.
- VisitWrocław.eu. <https://visitwroclaw.eu/miejsce/park-poludniowy-wroclaw> (dostęp 20.03.2020).
- Weitzman I., Summerbell R. 1995. The Dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8(2): 240-259.
- Wrocław Miasto Spotkań. <https://www.wroclaw.pl/srodowisko/zielen-miejska> (dostęp 20.03.2020).

ABSTRACT

KERATINOPHILIC AND KERATINOLYTIC FUNGI INHABITING PLAYGROUNDS IN SELECTED PARKS OF WROCLAW

The soil is an excellent habitat for fungi with keratinophilic and keratinolytic properties. These fungi can attack keratinized structures such as epidermis, hair and nails. Dermatophytes are classified within the genera *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*,

Arthroderma, Nannizzia, Lophophyton, and Paraphyton, which so far has more than 50 species, which are concentrated in numerous pathogenic species for humans and animals. Dermatomycoses are particularly dangerous for children. They have a different clinical picture and require detailed differential diagnosis. In this research, samples were taken from sandboxes, located in one of the largest parks in Wrocław. Trials were taken from strategic locations in the playground area to determine whether the possible presence of a fence reduces the number and variety of the above mentioned fences of microorganisms. A Vanbreuseghem's hair bait method was used for the tests. Samples were incubated at room temperature for two months. Then the mycelium grown on the hair where graft on, into Sabouraud culture medium with the addition of antibiotics. On the basis of the obtained results 97 isolates of keratinophilic and keratinolytic fungi were found in the tested samples.

Słowa kluczowe: grzyby keratynolityczne, grzyby keratynofilne, place zabaw

Keywords: keratinolytic fungi, keratinophilic fungi, playgrounds

Dane do kontaktu z autorem:

klaudia.kurczaba97@wp.pl

Klaudia Kurczaba, Weronika Salwińska, Maria Szmidt

Uniwersytet Wrocławski

Studenckie Koło Naukowe Mykologów „Mykobiota”

Opiekun: dr Mariusz Dyląg, dr inż. Rafał Ogórek

WYNIKI WSTĘPNYCH BADAŃ NAD GRZYBAMI MIKROSKOPIJNYMI ZASIEDLAJĄCYMI BŁONY LOTNE NIETOPERZY WYLATUJĄCYCH Z PODZIEMNEGO ZIMOWISKA

Wstęp

Grzyby mikroskopijne (*micromycetes*) to drobnoustroje o rozmiarach tak małych, że pozostają niewidoczne dla „nieuzbrojonego” oka ludzkiego. Pomimo tego stanowią one znaczącą składową królestwa grzybów i obejmują wiele jednostek taksonomicznych. Są one szeroko rozpowszechnione w środowisku i mogą zajmować zróżnicowane nisze ekologiczne. Mikroorganizmy te stanowią istotny komponent biocenozy kuli ziemskiej. Mogą występować w formie jednokomórkowej (tzw. drożdże), mycelialnej (grzyby strzępkowe) i w formie grzybów drożdżoidalnych, jako jednokomórkowe lub strzępkowe w zależności od warunków środowiskowych (Murray i in. 2012).

Drobnoustroje te mają ogromne znaczenie w medycynie, rolnictwie i leśnictwie. W kolonizacji kuli ziemskiej dorównują one bowiem bakteriom i niewiele miejsc pozostaje dla nich niedostępnych. Ich niszą ekologiczną mogą być ekosystemy wodne oraz lądowe. Wiele z nich za miejsce bytowania wybiera skórę ssaków. W porównaniu do grzybów makroskopowych (*makromycetes*), grzyby mikroskopijne wykazują większe zróżnicowanie w kontekście biologicznym jak i ekologicznym. Przedstawiciele tej zróżnicowanej grupy heterotroficznych organizmów to często saprobionty – żyjące na martwej materii organicznej i przyczyniające się do jej rozkładu (Mułenko i in. 2008). Mogą one wchodzić w relacje z innymi organizmami od mutualizmu, przez komensalizm po pasożytnictwo (Murray i in. 2012). Te ostatnie zwracają na siebie szczególną uwagę naukowców, ponieważ często atakują człowieka i powodują schorzenia zwane grzybicami. Oprócz tego

należą do istotnej grupy alergenów. Mikroorganizmy te mogą również atakować zwierzęta hodowlane oraz domowe (Piecková, Jesenská 1999).

Nie tylko królestwo zwierząt jest celem ataku pasożytniczych grzybów mikroskopijnych. W rolnictwie oraz leśnictwie mogą przyczyniać się do dużych strat ilościowych oraz jakościowych plonu, wywołując u roślin często trudne do zwalczenia i szybko rozprzestrzeniające się choroby (Błaszowski i in. 1999).

Ze względu na swoją specyfikę i notowany w ostatnich czasach wzrost występowania wszelkiego rodzaju grzybic (ludzi, roślin, zwierząt) powodowanych przez *micromycetes* stają się one istotnym przedmiotem badań w dziedzinie mykologii (Lorch i in. 2013).

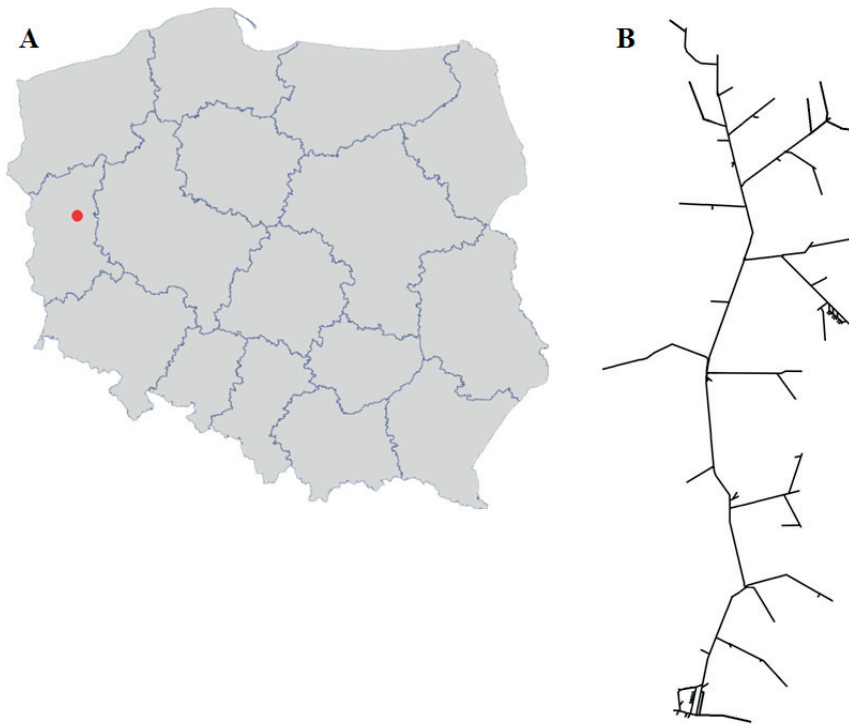
Według najnowszych doniesień naukowych, istnieje pozytywna korelacja między liczebnością nietoperzy a grzybów mikroskopijnych w ekosystemach podziemnych, czyli najczęstszych miejsc hibernacji tych ssaków (Vanderwolf i in. 2013; Kokurewicz i in. 2016). Warto więc zauważyć, że te pożyteczne ssaki mogą być narażone także na niekorzystne oddziaływanie grzybów. Jednym z przykładów zagrożenia jest *Pseudogymnoascus destructans*, psychrofilny grzyb strzępkowy, powodujący syndrom białego nosa (z ang. *white-nose syndrome*), czyli jedną z najbardziej śmiertelnych chorób dzikiej fauny. Choroba została odkryta w roku 2006 i od tego czasu zdążyła zabić ponad 5 milionów nietoperzy w Ameryce Północnej. Grzyb ten, poza Ameryką Północną, jest szeroko rozpowszechniony także w Europie, jak i w paru regionach Azji. Na uwagę zasługuje jednak fakt, że nie powoduje on masowej śmiertelności u europejskich i azjatyckich nietoperzy (Thapa i in. 2016). Zatem syndrom białego nosa pokazał sporą lukę w naszej wiedzy na temat relacji między nietoperzami a ich patogenicznymi grzybami (Lorch i in. 2013). Skłoniło to społeczność naukową do podjęcia badań, które by tę lukę wypełniły.

Należy podkreślić, że nietoperze to jedyne ssaki zdolne do aktywnego lotu. Są organizmami kosmopolitycznymi. Możemy je podzielić na dwa odmienne podrzędy: roślinożerne *Macrochiroptera* oraz mięsożerne, żywiące się rybami, krwią ssaków oraz owadami – *Microchiroptera*. Wszystkie nietoperze występujące w Polsce są pożyteczne i stanowią gatunki objęte ochroną (Kowalski i in. 1996). Mogą one stanowić wektor dla wielu grzybów mikroskopowych, przyczyniając się tym samym do wzrostu ich liczebności w podziemnych ekosystemach (Vanderwolf i in. 2013).

Cel badań

Celem badań była ocena bioróżnorodności hodowlanych grzybów mikroskopijnych (*micromycetes*) zasiedlających błony lotne nietoperzy wylatujących z zimowiska po okresie hibernacji, na podstawie cech morfologicznych.

Rysunek 1. Lokalizacja Międzyrzeckiego Rejonu Umocnionego na terenie Polski (A) oraz schemat tuneli podziemnego kompleksu (B).



Źródło: Opracowanie własne

Material i metody

Opis miejsca badań

Rezerwat przyrody „Nietoperek” znajduje się na zachodzie Polski. Stanowi on część Międzyrzeckiego Rejonu Umocnionego i został zbudowany w latach 1934-1944 przez Niemców. Ten podziemny obiekt tworzą korytarze o łącznej długości ponad 30 kilometrów. Rezerwat ten wpisany jest do programu Natura 2000. Stanowi największe zimowisko nietoperzy w Polsce, natomiast w Unii Europejskiej plasuje się na miejscu ósmym. Co roku gromadzi 12 różnych gatunków nietoperzy, w ilości ponad 38 tysięcy osobników (Woźniak 1996; Kokurewicz i in. 2016). Do najczęściej występujących na terenie rezerwatu gatunków jest zaliczany: nocek duży (*Myotis myotis*), nocek rudy (*Myotis daubentoni*), nocek Natterera (*Myotis nattereri*), mopek zachodni (*Barbastella barbastellus*) oraz gacek wielkouchy (*Plecotus auritus*) (Kokurewicz i in.. 2016).

Pobór materiału biologicznego

Badania terenowe wykonano 8 i 10 kwietnia 2016 r. Odłowu nietoperzy dokonał dr Tomasz Kokurewicz z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W celu pobrania materiału biologicznego z błon lotnych nietoperzy użyto sterylnych wymazówek w probówce (plastikowy aplikator z wacikiem wiskozowym o długości 15 cm), zwilżonych solą fizjologiczną (0,85% NaCl). Z każdego z nietoperzy pobrano dwa wymazy, po jednym na każdą z błon lotnych. Następnie próbki zostały przetransportowane do laboratorium, gdzie przechowywane były w chłodni (około $10 \pm 0,5^\circ\text{C}$), aż do analizy mykologicznej, która przeprowadzona została w ciągu 4 dni.

Analiza mykologiczna wymazów

Każda wymazówka z materiałem biologicznym została umieszczona w warunkach aseptycznych w 50-mililitrowej kolbie Erlenmeyera z 10 ml sterylnej wody destylowanej. Tak przygotowane próby były umieszczane na wytrząsarce orbitalnej i wytrząsane przez 15 minut. Następnie, przy użyciu techniki seryjnych rozcieńczeń, próbki były umieszczane w warunkach aseptycznych w plastikowych szalkach Petriego o średnicy 90 mm zawierających zestalone podłoże PDA (z ang. *Potato Dextrose Agar*, agar glukozowo-ziemniaczany, Biocorp). Inkubację szalek prowadzono w 7, 25 i $37 \pm 0,2^\circ\text{C}$, odpowiednio przez 56, 21 i 5 dni. Następnie, pojedyncze kolonie były przenoszone na szalki z podłożem PDA w celu uzyskania czystych kultur z użyciem techniki jednozarnikowej. Metoda ta polega na przeniesieniu igłą preparacyjną możliwie jak najmniejszego fragmentu struktury grzybowej, naniesieniu jej na kroplę sterylnej wody w centrum pożywki. Kroplę taką, kolistymi ruchami szalki z pożywką, rozprowadzaliśmy po całej powierzchni, a następnie za pomocą igły pobieraliśmy jeden zarodnik i wprowadzaliśmy go do czystego podłoża (Błaszowski i in. 2010). Fenotyp czystych kultur był porównywany w celu zredukowania grzybów o tym samym fenotypie do jednego reprezentanta grupy. Tak uzyskane kultury przechowywano na skosach z podłożem PDA i wykorzystano do dalszych badań związanych z identyfikacją gatunkową.

Wstępna identyfikacja izolowanych grzybów została oparta na ocenie makro- i mikroskopowej na następujących podłożach: CYA (*Czapek Autolysate Agar*, 30,0 g L⁻¹ sacharoza, 15 g L⁻¹ agar, 5,0 g L⁻¹ ekstrakt drożdżowy, 3,0 g L⁻¹ NaNO₃, 1,0 g L⁻¹ K₂HPO₄, 0,5 g L⁻¹ KCl, 0,5 g L⁻¹ MgSO₄ 7H₂O, 0,01 g L⁻¹ FeSO₄ 7H₂O), agar Czapek-Dox (1,2% agar, BioMaxima), MEA (z ang. *Malt Extract Agar*, agar z ekstraktu słodowego, BioMaxima) i PDA. Płytki inkubowano w ciemności w 15 i $20 \pm 1,0^\circ\text{C}$ przez 7-42 dni. Grzyby zidentyfikowano

zgodnie z dostępnymi monografiami (Kuehn, Orr 1964; Bensch i in. 2012; Seifert i in. 2014; Wiederhold, Guarro 2016; Stielow i in. 2017; Tsuji i in. 2017). Dodatkowo fenotypy niektórych grzybów zostały również porównane ze szczepami z kolekcji Zakładu Mykologii i Genetyki, Instytut Genetyki i Mikrobiologii Uniwersytetu Wrocławskiego), które zostały zidentyfikowane za pomocą badań fenotypowych i molekularnych oraz ich sekwencji ITS przez National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda, Rockville, MD, USA).

Wyniki

Analiza uzyskanych wyników wykazała, że grzyby mikroskopijne zasiedlające błony lotne nietoperzy cechuje duża różnorodność gatunkowa. Wykazano również różnice w składzie mykobioty w zależności od gatunku nietoperza, czyli błony lotne różnych gatunków nietoperzy były zasiedlane przez grzyby należące do różnych rodzajów. Odnotowano także, że rodzaj *Aspergillus* kolonizuje każdy z pięciu badanych gatunków nietoperzy, stanowiąc tym samym najpowszechniejszy składnik ich mykobioty błon lotnych. Każde przebadane zwierzę skolonizowane było przez przedstawicieli należących do przynajmniej trzech różnych rodzajów grzybów mikroskopijnych. Temperatura inkubacji materiału biologicznego w szalkach Petriego wywierała wpływ na skład mykobioty wyizolowanej z błon lotnych badanych nietoperzy. Najmniej kultur wyhodowano w $36 \pm 1^\circ\text{C}$, natomiast najwięcej w $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Całość uzyskanych wyników zawarta została w tabeli 1, która przedstawia nazwy konkretnych kultur grzybowych, jakie wyizolowano z każdego przebadanego gatunku nietoperza.

Dyskusja

W literaturze przedmiotu istnieją wzmianki o badaniach mykobioty zasiedlającej nietoperze. Jedno z takich badań przeprowadzono w roku 2016 w jaskiniach Nowego Brunswiku w Kanadzie, gdzie badano grzyby związane z hibernującymi nietoperzami. Wymazy pobierane były z ciał nietoperzy, ścian jaskiń i stawonogów. Dzięki molekularnym metodom identyfikacji ustalono, że wyizolowane kultury należą do dwóch gatunków: *Leuconeurospora capsici* oraz *L. polypaeciloides*. Te same dwa gatunki wyizolowano ze ścian jaskini, w której nietoperze zimowały oraz z bytujących tam stawonogów (Malloch i in. 2016). W naszych badaniach nie stwierdziliśmy na błonach lotnych nietoperzy obecności grzybów należących do rodzaju *Leuconeurospora*.

Przeprowadzono także badania w 2014 roku na temat grzybów zasiedlających jaskinie znajdujące się na wyspie Anticosto należącej do kanadyjskiej prowincji

Tabela 1. Grzyby mikroskopijne uzyskane z błon lotnych badanych gatunków nietoperzy. Symbolem „x” zaznaczono kulturę grzybową, którą wyizolowano z danego gatunku nietoperza.

Nazwa kultury grzybowej	Gatunek nietoperza				
	<i>Myotis bechsteinii</i> ♀	<i>Myotis daubentonii</i> ♂	<i>Myotis dasycneme</i> ♀	<i>Plecotus auritus</i> ♀	<i>Myotis myotis</i> ♂
<i>Arachnoidus</i> sp.			x ¹	x ¹	
<i>Trichophyton terrestre</i>	x ¹			x ¹	
<i>Aspergillus</i> sp. sekcja <i>Fumigati</i>	x ³	x ²	x ³	x ³	x ³
<i>Aspergillus</i> sp. sekcja <i>Versicolores</i>	x ²				x ²
<i>Cladosporium sphaerospermum</i> sp. Kompleks					x ²
<i>Cystobasidium</i> sp.		x ¹			x ^{1,2}
<i>Penicillium</i> sp. 1 sekcja <i>Penicillium</i> & <i>Fasciculata</i>			x ²		
<i>Penicillium</i> sp. 2 sekcja <i>Penicillium</i> & <i>Fasciculata</i>			x ¹		
<i>Penicillium</i> sp. sekcja <i>Chrysogena</i>	x ¹		x ²		x ²
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>		x ^{2,3}	x ^{2,3}		

¹ grzyby wyhodowane w 8 ± 1°C, ² grzyby wyhodowane w 24± 1°C, ³ grzyby wyhodowane w 36 ± 1°C

Źródło: Opracowanie własne

Quebec. W sumie analizowano 3 jaskinie, a jedna z nich, Grotte a` la Patate może być zasiedlana zimą przez nietoperze. Za pomocą oceny morfologicznej oraz identyfikacji molekularnej zidentyfikowano wiele gatunków grzybów. Większość z nich należała do rodzajów takich jak *Penicillium*, *Pseudogymnoascus*, *Trichoderma*, *Cladosporium*, *Thysanophora*, *Mucor* oraz *Trichosporon*. Podobnie jak w naszych badaniach, nie wykazano obecności *P. destructans* odpowiedzialnego za syndrom białego nosa (Vanderwolf i in. 2016).

Zbadano także skład mykrobioty skóry dziewięciu różnych nietoperzy w kierunku obecności grzybów z rodzaju *Malassezia*. Badania pokazały, że uzyskane

izolaty są jedynie w 92% podobne do gatunków z rodzaju *Malassezia*. Badania molekularne pozwoliły stwierdzić, iż wszystkie te izolaty prawdopodobnie reprezentowały pojedynczy gatunek różniący się od innych stwierdzonych taksonów. Na szczególną uwagę zasługuje jego zdolność do wzrostu w szerokim zakresie temperatur: od 7 do 40°C, z optymalną temperaturą 24°C. Są to unikalne zakresy wśród opisanych *Malassezia* i mogą stanowić adaptację grzyba do zasiedlania nietoperzy zarówno podczas okresu ich hibernacji, jak i poza nim (Blehert 2018). W naszych badaniach nie stwierdzono grzybów z rodzaju *Malassezia*, gdyż grzyb z tego rodzaju jest trudny do hodowli *in vitro* ze względu na konieczność obecności długołańcuchowych kwasów tłuszczowych w podłożu. Dlatego do ich hodowli używa się specjalnych podłoży agarowych, wzbogacanych żółcią bydlęcą oraz oksyetylenowanymi estrami sorbitolu i kwasów tłuszczowych (Charakterystyka grzybów z rodzaju *Malassezia*. I Aspekty mikrobiologiczne i immunologiczne. 2013).

Obecnie istnieje wiele doniesień na temat związku grzybów mikroskopowych z nietoperzami (Malloch i in. 2016; Bats increase the number of cultivable airborne fungi in the „Nietoperek” bat reserve in Western Poland. 2016; Vanderwolf i in. 2016; Blehert 2018). Niemniej jednak nie badano do tej pory zagadnienia przedstawionego w tej pracy, czyli składu mykobioty błon lotnych nietoperzy wylatujących z zimowiska. Do najczęściej izolowanych należały m.in. grzyby z rodzaju *Penicillium* (30%), które głównie odpowiadają za rozkład organicznych podłoży, takich jak owoce, skórzane i drewniane wyroby oraz wiele innych. Mają też swoje wykorzystanie w przemyśle, m.in. *Penicillium roqueforti* oraz *P. camemberti* stosowane są przy wyrobie serów pleśniowych, a z *P. chrysogenum* uzyskuje się penicylinę. *P. citreonigrum* znany jest z zdolności do wytwarzania cytreowirydyny. Toksyna ta stanowi zagrożenie dla ludzi, powodując tzw. „chorobę żółtego ryżu”, której objawy przypominają niedobory witaminy B1 (Wagner da Rocha i in. 2014). Brakuje jednak doniesień o szkodliwym wpływie cytreowirydyny na organizmy zasiedlające podziemne ekosystemy. Należy podkreślić, że wiele gatunków grzybów z tego rodzaju było już wcześniej izolowanych ze skóry i futra nietoperzy (Vanderwolf i in. 2016). *P. coprophilum* jest z kolei przykładem grzyba, którego wyizolowano z nor oraz futer małych ssaków leśnych (Shubina i in. 2013), nigdy jednak nie wykazano żadnego więcj związku z ssakami zasiedlającymi podziemne ekosystemy.

Inne najliczniej uzyskane izolaty grzybowe należały do rodzaju *Aspergillus* (20%). Grzyby z tego rodzaju powodować mogą aspergilozę, czyli inwazyjną chorobę grzybiczą, która najczęściej atakuje płuca. Zajmuje naczynia tworząc zakrzepy i zmiany martwicze, czym może doprowadzić nawet do zawału.

Oprócz infekcji płuc mogą zdarzyć się też zakażenia nerek, skóry, gałki ocznej, zatok, kości, szpiku czy wsierdzia. Gatunki, które w głównej mierze odpowiadają za te choroby, to: *A. fumigatus* (ok. 90% przypadków), *A. flavus*, *A. lentulus*, *A. niger*, *A. nidulans*, *A. terreus* (Dzierżanowska i in. 2015). Podczas badań nad agroekonomicznymi grzybami mającymi związek z nietoperzami owocożernymi występującymi na Filipinach rodzaj *Aspergillus* był najczęściej izolowany. Pobierając wymazy z różnych okolic ciała czterech gatunków nietoperzy, udało się wykazać obecność 18 gatunków należących do tego rodzaju. Jednakże nie wspomina się o objawach, które mogłyby sugerować negatywny wpływ na ogólny stan zdrowia badanych zwierząt (Jumao-as i in. 2017).

Grzyby z rodzaju *Arachnietus* również zostały wyizolowane z skrzydeł podziemnych ssaków. Jak donosi literatura, wykorzystywane są one w przemyśle, między innymi jako źródło do pozyskiwania białka (Yasin i in. 2019). Obecność grzybów z tego rodzaju wykazano także na martwych nietoperzach (Vanderwolf i in. 2016). Brakuje jednak wzmianek na temat związku powyższych grzybów z żywymi osobnikami.

Pod koniec 2018 roku opublikowano wyniki badań nad owadem *Ericerus pela*, który wykorzystywany jest przy produkcji wosku. W południowych Chinach samice tego owada zabijane były przez infekcję grzybiczą. Przy pomocy metod molekularnych udało się wykryć dwa gatunki odpowiedzialne za tę chorobę i masowe wymieranie owadów. Wyizolowanymi grzybami były *Cladosporium langeronii* oraz obecny na błonach lotnych nietoperzy *C. sphaerospermum* (Sun i in. 2018). Oprócz tego grzyby z rodzaju *Cladosporium* izolowane były z martwych nietoperzy (Vanderwolf i in. 2016). Brakuje jednak informacji o negatywnym wpływie obecności *Cladosporium* na tych zwierzętach.

Kolejne uzyskane w badaniach własnych izolaty grzybowe należały do rodzaju *Trichophyton*. W obrębie tego rodzaju występują grzyby odpowiedzialne za wywoływanie dermatoz ludzi i zwierząt. (Nenoff i in. 2014). Większość zakażeń jest powodowana przez *Trichophyton rubrum* i *Trichophyton mentagrophytes complex* (Singh i in. 2018). Grzybnice powierzchniowe wywołane przez *Trichophyton rubrum* należą do najczęstszych zakażeń na świecie. Infekcje te są trudne do leczenia i często związane są z nawrotami po przerwaniu terapii przeciwgrzybiczej. (Ghelardi i in. 2014).

Podsumowanie

Niniejsze badania pokazały, że gatunki nietoperzy występujące w Polsce mogą być wektorami hodowlanych grzybów mikroskopijnych. Błony lotne tych małych ssaków były skolonizowane przez kilkanaście kultur grzybowych,

w tym również przez te potencjalnie patogenne. Grzyby z rodzaju *Aspergillus* najliczniej występowały podczas badań. Ponadto wykazano, że zastosowanie różnych temperatur inkubacji podczas hodowli pozwala na uzyskanie szerokiego spektrum gatunkowego.

Podziękowania

Składamy serdeczne podziękowania dla dr. Tomasza Kokurewicza z Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za dostarczenie materiału biologicznego do badań.

Literatura:

- Bensch K., Braun U., Groenewald J. Z., Crous P. W. 2012. The genus *Cladosporium*. *Stud. Mycol.*, 72: 1-401.
- Błaszczkowski J., Adamska I., Czerniawska B., Madej T., Ziolo E. 2010. Przewodnik do zajęć z fitopatologii. Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Szczecin.
- Błaszczkowski J., Tadych M., Madej T. 1999. Przewodnik do ćwiczeń z fitopatologii. Wyd. AR, Szczecin.
- de Hoog G. S., Dukik K., Monod M., Packeu A., Stubbe D., Hendrickx M., Kupsch C., Stielow J. B., Freeke J., Göker M. 2017. Toward a novel multilocus phylogenetic taxonomy for the dermatophytes. *Mycopathologia*, 182: 5-31.
- Dzierżanowska D., Gil L., Jakubas E., Kyrzcz- Krzemień S., Styczyński J. 2015. Epidemiologia i diagnostyka mikrobiologiczna inwazyjnej choroby grzybiczej. *Post. Nauk Med.*, 6: 403-409.
- Ghelardi E., Celandroni F., Gueye S. A., Salvetti S., Senesi S., Bulgheroni A., Mailland F. 2014. Potential of Ergosterol synthesis inhibitors to cause resistance or cross-resistance in *Trichophyton rubrum*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 58(5): 2825-2829.
- Jagielski T., Rup E., Macura Anna B., Bielecki J. 2013. Charakterystyka grzybów z rodzaju *Malassezia* I. Aspekty mikrobiologiczne i immunologiczne. *Post. Mikrobiol.*, 52(3): 295-305.
- Jumao-as C., Cabasan M. T. N., Manceras L. J., Tabora J. A. G., Tangonan N. G. T., Tanalgo K. C. T. 2017. Presence of important agro-economic fungi in common frugivorous bats from southcentral Mindanao, Philippines. *Curr. Res. Environ. Appl. Mycol.*, 7(2): 73-81.

- Kokurewicz T., Ogórek R., Pusz W., Matkowski K. 2016. Bats increase the number of cultivable airborne fungi in the “Nietoperek” bat reserve in Western Poland. *Microb. Ecol.*, 72(1): 36-48.
- Kowalski M., Krasnodębski I., Sachanowicz K., Dróżdż R., Wojtowicz B. 1996. Skład gatunkowy, wybiórczość kryjówek i miejsc żerowania nietoperzy w Puszczy Kozienickiej. *Kulon*, 1,(1-2): 25-41.
- Kuehn H. H., Orr G. F. 1964. *Arachniotus ruber* (Van Tieghem) Schroeter. *Transactions of the British Mycological Society*, 47(4): 553-558.
- Lorch J. M., Lindner D. L., Gargas A., Muller L. K., Minnis A. M., Blehert D. S. 2013. A culture-based survey of fungi in soil from bat hibernacula in the eastern United States and its implications for detection of *Geomyces destructans*, the causal agent of bat white-nose syndrome. *Mycologia*, 105(2): 237-252.
- Lorch J. M., Palmer J. M., Vanderwolf K. J., Schmidt K. Z., Verant M. L., Weller T. J., Blehert D. S. 2018. *Malassezia vespertillionis* sp. nov.: a new cold-tolerant species of yeast isolated from bats. *Persoonia*, 41: 56-70.
- Malloch D., Sigler R., Hambleton S., Vanderwolf K. J., Gibas C. F. C., McAlpine D. F. 2016. Fungi associated with hibernating bats in New Brunswick caves: the genus *Leuconeurospora*. *Botany*, 94(12).
- Mużenko W., Majewski T., Ruszkiewicz-Michalska M. 2008. A Preliminary Checklist of Micromycetes in Poland. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences.
- Murray P. R., Rosenthal K. S., Pfaller M. A. 2012. *Mikrobiologia*. Wyd. Medyczne Urban & Partner, Wrocław.
- Nenoff P., Uhrlass S., Kruger C., Erhard M., Hipler U. C., Seyfarth F., Herrmann J., Wetzig T., Schroedl W., Graser Y. 2014. Trichophyton species of *Arthroderma benhamiae* - a new infectious agent in dermatology. *J. Dtsch. Dermatol. Ges.*, 12(7):571-81.
- Nguyen T. T. T., Lee S. H., Jeon S. J., Lee H. B. 2019. First Records of Rare Ascomycete Fungi, *Acrostalagmus luteoalbus*, *Bartalinia robillardoides*, and *Colariella carteri* from Freshwater Samples in Korea. *Mycobiology*, 47(1): 1-11.
- Piecková E., Jesenská Z. 1999. Microscopic fungi in dwellings and their health implications in humans. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 6: 1-11.
- Roux C., Van Warmelo K. T. 1990. Conidiomata in *Bartalinia robillardoides*. *Mycol. Res.*, 94(1): 109-116.
- Sandoval-Denis M., Gené J., Sutton D. A., Cano-Lira J. F., de Hoog G. S., Decock C. A., Wiederhold N. P., Guarro J. 2016. Redefining *Microascus*, *Scopulariopsis* and allied genera. *Persoonia*, 36: 1-36.
- Shubina V. S., Alexandrov D. Y., Alexandrova A. V. 2013. Species composition of microscopic fungi in forest litter, burrows and fur of small mammals. *Mikologiya i Fitopatologiya*, 47(6): 397-404.

- Singh A., Masih A., Khurana A., Singh P. K., Gupta M., Hagen F., Meis J. F., Chowdhary A. 2018. High terbinafine resistance in *Trichophyton interdigitale* isolates in Delhi, India harbouring mutations in the Squalene epoxidase (SQLE) gene. *Mycoses*, 61(7).
- Sun T., Wang X. Q., Zhao Z. L., Yu S. H. 2018. A lethal fungus infects the Chinese white wax scale insect and causes dramatic changes in the host microbiota. *Sci. Rep.*, 8: 5324.
- Thapa V., Turner G. G., Hafenstein S., Overton B. E., Vanderwolf K. J., Roossinck M. J. 2016. Using a Novel Partitivirus in *Pseudogymnoascus destructans* to Understand the Epidemiology of White-Nose Syndrome. *PLOS Pathog.*, 12(12).
- Tsuji M., Tsujimoto M., Imura S. 2016. *Cystobasidium tubakii* and *Cystobasidium ongulense*, new basidiomycetous yeast species isolated from East Ongul Island, East Antarctica. *Mycoscience*, 58(2): 103-110.
- Vanderwolf K. J., Malloch D., Ivanova N. V., McAlpine D. F., 2016. Lack of cave-associated mammals influences the fungal assemblages of insular solution caves in Eastern Canada. *J. Cave Karst Stud.*, 78(3): 198-207.
- Vanderwolf K. J., Malloch D., McAlpine D. F. 2016. Fungi on white-nose infected bats (*Myotis* spp.) in Eastern Canada show no decline in diversity associated with *Pseudogymnoascus destructans* (Ascomycota: Pseudeurotiaceae). *Int. J. Speleol.*, 45(1): 43-50.
- Vanderwolf K. J., Malloch D., McAlpine D. F. 2017. Psychrotolerant Microfungi Associated with Deer Mice (*Peromyscus maniculatus*) in a White-nose Syndrome Positive Bat Hibernaculum in Eastern Canada. *Can. Field Nat.*, 131(3): 238.
- Vanderwolf K. J., McAlpine D. F., Malloch D., Forbes G. J. 2013. Ectomycota Associated with Hibernating Bats in Eastern Canadian Caves prior to the Emergence of White-Nose Syndrome. *Northeast. Nat.*, 20(1): 115-130.
- Visagie C. M., Houbraken J., Frisvad J. C., Hong S. B., Klaassen C. H. W., Perrone G., Seifert K. A., Varga J., Yaguchi T., Samson R.A. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud. Mycol.*, 78: 343-371.
- Wagner da Rocha M., Resck I. S., Caldas E. D. 2014. Purification and full characterization of citreoviridin produced by *Penicillium citreonigrum* in Yeast Extract Sucrose (YES) medium. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 32(4).
- Woźniak C. 1996. History and architecture of the undergrounds of the Międzyrzeczki Rejon Umocniony. The nature of the Gorzow Voivodeship. Bat reserve "Nietoperek". Gorzow Wielkopolski: Voivodeship Fund for Environment Protection and Water Management, 78-113.
- Yasin M. S., Saeed S., Tayyab M., Hashmi A. S., Awan A. R., Firyal S., Naseer R. 2019. Production of microbial biomass protein by *Arachniotus ruber* using banana peel and its biological evaluation in broiler chicks. *J. Chem. Soc. Pakistan*, 41(2): 319-324.

ABSTRACT**RESULTS OF PRELIMINARY RESEARCH ON MICROSCOPIC FUNGI COLONIZING THE VOLATILE MEMBRANES OF BATS FLYING OUT OF AN UNDERGROUND WINTERING SITE**

Bats are the only mammals that are capable of active flight. The places they choose to hide are very diverse, but most often they prefer narrow rock crevices and caves. It has been shown a positive correlation between the numbers of bats and microscopic fungi in underground ecosystems.

This research was carried out on various species of bats flying out of the underground wintering site which was the Nietoperek Nature Reserve, after the hibernation period.

For the tests, swabs moistened with sterile 0.9% NaCl in blister pack were used. Swabs were taken from the volatile bat membranes. A mycological analysis of the collected biological material was performed on a PDA medium. Potato-Dextrose Agar, glucose and potato agar) using 3 incubation temperatures: 8, 24 and $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Fungi were identified by classical methods based on phenotypic features. Among the bats examined, the presence of microscopic fungi of different types was observed.

Słowa kluczowe: nietoperze, grzyby mikroskopijne, błony lotne

Keywords: bats, microscopic fungi, volatile membranes

Dane do kontaktu z autorem:

klaudia.kurczaba97@wp.pl

Roksana Kruszakin, Aleksandra Marek, Paweł Podobiński

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Studenckie Koło Naukowe Zoologów i Ekologów

Opiekun: dr Dariusz Łupicki

PREFERENCJE POKARMOWE I ZACHOWANIE DRAPIEŻNICZE ŚLIMAKA *ANENTOME HELENA* W WARUNKACH LABORATORYJNYCH

Wstęp

Anentome helena (von dem Busch, 1847) jest słodkowodnym ślimakiem należącym do rodziny *Nassariidae*. Zaliczamy do niej głównie morskie gatunki drapieżnych lub padlinożernych ślimaków, zamieszkujące zarówno miękkie dna, jak i skaliste brzegi. Jeszcze kilka lat temu rodzaj *Anentome* błędnie przypisywany był do rodziny *Buccinidae* należącej, razem z *Nassariidae* do nadrodziny *Buccinoidea*. Obie rodziny uważane są za blisko spokrewnione ze względu na znaczące podobieństwo anatomiczne (Galindo i in. 2016).

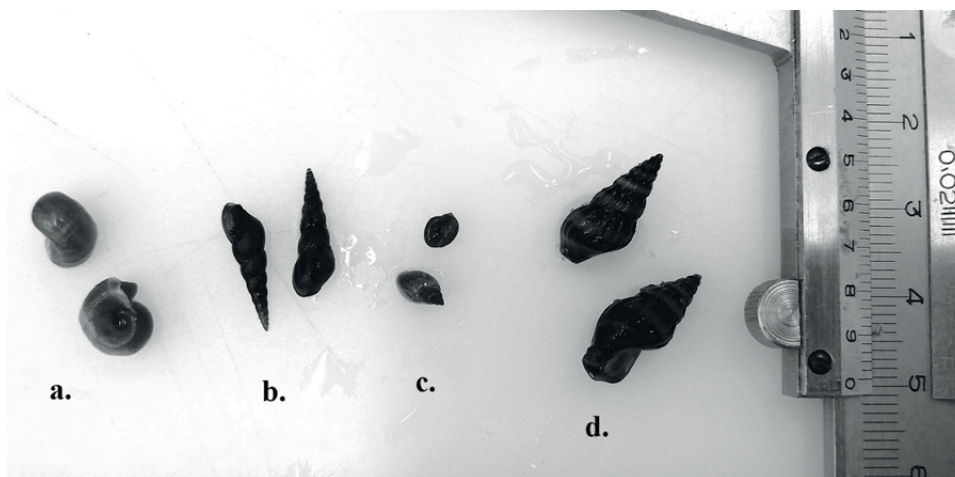
W naturalnym środowisku *A. helena* zamieszkuje wody rzek, jezior, stawów, a nawet rowów o piaszczystym lub błotnistym podłożu. Obecnie reprezentantów tego gatunku powszechnie można spotkać na terenie państw takich jak: Kambodża, Tajlandia, Wietnam, Laos, a także na wyspach należących do Indonezji. Od kilku lat są również spotykane na terenie Singapuru (Ng i in. 2016). Dojrzały osobnik charakteryzuje się owalną, stożkową skorupą o wysokości $24,3 \pm 3,6$ mm pokrytą brązowymi i żółtymi pasami bocznymi, w różnych odcieniach. Lekko żółtawe ciało pokryte jest jasno-szarymi plamkami. Na lewo od głowy, pod muszlą widoczne jest rozwinięcie płaszcza, czyli tzw. syfon. Dzięki dużej liczbie znajdujących się na nim chemoreceptorów spełnia on funkcje zapachowe oraz częściowo odpowiada za orientację w przestrzeni. Otwór gębowy w postaci wydłużonego proboscis, służy do pobierania pokarmu. Na dnie gardzieli znajduje się radula otoczona zębami, ułatwiający konsumpcję (Strong i in. 2017). *A. helena* jest gatunkiem rozdzielnopłciowym bez widocznego dymorfizmu płciowego. Podczas kopulacji samiec zwykle znajduje się za samicą,

będąc lekko przechylonym na prawą stronę. Gatunek wykazuje stosunkowo niski wskaźnik płodności. Samica najczęściej składa wiele pojedynczych jaj w lepkich, prostokątnych osłonkach. W kontrolowanych warunkach laboratoryjnych gatunek jest w stanie rozmnażać się przez cały rok (Coelho i in. 2013).

A. helena jest gatunkiem drapieżnym, aktywnie polującym na ślimaki innych gatunków, również o większych rozmiarach. Ze względu na jego specyficzne zachowania podczas polowania na ofiarę akwaryści często określają go mianem Assassin Snail lub Snail Killer. Przydomek ten zyskał ze względu na to, że najczęściej oczekuje ofiary zakopany w dnie z wysuniętym nad powierzchnię syfonem. Strategia ta sprawia, że polujący osobnik jest niemalże niewidoczny. W zlokalizowaniu ofiary spod powierzchni piaszczystego dna pomagają syfony (Coelho i in. 2013). Zakopywanie w podłożu i oczekiwanie na ofiarę nie jest jedyną strategią polowania; *A. helena* potrafi także gonić ofiarę. Osobniki są ruchliwe i szybkie. Przy pomocy długiej i bardzo sprawnej nogi drapieżnik chwytą ofiarę, następnie wysuwa proboscis, dostając się do wnętrza muszli ofiary i wysysa ciało ślimaka. Często zdarza się, że upolowana zdobycz jest konsumowana przez wiele osobników jednocześnie (Szewczak 2009).

W akwarystyce *A. helena* wykorzystywany jest głównie w celu zwalczania inwazji innych ślimaków, w tym gatunków ekspansywnych, takich jak rozdętka zaostrzona *Physella acuta*, zatoczek rogowy (hodowlana odmiana albinotyczna) *Planorbarius corneus* var. Pink, czy „świderek” *Melanoides tuberculata*. Wymienione gatunki, w tym również *A. helena* przedstawiono na fotografii 1.

Fot. 1. Porównanie rozmiarów badanych ślimaków: (a) *Planorbarius corneus* var. Pink, (b) *Melanoides tuberculata*, (c) *Physella acuta*, (d) *Anentome helena*.



Źródło: Opracowanie własne

Rozdętki, zatoczki oraz świderki wykazują wysoką plenność, a do rozmnożenia wystarczy tylko jeden osobnik (hermafrodytyzm lub partenogeneza) (Brown 2010). Początkiem problemu związanego z inwazją jest zwykle nieświadome przeniesienie jednego z wymienionych gatunków na roślinie, kamieniu, ozdobie lub żywej rybie i umieszczenie go w akwarium (Duggan 2010). Wprowadzenie do zbiornika drapieżnego gatunku ślimaka stanowi więc alternatywę dla chemicznych metod zwalczania niepożądanych mieszkańców akwarium. Poza ślimakami, *A. helena* żywić może się również martwymi rybami, przyczyniając się tym samym do oczyszczania zbiornika (Szewczak 2009).

W wielu krajach, m.in. Tajlandii, *A. helena* uważany jest za gatunek inwazyjny, powodujący znaczne szkody dla rodzimej fauny. Prawdopodobną przyczyną rozprzestrzeniania się tego gatunku w miejscach, gdzie naturalnie nie występował, jest handel zwierzętami i roślinami ozdobnymi (Ng i in. 2016). Najczęściej rozprzestrzenia się wraz z roślinnością wodną. Wykazuje dużą odporność na różne czynniki środowiskowe, m.in. na niską temperaturę. Wypuszczony na wolność w środowisku europejskim *A. helena* również może stać się gatunkiem inwazyjnym. Drapieżnictwo, będące zaletą w domowych akwariach, w naturze może stanowić zagrożenie dla wielu rodzimych gatunków ślimaków (Bogan, Hanneman 2013).

Celem pracy jest poznanie preferencji pokarmowych drapieżnego ślimaka *Anentome helena*, względem wybranych gatunków słodkowodnych ślimaków inwazyjnych. Za zadanie badawcze obrano scharakteryzowanie behawioru ślimaków w układzie drapieżnik-ofiara w warunkach laboratoryjnych.

Material i metody

Materiał badawczy stanowiła grupa 255 ślimaków: 120 osobników *A. helena* oraz po 45 osobników wybranych gatunków: *Physella acuta*, *Melanoides tuberculata* i *Planorbarius corneus* var. Pink. Drapieżniki były głodzone 7 dni przed rozpoczęciem eksperymentu. Wszystkie osobniki odławiano w sposób losowy z wcześniej przygotowanych zbiorników zarodowych, oddzielnych dla każdego gatunku. Układ doświadczenia stanowił zbiornik o kwadratowej podstawie i pojemności 60 L, wyposażony w piaszczyste dno. Wszystkie ślimaki biorące udział w eksperymencie były głodzone na tydzień przed właściwym badaniem. Zbiornik napełniono odchlorowaną wodą kranową do wysokości 20 cm od dna. W trakcie eksperymentu utrzymywano poziom natlenienia, temperaturę i odczyn pH wody w granicach nie odbiegających od wymagań gatunku (7-9 mg O₂/L, 18-22°C, 7-8 pH).

Obrana metodyka zakładała wprowadzenie grupy 10 osobników drapieżnego gatunku *A. helena*, na 30 min przed wprowadzeniem ofiar. W założeniu miało

to dać czas drapieżnikom na zapoznanie się z otoczeniem, aklimatyzację oraz dyspersję. Następnie wprowadzano grupę ofiar, również po 10 osobników. Tak przygotowany zestaw podlegał ciągłym obserwacjom przez 1 godzinę. Do każdej sesji wykorzystano inne osobniki; po półtoragodzinnej obserwacji wymieniano drapieżniki na nowe i wprowadzano kolejny gatunek ofiar. W celu uzyskania możliwie dużej próby danych, przeprowadzono 3 kolejne dni obserwacji. W trakcie jednego dnia badań przeprowadzono 4 sesje; po jednej na każdy z badanych gatunków ofiar, a także sesję mieszaną, oznaczoną jako MIX. Polegała ona na wprowadzeniu do zbiornika kolejnej grupy drapieżników (tym razem bez okresu aklimatyzacji) w jednym z narożników oraz po 5 osobników każdego z badanych gatunków w pozostałych narożnikach. W trakcie obserwacji odnotowywano liczbę zagrzebujących się drapieżników, czas potrzebny do pochwylenia i konsumpcji ofiary i liczbę ofiar. Scharakteryzowano także wszelkie przejawy zachowań drapieżniczych, obronnych oraz anormalnych. Po zakończonej obserwacji wszystkie osobniki odławiano; drapieżniki przenoszono do pustego zbiornika, zaś ofiary wprowadzano ponownie do zbiorników zarodowych. Wszystkie osobniki poddano pomiarowi wysokości muszli (od dolnej krawędzi wargi do szczytu muszli), a także sprawdzono pod kątem skrętności (prawo- lub lewoskrętne), uwzględniając podział na osobniki żywe i martwe/skonsumowane. Pomiary wysokości muszli wykonano przy użyciu suwmiarki analogowej o przedziale dokładności 0,02 mm. W trakcie obserwacji wykonywano zdjęcia poglądowe ważniejszych zachowań, jak również nagrania wideo.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej z użyciem programów Excel i Statistica v.13.0. Preferencje w wyborze ofiar analizowano w oparciu o test Tukeya. Analizę śmiertelność zaprezentowano w postaci wykresów. Analizę behawioralną sporządzono w formie etogramu; wybrane zachowania zostały szczegółowo scharakteryzowane.

Wyniki badań

Pomiary muszli nie wykazały istotnych statystycznie zależności. Odrzucone zostały osobniki młode o niewielkich rozmiarach oraz osobniki starsze o znacznie większych muszlach. Skrętność muszli była właściwa gatunkom i w żadnym z badanych przypadków nie odstawała od normy. Dane prezentujące podstawowe informacje o budowie muszli przedstawiono w tabeli 1. Test Tukeya nie wykazał istotnych statystycznie preferencji w wyborze ofiar. Wykazano jednak preferencję w wyborze *P. corneus* na poziomie istotności $\alpha = 15\%$.

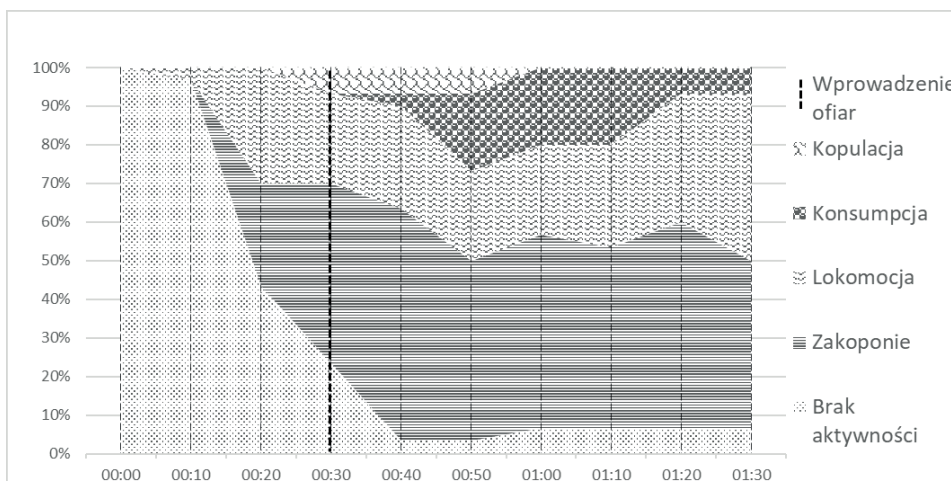
Średnią aktywność drapieżników w poszczególnych układach eksperymentu zaprezentowano na wykresach 1-4. Wraz z wpuszczeniem ślimaków do zbior-

Tab. 1. Średnia wysokość muszli z podziałem na osobniki żywe i ofiary oraz skrętność.

Gatunek	Śr. wys. muszli [mm]	Śr. wys. muszli ofiar [mm]	Skrętność muszli
<i>Anentome helena</i>	15,6	-	prawoskrętna
<i>Physella acuta</i>	6,54	6,36	leuoskrętna
<i>Planorbarius corneus</i>	6,1	5,91	prawoskrętna
<i>Melanoides tuberculata</i>	15,22	14,96	prawoskrętna

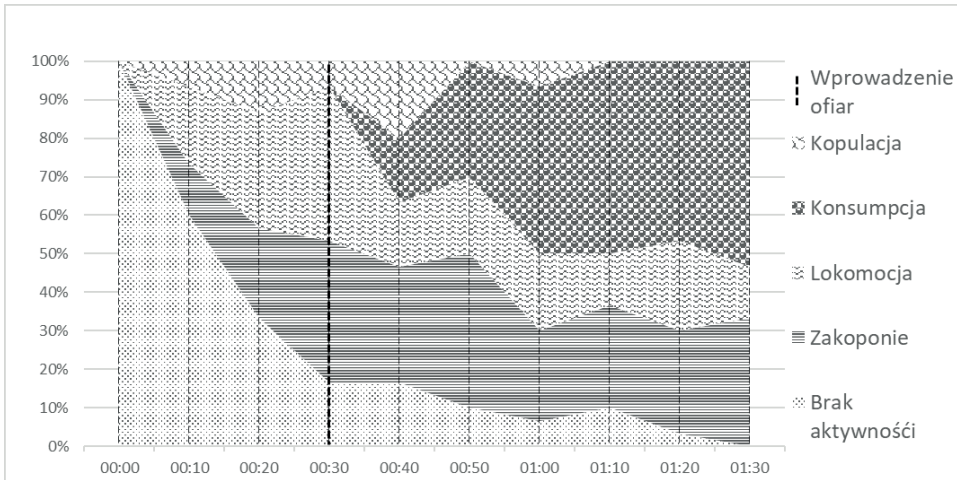
Źródło: Opracowanie własne

nika notowano całkowity brak aktywności, który z czasem zastępowany był innymi zachowaniami. Najczęściej następowało zakopanie w podłożu, następnie powolna eksploracja. Po wprowadzeniu ofiar w większości przypadków zwiększała się aktywność, głównie na rzecz eksploracji otoczenia. Eksploracja przebiegała po podłożu, rzadziej po ściankach zbiornika. Procent osobników biorących udział w konsumpcji był różny w poszczególnych układach. Najwięcej ślimaków podjęło zachowania pokarmowe w próbie z *P. corneus* – 53%. W przypadku prób z *M. tuberculata* i MIX, konsumpcja rozpoczęła się po 10 min od wprowadzenia ofiar. Zachowania rozrodcze pojawiały się w dwóch próbach; dla *P. acuta* oraz *P. corneus*. Było one jednak rzadko preferowane i nie obejmowały więcej niż 20% osobników ogółem. W próbie MIX, bez okresu

Wyk. 1. Wykres przedstawiający sumaryczną aktywność *A. helena* w obecności *P. acuta*.

Źródło: Opracowanie własne

Wyk. 2. Wykres przedstawiający sumaryczną aktywność *A. helena* w obecności *P. corneus*.

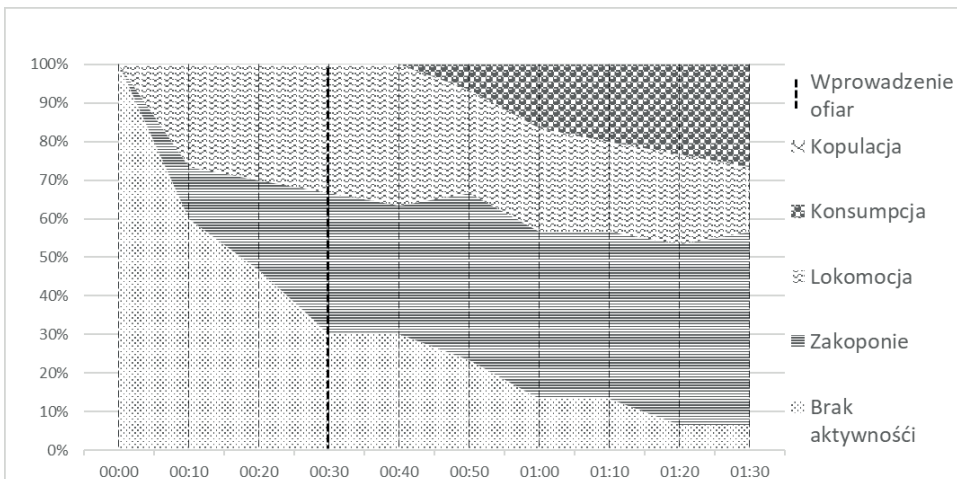


Źródło: Opracowanie własne

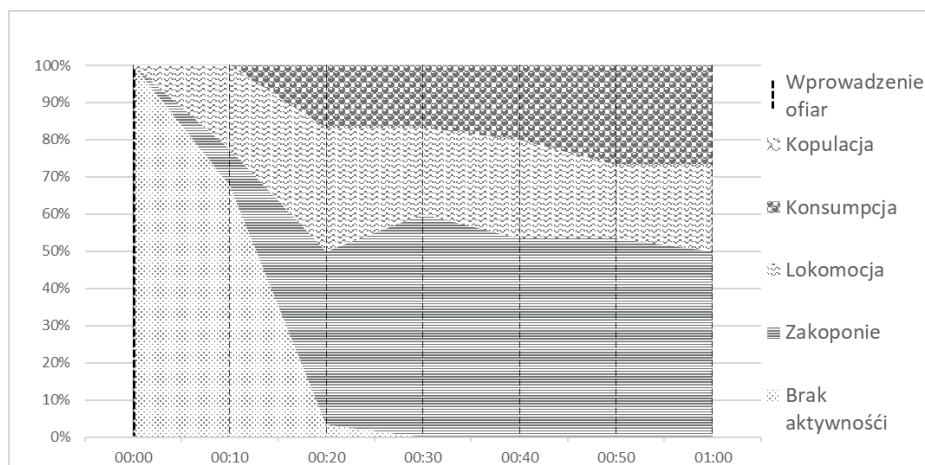
aklimatyzacji, drapieżniki wybierały próbę zakopania się znacznie częściej niż pozostałe aktywności.

W próbach z wykorzystaniem *P. acuta* znaczna część drapieżników pozostawała zakopana w piasku. Aktywność wzrastała stopniowo w czasie trwania eksperymentu. Ze względu na zachowania obronne *P. acuta* często obserwowano

Wyk. 3. Wykres przedstawiający sumaryczną aktywność *A. helena* w obecności *M. tuberculata*.



Źródło: Opracowanie własne

Wyk. 4. Wykres przedstawiający sumaryczną aktywność *A. helena* w obecności wszystkich gatunków ofiar (sesja MIX)

Źródło: Opracowanie własne

aktywność *A. helena* na powierzchni ścian zbiornika. Podczas trwania eksperymentu *A. helena* upolowały i skonsumowały 9 osobników gatunku *P. acuta* (7 podczas próby z gatunkiem i 2 w próbie MIX). Konsumpcja odbywała się zwykle w pojedynkę. Zaobserwowano porzucenie ofiary i niedokończenie konsumpcji przez jednego osobnika oraz późniejszą jej kontynuację przez innego osobnika, który wcześniej nie wykazywał dużej aktywności. Tylko dwa osobniki *P. acuta* zostały skonsumowane przez dwa drapieżne ślimaki jednocześnie. Najszybszą reakcję drapieżników obserwowano w próbie z *P. corneus*. Zarówno próby kopulacji, jak i próby polowań występowały najczęściej. Osobniki zakopane stanowiły mniej niż 50% każdej z obserwowanych prób. 8 z 13 ofiar będących przedstawicielami *P. corneus* były konsumowane przez więcej niż jednego drapieżnika w tym samym czasie. Zanotowano zbiorową konsumpcję jednego *P. corneus* przez 5 drapieżników, pomimo dużej dostępności pozostałych ofiar. Łącznie ofiarami *A. helena* padło 13 osobników *P. corneus*, w tym 4 podczas próby MIX. Zachowania rozrodcze zaobserwowano we wszystkich 3 próbach. Obniżenie aktywności i widoczny brak zainteresowania ofiarami obserwowano w próbach z wykorzystaniem *M. tuberculata*. Skonsumowanych zostało 7 osobników, żaden nie pochodził z próby MIX. Tylko jeden zjadany był przez dwa drapieżniki jednocześnie. Czas, jaki *A. helena* potrzebny był do rozpoczęcia polowania, był znacznie dłuższy w stosunku do prób z wykorzystaniem innych gatunków. Nie zaobserwowano żadnych zachowań rozrodczych. Wszystkie zaobserwowane w eksperymencie zachowania zebrano w tabeli 2.

Tab. 2. Zbiorczy etogram zaobserwowanych zachowań.

KATEGORIA	ZACHOWANIE	DEFINICJA	GATUNEK PRZEJAWIAJĄCY ZACHOWANIA
Ruch	Lokomocja	Swobodne przemieszczanie się po dnie lub ścianach zbiornika	<i>A. helena</i> <i>P. acuta</i> <i>M. tuberculata</i> <i>P. corneus</i>
		Orientacja w terenie przez chemorepcję	<i>A. helena</i>
	Brak	Brak ruchu	<i>A. helena</i> <i>P. acuta</i> <i>M. tuberculata</i> <i>P. corneus</i>
Zachowania pokarmowe	Pobieranie pokarmu	Wsunięcie proboscis do muszli ofiary	<i>A. helena</i>
Zachowania drapieżnicze	Polowanie	Pościg lub atak z ukrycia i pochwycenie ofiary przy pomocy stopy	<i>A. helena</i>
	Zakopywanie się	Zakopanie w piasku w celu ukrycia się przed ofiarą i ataku z zaskoczenia	<i>A. helena</i>
Zachowania społeczne	Tworzenie stad	Gromadzenie się podczas konsumpcji; wspólna konsumpcja	<i>A. helena</i>
		Gromadzenie się w nieruchome skupiska	<i>P. corneus</i>
	Kopulacja	Akceptacja partnera i stosunek	<i>A. helena</i>
Zachowania obronne	Ucieczka	Ucieczka, często na ściany zbiornika	<i>P. acuta</i>
	Chowanie się	Ukrycie się wewnątrz muszli	<i>A. helena</i> <i>P. acuta</i> <i>M. tuberculata</i> <i>P. corneus</i>
		Zakopanie się w piasku	<i>M. tuberculata</i> <i>P. corneus</i> <i>A. helena</i>
	Tworzenie stad	Gromadzenie się w nieruchome skupiska w celu uniknięcia ataku	<i>P. corneus</i>

Źródło: Opracowanie własne

Oprócz zachowań drapieżniczych obserwowano szereg zachowań obronnych stosowanych przez grupy osobników wybranych na ofiary. Niewielkie *P. acuta* za strategię obronną wybrały szybką ucieczkę oraz wspinaczkę po ścianach zbiornika w pobliżu tafli wody. Znaczna część osobników podczas prowadzenia obserwacji znajdowała się na ścianach akwarium, tylko nieliczne aktywnie eksplorowały piaszczyste dno. Odmienną strategią posługiwali się przedstawiciele *P. corneus*. Najczęściej obserwowano zbieranie się w 3 lub więcej osobnicze grupy uniemożliwiające drapieżnikom dostanie się do otworów muszli. Kilka osobników próbowało ucieczki i aktywnie przemieszczało się po dnie zbiornika. Niewielka część zakopywała się w piasku, wykorzystując tym samym strategię, którą posługuje się *M. tuberculata*. Każdy z obserwowanych osobników tego gatunku w celu ukrycia zakopywał się w piaszczystym dnie, zwykle w miejscu, w którym został umieszczony. *M. tuberculata* porusza się bardzo powoli w porównaniu z pozostałymi omawianymi gatunkami.

Dyskusja

A. helena to bardzo popularny w akwarystyce gatunek ślimaka, którym można posłużyć się do ograniczenia ekspansji niepożądanych osobników w naszych akwariach (Bogan, Hanneman 2013). Mimo to istnieje bardzo mało publikacji i informacji dotyczących preferencji pokarmowych *A. helena*. W naszych badaniach osobniki tego gatunku wykazywały specyficzne zachowania zarówno wewnątrzgatunkowe, jak i w stosunku do ofiar. Jednym z częściej obserwowanych zachowań było zakopywanie się w piasku. W ten sposób drapieżnik staje się niewidoczny dla swojej potencjalnej ofiary, a dzięki wysuniętemu ponad powierzchnię syfonowi jest w stanie ją zlokalizować. Znaczną przewagę nad ofiarami zapewnia mu także większa prędkość poruszania się. Jednakże podczas obserwacji zauważono, że przedstawiciele *P. acuta* wykazywali się większą prędkością niż pozostałe gatunki ofiar. Wysoka mobilność rozdętek jest cechą często odnotowywaną w literaturze (Strong i in. 2017). Po upolowaniu ofiary częstym zachowaniem, które można było zaobserwować u *A. helena*, było przyłączanie się kolejnych ślimaków tego gatunku do już konsumującego osobnika. W takiej grupie najczęściej przypadało 2-4 konsumentów na jedną ofiarę. Według innych źródeł, gdy ofiara jest znacznie większa, osobniki *A. helena* bardzo często polują w grupie (Strong i in. 2017).

Otrzymane wyniki sugerują, że spośród trzech gatunków potencjalnych ofiar, tj. *P. acuta*, *M. tuberculata* i *P. corneus*, to właśnie ten ostatni jest preferowany przez drapieżnika. *P. corneus* jest niewielkim gatunkiem ślimaka z rodziny *Planorbidae*, szeroko rozprzestrzenionym w Polsce. Stanowi ła-

twą ofiarę dla drapieżnika, ponieważ jest powolny. Gatunek ten nie posiada ochronnej klapki, czyli operculum, przez co dostęp do wnętrza muszli przez proboscis staje się łatwiejszy. Osobniki zatoczka rogowego rzadko zakopują się w podłożu, przez co *A. helena* bez trudu może je upolować. Sporadycznie przemieszczały się i przeważnie trzymały się razem. Jediną strategią obronną, jaką wykazywały, była agregacja, powodująca powstawanie skupisk. Zatoczki w skupiskach pozostawały nieruchomo, schowane wewnątrz muszli, z otworami muszli skierowanymi względem pozostałych osobników. Takie zachowanie znacznie utrudniało lub uniemożliwiało drapieżnikom wsunięcie proboscis do wnętrza muszli (Urbański 1957). Jednym z domniemanych czynników, który mógł wpływać na preferowanie zatoczków, jest także skład ich krwi. *Planorbidae*, w przeciwieństwie do większości mięczaków, jako barwnik krwi posiadają hemoglobinę (nie zaś hemocyjaninę) (Lieb i in. 2006). Ponieważ ślimaki wodne w swoim funkcjonowaniu opierają się głównie na chemorecepcji, obecność hemoglobiny w tkankach zatoczków może wpływać na smakowitość i/lub upodabniać je do kręgowców. Takie zachowanie tłumaczyłoby opisywane preferencje, jednak w niniejszych badaniach nie brano pod uwagę działania substancji semiochemicznych. Tworzy to jednak pole do dalszych rozważań nad interakcjami drapieżnik-ofiara.

Uzyskane wyniki wskazują, że po zatoczku rogowym najchętniej preferowanym gatunkiem okazała się być rozdętka zaostrzona. Podczas wykonywania doświadczenia zaobserwowano, że jest on najszybszym gatunkiem spośród wszystkich. Ich sprawność i szybkość często stanowiły ratunek przed atakiem ze strony drapieżnika. Ślimaki te, oprócz ucieczki, posiadają inną strategię obronną. Podczas obserwacji zauważono, że w reakcji na kontakt z drapieżnikiem mogą manipulować pęcherzykiem gazów obecnym w jamie płaszcza, co umożliwia im natychmiastowe zanurzenie lub wynurzenie (Turner 1996). Strategia ta stanowi dużą przewagę nad osobnikami *A. helena*, które nie posiadają przystosowań umożliwiających im swobodne przemieszczanie się w toni wodnej.

Nasze badania wskazały, że najrzadziej padającym ofiarą gatunkiem był *M. tuberculata*. Prawdopodobnie wynika to z trudności dokonania ataku na ofiarę. Świderki, po umieszczeniu ich w akwarium, bardzo często zakopywały się głęboko w piasku, rzadko wędrowały po dnie. Osobniki te posiadają wydłużoną, spiralną i bardzo twardą muszlę, wyposażoną w wieczko, co prawdopodobnie wyjaśnia, dlaczego osobniki *A. helena* polowały na nie stosunkowo niechętnie (Van Damme 2010).

Schemat zachowań przedstawicieli *A. helena* w próbie MIX był odmienny w stosunku do pozostałych prób. Można było zaobserwować ich dezorientację przejawiającą się wędrowką po dnie zbiornika z ciągłą zmianą kierunku. Jednak-

że najczęstszym zachowaniem w takich próbach było zakopywanie się głęboko w piasku. Przepuszczalnie brak okresu akomodacji, jak również różnorodność w wyborze ofiar spowodowały zaburzenie procesu decyzyjnego. Mnogość bodźców u niektórych osobników skutkowało zaniechaniem eksploracji, dalszej aktywności oraz zakopaniem się w podłożu.

Poszczególne zachowania obronne, a także przystosowania anatomiczne ofiar do pewnego stopnia wyjaśniają wykazane preferencje żywieniowe w eksperymencie. Znając preferencje i behavior drapieżniczy *A. helena*, możemy w łatwy i w kontrolowany sposób ograniczyć lub całkowicie wyeliminować ekspansję niepożądanych gatunków ślimaków, które z jakiegoś powodu znalazły się w naszym akwarium. Przy czym najwyższej skuteczności można spodziewać się w przypadku inwazji *P. corneus*.

Podsumowanie

Przeprowadzony eksperyment pozwolił na opisanie ogólnych wzorców zachowań, jakimi kierują się ślimaki w układzie drapieżnik-ofiara. Dane liczbowe nie pozwoliły na jednoznaczne wykazanie preferencji w wyborze ofiar, jednak wyniki obserwacji wskazują na albinotyczną hodowlaną odmianę zatoczka rogowego jako najczęściej chwytaną i konsumowaną ofiarę. Jednoznacznie wykazano, że schemat zachowań drapieżnika ulega zmianie zależnie od rodzaju ofiary, z jaką ma styczność. Nie są znane natomiast konkretne czynniki, które przyczyniają się do ukierunkowania reakcji. Dyskusji poddano naturalne uwarunkowania poszczególnych gatunków, ze szczególnym uwzględnieniem budowy muszli oraz ogólnej aktywności lokomotorycznej. Dzięki zastosowaniu autorskiej metodyki udało się zaobserwować liczne zachowania, tak drapieżnicze jak i obronne, wybranych ślimaków w warunkach laboratoryjnych. *Anentome helena* wydaje się być efektywnym elementem biologicznej ochrony roślin akwarystycznych przed ślimakami. Z drugiej jednak strony obawy budzi jego potencjalny wpływ na malakofaunę, kiedy przedostanie się do środowiska naturalnego. Wnikliwe poznanie biologii oraz zachowań tego gatunku może okazać się kluczowe dla dziedzin amatorskich jak i użytkowych w ciągu kolejnych lat, co daje przyczynek do dalszych badań.

Literatura:

- Bogan A., Hanneman E. 2013. A Carnivorous Aquatic Gastropod in the Pet Trade in North America: the Next Threat to Freshwater Gastropods? *Ellipsaria*, 15(2): 18-19.
- Brown K., Lydeard C. 2010. Mollusca: Gastropoda. [w:] Bivalvia. Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates. Academic Press, 3: 277-307.
- Coelho A., Dinis M., Reis J. 2013. Effect of Diet and Stocking Densities on Life History Traits of *Cleahelena* (Philippi 1847) Reared in Captivity. *Aquac. Res. Develop.*, 4(5): 187.
- Duggan I. 2010. The freshwater aquarium trade as a vector for incidental invertebrate fauna. *Biological Invasions*, 12(11): 3757-3770.
- Galindo L., Puillandre N., Utge J., Lozouet P., Bouchet P. 2016. The phylogeny and systematics of the Nassariidae revisited (Gastropoda, Buccinoidea). *Mol. Phylogen. Evol.*, 99: 337-353.
- Lieb B., Dimitrova K., Kang H., Gebauer W., Martin A., Hanelt B., Seanz S., Adema C., Markl J. 2006. Red blood with blue-blood ancestry: Intriguing structure of a snail hemoglobin. *PNAS*, 103(32): 12011-12016.
- Ng T., Tan S., Wong W., Meler R., Chan S. Tan H., Yeo D. 2016. Molluscs for Sale: Assessment of Freshwater Gastropods and Bivalves in the Ornamental Pet. *PLoS ONE*, 11(8): 1-23.
- Strong E., Galindo L., Kantor Y. 2017. Quid est *Cleahelena*? Evidence for a previously unrecognized radiation of assassin snails (Gastropoda: Buccinoidea: Nassariidae). *PeerJ.*, 5: 3638.
- Szewczak P. 2009. O „Krwawej Helenie”. *Nasze Akwarium*, 110: 25-28.
- Turner A. 1996. Freshwater snails alter habitat use in response to predation. *Animal Behaviour*, 51: 747-756.
- Urbański J. 1957. *Krajowe ślimaki i małże*. Warszawa, PZWS.
- Van Damme D. 2010. *Melanoidestherculata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2010: e.T155675A4821333. Downloaded on 25 March 2020.

ABSTRACT***ANENTOME HELENA* FOOD PREFERENCES AND PREDATORY BEHAVIOR IN LABORATORY CONDITIONS**

Anentome helena is a freshwater predator snail naturally found in Southeast Asia. Its presence successfully reduces the number of highly invasive species, which is why it is used as an element of biological plant protection in aquariums and terrariums around the world. The experiment involved conducting a series of behavioral tests in laboratory conditions, using popular species of aquarium snails, serving as victims. Individuals of all species were placed in the tank in groups of 10. Predators were subjected to one-hour sessions with victims, with a 30-minute accommodation period. Predatory behavior, hunting and consumption patterns, as well as preferences in the selection of individual victims were recorded and described. The obtained results were used to estimate the effectiveness of *A. helena* use to fight the invasion of aquarium snails and to characterize the spectrum of predation behavior of this species in laboratory conditions.

Słowa kluczowe: ślimaki słodkowodne, drapieżnictwo, zachowania obronne, aktywność lokomotoryczna, proboscis

Keywords: freshwater snails, predation, defensive behavior, locomotor activity, proboscis

Dane do kontaktu z autorem:

Paweł Podobiński

pawel.podobinski@upwr.edu.pl

Angga Nofa Prasetyo

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Koło Naukowe Diagnostyki Chorób Roślin ZYMOKS

dr hab. inż. Urszula Wachowska, prof. nadzw.

SELECTION OF SEVERAL *AUREOBASIDIUM PULLANS* ISOLATES TO DETERMINE THEIR EFFECTIVENESS IN SUPPRESSING THE DEVELOPMENT OF *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Introduction

The cultivation of durum wheat (*Triticum turgidum* ssp. *durum*) is an important wheat production in the regions that having a relatively dry climate, with hot days and cool nights during the growing season, typical of the Mediterranean and temperate climates. The main producing countries of durum wheat are Canada, Italy, Spain, France, Morocco, Algeria, Tunisia, Kazakhstan, Australia and Mexico. This type of wheat is used to make pasta products, such as macaroni, spaghetti, and other pasta products (Fabriani, Lintas 1988).

Durum wheat is also an important crop in EU member countries, where the planting area reached around 2.3 million ha with yields reaching 8.5 million tons according to the European Commission reports (2019), the top yields are between 5 and 6 t ha⁻¹ with the average production is 3.6 ha⁻¹. The main areas of cultivation include four traditional regions - Italy, Greece, Spain, and France. Outside the Mediterranean area, lower productivities are recorded as well as Poland which is starting to plant durum wheat mainly in southern Poland. In Poland, durum wheat plantation mainly still focused on introducing the yield-forming potential as well as crop quality.

Apart from introducing the ongoing cultivation of durum wheat in Poland, plant protection is also needed for anticipation to protect durum wheat for the future. Several countries that produce durum wheat in the world report that durum wheat shows symptoms various diseases such as: Tan spot caused by *Drechslera tritici-repentis* (Simoglou and Dordas 2006), Black points caused

by complex pathogens such as *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Penicillium* and *Aspergillus* (Khlebova et al. 2019), Septoria tritici blotch (STB) caused by *Mycosphaerella graminicola* (Ferjaoui et al. 2015), Powdery mildew caused by *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* (Ceron and Martel 2003) and Fusarium Head Blight (FHB) caused by several species of *Fusarium* and *Microdochium* (Pancaldi et al. 2010).

Apart from the chemical treatments, biological products based on microorganisms, including on *A. pullulans*, are or can be a solution in suppressing FHB disease. Due to its ability to survive in various environments such as tropical, subtropical, temperate, arctic climate (Zalar et al. 2008), and in the phyllosphere (Andrews et al. 1994), it can be applied to any plants without failure of treatment as an effect of extreme conditions. Fungus *A. pullulans* have been found to be effective against several pathogenic fungi such as *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus niger* in vineyard, *Aspergillus carbonarius* in grapes and strawberries, *B. cinerea* and *P. expansum* in apples (Castoria et al. 2001), and against three species of the genus *Monilinia* on stone fruit (Mari et al. 2012). Nevertheless the use of *A. pullulans* as a biological control agent of pathogens in durum wheat production is not widely studied. Differences in plant species may affect the effectiveness of *A. pullulans* isolates in suppressing the development of FHB disease. Knowing the right isolate will facilitate further research. The aim of the study was to isolation, identification and selection several *A. pullulans* isolates as a potential biological control agent of pathogens for durum wheat cultivated in of Poland.

Material and methods

The isolates of the species *A. pullulans* were obtained from *Triticum turgidum* ssp. *durum* grain and apple fruit (Table 1). The morphology of *A. pullulans* colonies was described based on their visual observations after 4-day incubation on potato dextrose agar (PDA) medium (Merck, Poland) in the dark at 24°C. The size of blastospores and chlamydospores was measured under light microscope (Nikon E200, Japan). The isolates of the species *F. graminearum* were obtained from grain of cv. Durasol durum wheat grown in a plot trial (Bałcyny, Poland). DNA of collected strains of both fungi were extracted from the mycelium, which was obtained from 7-day-old cultures. Molecular identification of *A. pullulans* and *F. graminearum* was carried out using the PCR method. DNA was extracted by mechanical lysis. Primers designed for *A. pullulans* were used to amplify and sequence the ITS region (ITS5 (F) GTATCGGA CGGAGATCCAGC, and ITS4 (F) TTGCTCAGTGCATTG TCGG). Reactions were carried out in PCR

Mastercycler Ep Gradient (Eppendorf) with an initial denaturation profile 2 min at 94°C, then 6 cycles of 15 seconds at 94°C, 15 seconds at 58°C and 45 seconds at 72°C and 30 cycles lasting 15 seconds at 94°C, 15 seconds at 56°C and 45 seconds at 72°C, with a final extension of 7 minutes at 72°C. Sequences were obtained with ABI Prism 3700 (Genomed, Poland). They were assembled and edited using SeqMan 3.61, and finally downloaded sequences. The similarities between sequences were determined with NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Molecular identification of *A. pullulans* and *F. graminearum* was carried out using the PCR method. DNA was extracted by mechanical lysis. Primers designed for *A. pullulans* were used to amplify and sequence the ITS region (ITS5 (F) GTATCGGA CGGAGATCCAGC, and ITS4 (F) TTGCTCAGTG-CATTG TCGG). Reactions were carried out in PCR Mastercycler Ep Gradient (Eppendorf) with an initial denaturation profile 2 min at 94°C, then 6 cycles of 15 seconds at 94°C, 15 seconds at 58°C and 45 seconds at 72°C and 30 cycles lasting 15 seconds at 94°C, 15 seconds at 56°C and 45 seconds at 72°C, with a final extension of 7 minutes at 72°C. Sequences were obtained with ABI Prism 3700 (Genomed, Poland). They were assembled and edited using SeqMan 3.61, and finally downloaded sequences. The similarities between sequences were determined with NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information, Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

The studies regarding the influence of yeast growth on the development of the *F. graminearum* colonies were conducted on PDA medium in Petri dishes. Firstly medium was inoculated with *F. graminearum* strain by laying out a part

Table 1. The origin of *Aureobasidium pullulans* isolate.

Isolate code	Plant species	Cultivar
<i>A. pullulans</i> Ap1	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Durum</i>	Durasol
<i>A. pullulans</i> Ap2	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Durum</i>	Durasol
<i>A. pullulans</i> Ap6	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Durum</i>	Durasol
<i>A. pullulans</i> Ap7	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Durum</i>	Tamadur
<i>A. pullulans</i> Ap9	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Durum</i>	Tamadur
<i>A. pullulans</i> Ap11	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Durum</i>	Tamadur
<i>A. pullulans</i> Ap15	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Durum</i>	Durasol
<i>A. pullulans</i> Ap16	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Durum</i>	Durasol
<i>A. pullulans</i> Ap24	<i>Triticum turgidum</i> ssp. <i>Durum</i>	Durasol
<i>A. pullulans</i> Apcc	<i>Malus domestica</i>	Antonówka

Source: Own study

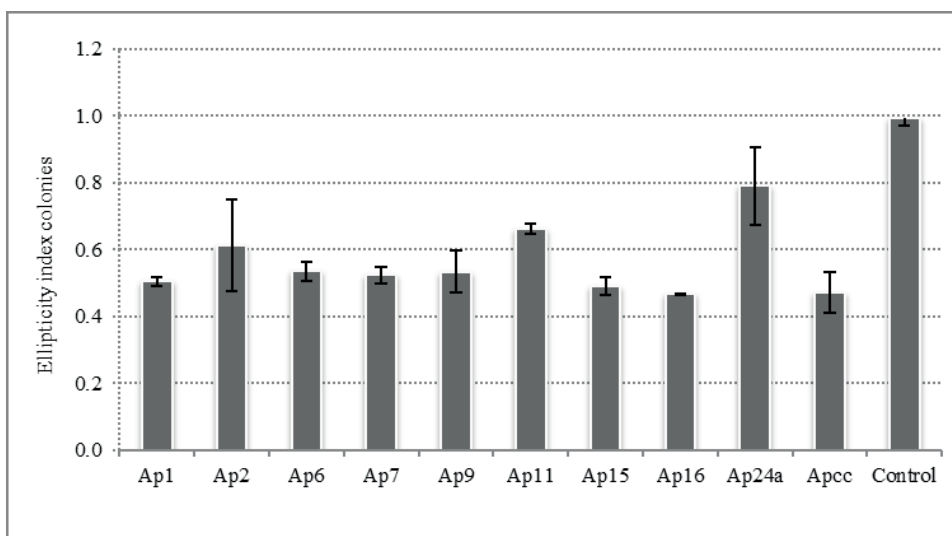
of medium overgrown by fungus mycelium with the PDA medium. Next after 7 days of incubation in 24°C, each isolate of *A. pullulans* was applied vertically as two straight lines which surrounded the developed *F. graminearum* colony. After 4 days of incubation the antibiotic effect of *A. pullulans* strains was measured as area and by ellipse coefficient of *F. graminearum* colonies. Ten *A. pullulans* isolates were tested, namely Ap1, Ap2, Ap6, Ap7, Ap9, Ap11, Ap15, Ap16, Ap24 and Apcc. In the study the control treatment was Petri dishes, were *F. graminearum* colonies grew without yeast. The test for each yeast isolate was conducted twice.

Analysis of variance was carried out using the software package Statistica 13 and significance of differences between the means was verified with Duncan’s test.

Results and discussion

Principally colonies of *F. graminearum* fungus growing on the agar medium are circular in shape. In the presented tests the inoculation of *A. pullulans* horizontally affected the growth both sides of *F. graminearum* colonies. Consequently colonies of *F. graminearum* became ellipse in shape. Inhibition of growth of *F. graminearum* was seen on the side that was applied by *A. pullulans*.

Figure 1. Screening tests by dual culture with *Fusarium graminearum* and *Aureobasidium pullulans*: elliptical coefficient of *F. graminearum* colonies.

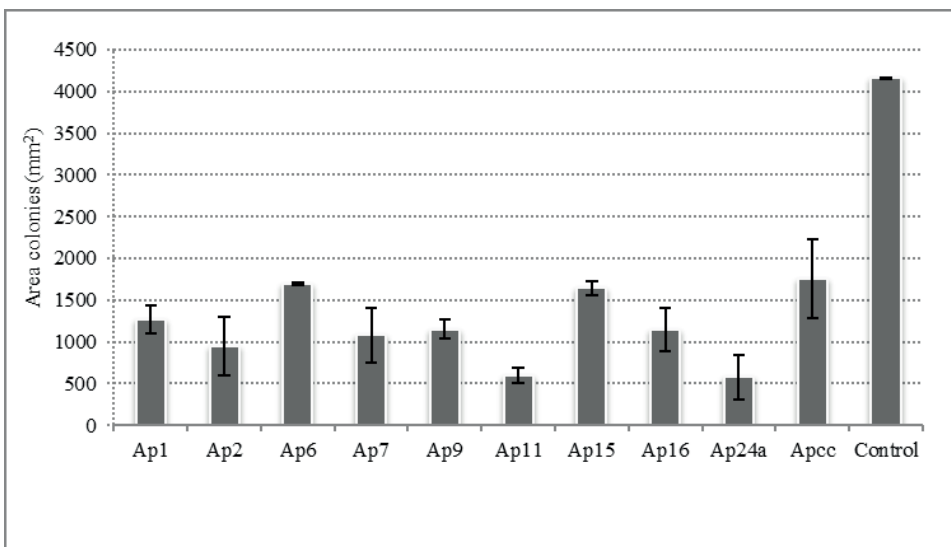


Source: Own study

The ellipse coefficient value of 1 means the shape of a perfect circle colony while those close to 0 will be more elliptical. In the control treatment the ellipse coefficient value for *F. graminearum* colonies was 0.993 on average (Figure 1) while in the treatment with *A. pullulans* was visibly smaller. The mean value of ellipse coefficient on *F. graminearum* affected by *A. pullulans* is 0.56. The smallest ellipse coefficient value was measured for the treatment with isolate Ap16 which was 0.47 (Figure 1) while in case of isolate Ap24a the value was largest i.e. 0.79 (Figure 1).

The discriminant effect of *A. pullulans* strains against fungus *F. graminearum* also was clearly seen on basic of comparison of colony area of pathogen. The smaller area of *F. graminearum* colony indicated that *A. pullulans* isolate was more effective in suppressing the development of *F. graminearum*. In the control treatment the area of pathogen colony was on average 4156 mm² (Figure 2), while the mean value *F. graminearum* affected by various *A. pullulans* isolates was 1252 mm². The isolate Ap24a of *A. pullulans* was most effective in supressing of *F. graminearum* colony, while effect of isolate Apcc was weak. The average value o area of *F. graminearum* colony treated with these isolates was 580 mm² and 1760 mm², respectively. The effectiveness of *A. pullulans* expressed in percentage towards pathogen colony area was on average 71%. The most effective isolate was isolate Ap24a which could have suppressed the

Figure 2. Screening tests by dual culture with *Fusarium graminearum* and *Aureobasidium pullulans*: area of *F. graminearum* colonies.



Source: Own study

development of *F. graminearum* up to 86% while Apcc isolate effectively suppressed only up to 56%.

The deformation and reduction in the area of the *F. graminearum* colony can be attributed to the production of antifungal compounds such as aureobasidin, chitinase and antifungal volatile organic compound (VOCs) by *A. pullulans*. Endo et al. (1997) reported that aureobasidin A (AbA) killed growing cells, crushed vacuoles losing the permeability barrier of the cell membrane, changed the cell morphology, and caused abnormalities actin assembly and chitin deposition. Ippolito et al. (2000) reported that *A. pullulans* secrete chitinase and glucanase enzymes able to hydrolyse moulds. Yalage Don et al. (2019) reported that antifungal VOCs produced by *A. pullulans* suppress the growth of some fungal pathogens in a Petri dish.

AbA inhibited bud growth. Bud growth is an important first stage for fungi to multiply. Bud growth will form hyphae which perform a function in absorbing nutrients from the environment and transporting them to other parts of the thallus (fungus body). By inhibiting the bud growth, it reduces the multiplication process of fungal cells. Endo et al. (1997) suggested that the mechanism of inhibition of bud growth is by inhibiting normal actin assembly, especially in the formation of filamentous cables, resulting in the mistargeting of materials like chitin for new cell walls of growing buds. Besides inhibiting actin assembly, AbA also inhibits the transport of materials needed for bud growth.

Chitinase is able to degrade the cell wall of fungi and inhibit the growth of the hyphal tips. Chitinase production by *A. pullulans* is still limited. Hartati et al. (2015) reported that *A. pullulans* produced chitinolytic enzyme which indicated the ability of this yeast-like fungus to degrade chitin. Chitinolytic enzymes produced by *A. pullulans* disrupted the hyphal growth of and caused lysis of cell wall. Extracellular activity of exochitinase and β -1,3-glucanase of *A. pullulans* involved in antagonistic activity against several postharvest pathogens such as *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Rhizopus stolonifer*, and *Aspergillus niger* (Castoria et al. 2001).

It is known that *A. pullulans* produces antifungal volatile organic compounds (VOCs) that have been postulated as one of the biocontrol mechanisms. The VOCs composed of simple hydrocarbons, heterocycles, aldehydes, ketones, alcohols, phenols, thioalcohols, thioesters and their derivatives, derivative of benzene and cyclohexanes (Korpi et al. 2009). Component of these volatile compounds have important roles in biocontrol of plant pathogens. The mechanism of VOCs produced by *A. pullulans* is by inhibiting the conidia germination. VOCs produced by some strains of *A. pullulans* play important antagonistic activity on some postharvest pathogens i.e. *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*,

Penicillium digitatum and *Penicillium italicum* (Francesco et al. 2014). Hartati et al. (2015) added that VOCs produced *A. pullulans* also inhibit the growth of *Colletotrichum acutatum*.

Conclusion

In the in vitro studies was shown that *A. pullulans* yeasts can affected the growth and development of *F. graminearum*, one of agent caused Fusarium Head Blight (FHB) on durum wheat. The more visible effect was given by some isolates obtained from wheat grain i.e. the same ecological niche as tested pathogen. Activity of *A. pullulans* obtained from apple fruit was prevailingly weaker. It seems that for the confirmation of their antibiotic abilities the most effective isolates of *A. pullulans*, which were screened in the above studies, should be included as potential biological control agent of wheat diseases in the further trials conducted in condition a little closer to the practice of the wheat cultivation e.g. in greenhouse.

References:

- Andrews J. H., Harris R. F., Speaer R. N., Lau G. W., Nordheim E. V. 1994. Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. *Can. J. Microbiol.*, 40: 6-17.
- Castoria R., De Curtis F., Lima G., Caputo L., Pacifico S., De Cicco V. 2001. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: Study on its modes of action. *Postharvest Biology and Technology - Postharvest Biol. Technol.*, 22: 7-17.
- Ceron M. M. C., Martel I. S. 2003. Effects of powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) on breeding lines of durum wheat (*Triticum turgidum* L. spp. *durum*) yield in western Andalusia. *Span. J. Agric. Res.*, 1(3): 13-18.
- Endo M., Takesako K., Kato I., Yamaguchi, H. 1997. Fungicidal action of aureobasidin A, a cyclic depsipeptide antifungal antibiotic, against *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41(3): 672-676.
- European Commission. 2019. Short-term outlook for EU agricultural markets in 2019 and 2020. Ed. N°24.
- Fabriani G., Lintas C. 1988. Durum Wheat: Chemistry and Technology. Minnesota: American Association of Cereal Chemists, Inc.
- Ferjaoui S., Ben M'Barek, S., Bahri, B., ben slimane, R., Hamza, S. 2015. Identification of resistance sources to Septoria tritici blotch in old *Tunisian durum* wheat germplasm applied for the analysis of the *Zymoseptoria tritici-durum* wheat interaction. *J. Plant Pathol.*, 1. 10.4454/JPP.V97I3.028.

- Francesco A. D., Ugolini L., Lazzeri L., Mari M. 2014. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biological Control*, (81): 8-14.
- Hartati S., Wiyono S., Hidayat S. H., Sinaga M. S. 2015. Mode of Action of Yeast-Like Fungus *Aureobasidium pullulans* in Controlling Anthracnose of Postharvest Chili. *Int. J. Sci., Basic and Applied Research (IJSBAR)*, 20(2): 253-263.
- Ippolito A., El Ghaouth A., Wilson C. L., Wisniewski M. 2000. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Postharvest Biol. Technol.*, 19: 265–272.
- Khlebova L., Barysheva N., Ziborov A., Brumberg I. 2019) Black point in spring durum wheat under different environmental conditions. *Ukrainian J. Ecol.*, 9. 713-718.
- Korpi A., Jarnberg J., Pasanen A. L. 2009. Microbial volatile organic compounds. *Critical Rev. Toxicol.*, (39): 139-193.
- Mari M., Martini C., Guidarelli M., Neri F. 2012. Postharvest biocontrol of *Monilinia laxa*, *Monilinia fructicola* and *Monilinia fructigena* on stone fruit by two *Aureobasidium pullulans* strains. *Biol. Control*, 60(2): 132-140.
- Pancaldi D., Tonti S., Prodi A., Salomoni D., Dal Pra M., Nipoti P., Alberti J., Pisi A. 2010. Survey of the main causal agents of fusarium head blight of durum wheat around Bologna, northern Italy. *Phytopatol. Mediterr.*, 49: 258-266.
- Simoglou, K., Dordas, C. 2006. Effect of foliar applied boron, manganese and zinc on tan spot in winter durum wheat. *Crop Protection*, 25: 657-663.
- Yalage Don S., Schmidtke L., Gambetta J., Steel C. 2019. Volatile organic compounds produced by *Aureobasidium pullulans* inhibit the growth of *Botrytis cinerea* and *Alternaria alternata*. Abstract from V International Symposium on Postharvest Pathology, Liege, Belgium.
- Zalar P., Gostincar C., de Hoog G.S, Ursic V., Sudhadham M., Gunde-Cimerman N. 2008. Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology*, 61: 21-38.

ABSTRACT

SELECTION OF SEVERAL *AUREOBASIDIUM PULLANS* ISOLATES TO DETERMINE THEIR EFFECTIVENESS IN SUPPRESSING THE DEVELOPMENT OF *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Gatunek *Aureobasidium pullulans* jest grzybem drożdżopodobnym, który może bytować w różnych środowiskach. W biotechnologii *A. pullulans* wykorzystywany jest głównie jako

producent pullulanu (poli-alfa-1,6-maltotriozy), zewnątrzkomórkowego polisacharydu, zdolny jest także do wytwarzania antybiotyku aureobazydyny. Enzymy produkowane przez ten grzyb mogą ograniczać rozwój mikroorganizmów i odgrywają kluczową rolę w biologicznej ochronie roślin przed fitopatogenami. Celem badań było wyosobnienie, identyfikacja i selekcja izolatów *A. pullulans* hamujących rozwój kolonii *Fusarium graminearum*, sprawcy fuzariozy kłosów pszenicy. Izolaty *A. pullulans* uzyskano z ziarna *Triticum turgidum* ssp. *durum* i jabłek. Zostały one zidentyfikowane na podstawie sekwencjonowania rybosomalnego fragmentu DNA i obserwacji mikroskopowych. In vivo wszystkie izolaty *A. pullulans* ograniczały rozwój kolonii *F. graminearum*. Izolaty najsilniej hamujące rozwój kolonii analizowanego patogenu wybrano do dalszych badań w szklarni.

Słowa kluczowe: *Aureobasidium pullulans* izolaty, ochrona biologiczna, *Fusarium graminearum*.

Keywords: *Aureobasidium pullulans*, isolate, biological control, *Fusarium graminearum*.

Dane do kontaktu z autorem:

angga.nofaprasetyo@student.uwm.edu.pl

Barbara Irena Zarzecka, Alicja Komar, Magdalena Łyczewska
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologów
Opiekun: dr hab. Dorota Górniak

MIKROBIOLOGICZNA OCENA WODY W PROCESIE PRODUKCYJNYM W MIKROBROWARZE

Wstęp

Woda jest naturalnym środowiskiem występowania mikroorganizmów. Wśród nich można wyróżnić zarówno bakterie naturalnie występujące, jak i pochodzące z zanieczyszczeń (np. odzwierzęcych, glebowych). Przez wodę może przenosić się znaczna część chorób, co związane jest najczęściej z zanieczyszczeniami kałowymi (Rygała, Kręgiel 2017).

Woda wraz z chmielem i słodem stanowią podstawowe surowce w procesie wytwarzania piwa. Woda używana w procesach produkcyjnych w zakładach browarniczych musi spełniać normy dla wody przeznaczonej do przygotowania żywności oraz spożycia przez ludzi. Większość zakażeń mikrobiologicznych piwa określana jest mianem zakażeń wtórnych, czyli występujących po przygotowaniu brzezki z chmielem. Z tego powodu należy zachować szczególną czystość przedmiotów i urządzeń mających kontakt z półproduktem po ochłodzeniu brzezki (Priest 2006). W instalacjach przemysłowych, pod wpływem nawet śladowych zanieczyszczeń, mogą tworzyć się tzw. biofilmy, czyli skupiska bakterii oraz substancji organicznej, które osadzają się wewnątrz instalacji, tworząc błony biologiczne. Przyczynia się to do stałego pogarszania jakości wody w procesie produkcyjnym i może być źródłem zagrożeń mikrobiologicznych dla zdrowia człowieka (Rygała, Kręgiel 2017).

Badania mikrobiologiczne pozwalają na monitorowanie oraz jakościową kontrolę wód wodociągowych, a przez to zapewniają zachowanie jej bezpieczeństwa. Mikrobiologiczna analiza wody skupia się na poszukiwaniu organizmów wskaźnikowych tj. identyfikacji bakterii z grupy coli, *E. coli* i enterokoków oraz dodatkowo na określeniu ogólnej liczby bakterii. Ogólna liczba mikroorgani-

zmów jest niezbędnym parametrem umożliwiającym ocenę jakości wody wodociągowej, jak również metod mycia urządzeń czy stanu sanitarnego systemu rurociągowego (Matuszewska i in. 2018). W przypadku wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi parametr określający ogólną liczbę mikroorganizmów jest ujęty jako parametr wskaźnikowy, zatem nie jest określona jego konkretna dopuszczalna wartość (Dyrektywa Rady 98/83/WE 1998). Wskaźnik ten jest stosowany przez organy nadzoru sanitarnego do monitorowania jakości mikrobiologicznej wody i jego zmian w czasie, co pozwala na wykrywanie nieprawidłowości i ewentualnie docierających do ujęcia zanieczyszczeń. Ważnym aspektem przy wykonywaniu oznaczeń ogólnej liczby bakterii w wodzie jest temperatura. Hodowla w temperaturze pokojowej (22-25°C) pozwala na wykrycie bakterii naturalnie występujących w wodzie, które zwykle nie mają wpływu na zdrowie człowieka, gdyż w temperaturze ludzkiego ciała bakterie te nie są zdolne do rozwoju. Temperatura inkubacji odpowiadająca temperaturze ciała człowieka pozwala ujawnić bakterie, które mają znaczenie sanitarne. Do takich mikroorganizmów zaliczane są bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, bakterie grupy coli, enterokoki, bakterie z rodzaju *Staphylococcus*, *Pseudomonas* oraz *Aeromonas*. Hodowle prowadzone w temperaturze 37°C/42°C pozwalają na wykrycie bakterii pochodzenia jelitowego, które są potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka (Matuszewska i in. 2018).

Charakterystycznym elementem procesu otrzymywania piwa jest wykorzystanie wysokiej temperatury w początkowych etapach produkcji. Z tego powodu zachowanie wysokiej czystości mikrobiologicznej wykorzystywanej w procesie wody wydaje się nie być konieczne, gdyż działanie wysokiej temperatury skutecznie zabija wszystkie mikroorganizmy (Priest 2006; Jagodziński i in. 2016). Jednym z ostatnich etapów produkcyjnych zapewniających ograniczenie ilości drobnoustrojów w produkcji jest pasteryzacja piwa. Proces polega na poddaniu gotowego produktu działaniu wysokiej temperatury (około 60°C) i unieszkodliwieniu ewentualnie występujących mikroorganizmów. Wykorzystanie procesu pasteryzacji po butelkowaniu wyklucza wtórne zakażenia, jednak powoduje pogorszenie cech organoleptycznych, takich jak aromat, barwa czy smak piwa. Z tego powodu producenci tradycyjnych, rzemieślniczych browarów ograniczają lub całkowicie wykluczają proces pasteryzacji (Żyrek 2006).

Zagrożenia mikrobiologiczne rzemieślniczych piw niepasteryzowanych mogą wynikać nie tylko z niepoprawnie przeprowadzonych procesów mycia i dezynfekcji, ale również z zakażeń wody, powietrza, używanego w produkcji inokulum oraz niewystarczającej higieny pracowników. Do najczęstszych przyczyn zakażeń pojawiających się w browarach należą wady maszyn, konstrukcji zbiorników lub rurociągów (Satora, Tuszyński 2004).

W przypadku piwa niepasteryzowanego głównymi niepożądanymi bakteriami są gronkowce, paciorkowce, drożdże dzikie oraz bakterie mlekowe, które, podobnie jak drożdże dzikie, powodują psucie się i pogorszenie cech organoleptycznych gotowego piwa. Bakterie z rodzajów *Lactobacillus* i *Pediococcus* są najbardziej niebezpieczne dla produkcji piwa, a w przypadku piw niepasteryzowanych również beztlenowce z rodzaju *Pectinatus* (Priest 2006; Jagodziński i in. 2016).

Cel pracy

Celem pracy była ocena jakości mikrobiologicznej wody wykorzystywanej w rzemieślniczej produkcji piwa niepasteryzowanego. W pracy podjęto próbę określenia zagrożeń mikrobiologicznych wynikających z niedostatecznej jakości wody oraz sposobów zapobiegania tym zagrożeniom.

Materialy i metody

Badania zostały przeprowadzone w browarze rzemieślniczym w Olsztynie, zajmującym się rzemieślniczym wytwarzaniem piwa. Na jego terenie znajduje się hydrant przyłączony do miejskiej sieci wodociągowej, z którego pobierana jest woda do produkcji i rozprowadzana po całym obiekcie. Do badań pobrano 9 prób wody z różnych etapów ciągu produkcyjnego. Badaniu poddano wodę wodociągową z bezpośredniego przyłącza do obiektu ($n = 2$), wodę wodociągową rozprowadzaną po obiekcie za pomocą systemu rurociągowego ($n = 4$) oraz wodę przepływającą przez węże doprowadzające ($n = 3$). Analiza i porównanie prób wody na początku i końcu węży doprowadzających posłużyła ocenie wpływu nośników wody na jej jakość mikrobiologiczną.

Wodę do analiz pobierano do sterylnych szklanych butli typu Simax o pojemności 1 litra. Wszystkie krany, z których zostały pobrane próbki, pozbawiono wszelkich urządzeń, mogących wpłynąć na wyniki badań (z wyłączeniem prób wód przepływających przez węże doprowadzające), oczyszczono przy użyciu detergentu, a następnie dokładnie spłukano. Przed właściwym poborem wylewki kranu sterylizowano za pomocą alkoholu. Wodę przed pobraniem spuszczano przez 5 minut. Próbkę transportowano do Katedry Mikrobiologii i Mykologii Wydziału Biologii i Biotechnologii, gdzie poddano je analizom.

Do oceny jakości mikrobiologicznej pobranych próbek wody wykorzystano dwie metody hodowli: metodę wysiewu powierzchniowego (100 μ l) oraz metodę filtrów membranowych (100 ml). Określano liczebność bakterii heterotroficznych w temp. 25°C i 37°C, liczebność wybranych drobnoustrojów patogennych

oraz liczebność bakterii wskaźnikowych sanitarnej jakości wody, tj. bakterii z grupy coli i *E. coli*.

W badaniach wykorzystano membrany filtracyjne nitrocelulozowe (Merck-Millipore) o porowatości 0,45 µm. Membrany z osadzonymi bakteriami wykładano na podłoże *E. coli* Chromogenic Medium (BioMaxima) służące do wykrywania bakterii grupy coli i *E. coli*. Hodowle inkubowano w temp. 37°C przez 48 godz. Następnie zliczano ciemnoniebieskie (*E. coli*) i różowe (grupa coli) kolonie.

W posiewie powierzchniowym zastosowano podłoża: R2A, agar odżywczy, Chapmana oraz McConkeya. Agar odżywczy użyto jako podłoże nieróżnicujące do hodowli mezofilnych bakterii heterotroficznych. Podłoże R2A jest powszechnie stosowanym podłożem do namnażania bakterii heterotroficznych występujących w wodzie. Podłoża Chapmana i McConkeya są podłożami różnicującymi, pozwalającym na stwierdzenie obecności odpowiednio bakterii z rodzaju *Staphylococcus* oraz pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*. Posiewy na podłożu R2A inkubowano w temp. 25°C przez 7 dni. Pozostałe posiewy w temp. 37°C przez 48 godz. Następnie zliczano jednostki tworzące kolonie (jtk) i obliczano liczbę bakterii w 1 ml wody.

Wyniki i dyskusja

W badanych próbach w zależności od miejsca poboru wody wykazano zróżnicowaną liczebność analizowanych drobnoustrojów (tabela 1).

Wykazano obecność zarówno psychro- jak i mezofilnych bakterii heterotroficznych. Psychrofilne bakterie heterotroficzne występowały na wszystkich badanych stanowiskach. Najmniejszą liczebność wykazano w wodzie z kranu przyłączonego do wymiennika ciepła w leżakowni (250 jtk/1 ml) oraz na ujściu węża grubego przyłączonego do hydrantu 1 (110 jtk/1 ml). Najwyższą liczbę psychrofilnych heterotrofów (730 jtk/1 ml) wykazano w wodzie z hydrantu 1 – bezpośrednio przyłączonego do sieci wodociągowej (tabela 1, ryc. 1).

Heterotroficzne bakterie mezofilne (inkubowane w 37°C) były mniej liczne, wykazano je w 4 miejscach poboru wody oraz we wszystkich badanych węzłach. W przeciwieństwie do psychrofilii, największą liczbę mezofili wykazano na ujściu kranu przyłączonego do wymiennika ciepła w leżakowni (160 jtk/1 ml). W pozostałych miejscach liczba tych bakterii nie przekraczała 30 jtk/1 ml. Nie wykazano obecności mezofili w wodzie pobranej z hydrantu 1 oraz w wodzie z kranu za myjką kegow (tabela 1). W węźle gumowym liczba tych bakterii wyniosła 250 jtk/1 ml czyli wzrosła ponad 12-krotnie w porównaniu z miejscem przyłączenia węża (w którym wykazano 20 jtk/1 ml). Oba węże przyłączone do hydrantu 1 wykazały obecność bakterii heterotroficznych. W

Tabela 1. Liczebność bakterii w badanych próbach wody (jtk – jednostki tworzące kolonie).

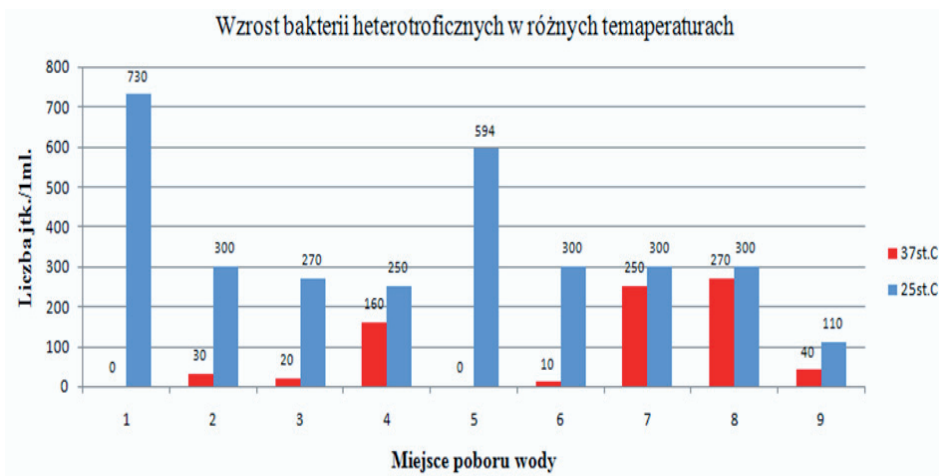
Nr próby	Miejsce poboru	Agar odżywczy (37°C) jtk/1 ml	R2A (25°C) jtk/1 ml	Podłoże McConkeya jtk/1 ml	Podłoże Chapmana jtk/1 ml	Chromagar jtk/100 ml	
						E. coli	Grupa coli
woda wodociągowa z przyłączenia bezpośredniego							
1	hydrant 1 – bezpośrednie przyłączenie do sieci wodociągowej w leżakowni	0	730	0	10	5	0
2	hydrant 2 bezpośrednie przyłączenie do sieci wodociągowej w warzelni	30	N.p.*	0	20	0	0
woda przepływająca przez system rurociągowy							
3	kran w leżakowni	20	270	0	70	0	0
4	kran, przyłączenie do wymiennika ciepła w leżakowni	160	250	0	30	0	0
5	kran za myjką kegow, ujście bezpośrednie	0	594	0	0	0	1
6	kran za myjką kegow – koniec linii rurociągowej	10	N.p.*	0	20	121	7
woda przepływająca przez węże							
7	wąż używany do mycia w leżakowni podłączony do kranu (3)	250	N.p.*	30	0	1	1
8	hydrant 1, wąż cienki	270	N.p.*	20	0	1	0
9	hydrant 1, wąż gruby	40	110	0	10	32	13

N.p.* – Niepoliczalne - wzrost zlewny

Źródło: Opracowanie własne

przypadku węża cienkiego ich liczba wyniosła 270 jtk/1 ml, a w przypadku węża grubego 40 jtk/1 ml. Woda z hydrantu 1 nie zawierała mezofilnych bakterii heterotroficznych (tabela 1, ryc. 1).

Ryc. 1. Liczebność psychro- i mezofilnych bakterii heterotroficznych w badanych próbach wody.



Źródło: Opracowanie własne

Wzrost na podłożu Chapmana wskazuje na obecność gronkowców, które mogą produkować toksyny zagrażające zdrowiu człowieka. W badanych próbach wykazano obecność gronkowców mannitolu ujemnych. Największą liczbę stwierdzono na ujściu kranu w leżakowni – 70 jtk/1 ml. Najmniejszą liczbę stwierdzono w bezpośrednim podłączeniu do sieci – 10 jtk/1 ml. Gronkowców nie odnotowano w wodzie z kranu za myjką kegow, w wodzie z gumowego węża przyłączonego do kranu w leżakowni i węża cienkiego przyłączonego do hydrantu 1 (tabela 1).

Na podłożu McConkeya hodowane są bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, które żyją w ludzkim przewodzie pokarmowym. Bakterie te są zdolne do produkcji niebezpiecznych dla zdrowia toksyn. Bakterie te wykryto wyłącznie w wodzie pochodzącej z węży. W wodzie z węża gumowego podłączonego do kranu w leżakowni – 30 jtk/1 ml. W wodzie na końcu węża cienkiego przyłączonego do hydrantu 1 – 20 jtk/1 ml. W wodzie z węża grubego przyłączonego do hydrantu 1, ujęć bezpośrednich oraz ujęć z systemu rurociągowego gronkowców nie stwierdzono (tabela 1).

Zastosowane w metodzie FM podłoże chromogenne pozwalała na jednoczesne wyróżnienie bakterii grupy coli, tj. bakterii mogących wywoływać infekcje pokarmowe oraz *E. coli*, czyli pałeczki okrężnicy. Bakterie te wykazano w wodzie pobranej z hydrantu 1 oraz z kranu za myjką kegow na początku i końcu linii rurociągowej. W wodzie z hydrantu 1 wyizolowano bakterie *E. coli* (ciemnoniebieskie kolonie). Ich liczba w 100 ml wyniosła 5 jtk. Na końcu linii – kran

za myjką kegow, liczba bakterii *E. coli* wynosiła 121 jtk/100 ml. Analiza wody z węży wykazała obecność *E. coli* w każdym z nich. Najwięcej (32 jtk/100 ml) w grubym wężu, a najmniej (1 jtk/100 ml) w cienkim wężu przyłączonym do hydrantu 1. W każdym z węży stwierdzono również obecność bakterii z grupy coli (ryc. 2).

Ryc. 2. Liczebność *E. coli* i bakterii z grupy coli w miejscach poboru wody.



Źródło: Opracowanie własne

Według norm zawartych w rozporządzeniu Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2007 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi (Dz. U. z 2017 r., poz. 2294), w 100 ml nie dopuszcza się obecności ani jednej komórki *E. coli*, jednocześnie nie określono maksymalnej wartości ogólnej liczby mikroorganizmów, jednak zalecono, by ilość ta w wodzie doprowadzanej do odbiorcy nie przekraczała 200 jtk w 1 ml wody.

Wykazano, że węże gumowe i metalowe (cienki i gruby) podnosiły parametry ogólnej liczby bakterii. Większą liczbę bakterii zaobserwowano w wodzie z węża gumowego, w porównaniu do węży metalowych. Przypuszczalnie jest to związane z częstym odkazaniem, płukaniem i budową węży metalowych, co ogranicza tworzenie się w nich biofilmów. Sugeruje to, że używanie węży metalowych znacznie zmniejsza ryzyko występowania błon biologicznych w nośniku, w porównaniu z używaniem węży gumowych.

W badaniach własnych największa liczba bakterii heterotroficznych wyizolowana została na ujęciu bezpośrednio z rurociągów miejskich. Przyczyną zwiększonej liczebności drobnoustrojów może być niezadawalający stan techniczny miejskiej sieci wodociągowej w dzielnicy Olsztyna ze starą infrastrukturą sieci wodnej. Wśród zidentyfikowanych w tej próbie bakterii występowały gron-

kowce oraz bakterie *E. coli*, które potencjalnie mogą stanowić zagrożenie dla zdrowia człowieka. Niniejsze badania są pierwszymi takimi wykonywanymi na terenie zakładu, stąd nie ma możliwości określenia zmian liczebności bakterii na przestrzeni czasu.

Podobną przyczynę podwyższonego zagęszczenia bakterii w wodzie wodociągowej, czyli zły stan techniczny rurociągów oraz obecność błon biologicznych, wskazują w swoim badaniu Rożej i Aftyka (2013). Analiza tych badaczy skupiła się na korelacji liczby bakterii w próbach a regularnością poboru wody z poszczególnych punktów. Badania te wskazują, że wysoka liczebność bakterii utrzymuje się w wodzie z punktów poboru, które są rzadko używane nawet po upuszczeniu znacznej objętości wody. Natomiast najmniejsze liczebności bakterii wykazano w pomieszczeniu charakteryzującym się regularnym poborem wody. Jako przyczynę złego stanu sanitarnego wody badacze ci również wskazali obecność biofilmów zalegających w rurociągach będących źródłem zanieczyszczenia mikrobiologicznego (Rożej, Aftyka 2013).

W 2016 r. Zamorska i in. przeprowadziła analizę bakteriologiczną wody wodociągowej na terenie powiatu rzeszowskiego. Badania te opierały się na ogólnej liczbie mikroorganizmów oraz oznaczeniach bakterii z grupy coli za pomocą metod klasycznych płytkowych i nowoczesnej metody cytometrii przepływowej w różnych okresach roku. Wyniki ujawniły, że liczba mikroorganizmów oznaczona cytometrem przepływowym jest wielokrotnie wyższa od liczby mikroorganizmów w hodowli płytkowej. Przyczyna tak znacznych różnic wynika z faktu, że cytometr ujawnia zarówno żywe, jak i martwe komórki. W badaniach wykazano również, że sezonowość nie ma istotnego wpływu na wyniki badań jakości bakteriologicznej wody wodociągowej. Wyniki wykazały obecność bakterii z grupy coli, jak również paciorkowców kałowych w dwóch analizowanych punktach poborowych (Zamorska i in. 2016).

W celu skutecznej eliminacji zagrożeń mikrobiologicznych należy rozpoznać źródło ich powstawania. Do najczęstszych przyczyn powstawania trudności w utrzymaniu poziomu sanitarnego zakładu należą wady konstrukcyjne zbiorników, maszyn i rurociągów oraz źle przeprowadzone procesy mycia i dezynfekcji. Urządzenia używane w browarze należy myć i dezynfekować w taki sposób, aby skutecznie usunąć wszystkie zanieczyszczenia fizyczne i mikrobiologiczne zgodnie z zasadami HACCP i GHP (Satora, Tuszyński 2004).

Podsumowanie

Zachowanie pełnej jałowości w procesie produkcji jest trudne ze względu na wszechobecność mikroorganizmów, które znajdują się nie tylko w wodzie, ale

także w powietrzu, na aparaturach i instalacjach, a także na ludzkim organizmie. Niniejsze badania ujawniły wady konstrukcyjne rurociągów miejskich, jak również wewnątrz zakładowych powodujące powstawanie błon biologicznych i podwyższoną liczebność bakterii w wodzie. Podobne skutki niesie ze sobą używanie węży w zakładzie produkcyjnym. Zastosowanie środków prowadzących do eliminacji mikroorganizmów, takich jak usuwanie wad konstrukcyjnych, zachowanie higieny i częsta dezynfekcja, mogą okazać się niewystarczające, jednak minimalizują one ich wpływ na stan ostatecznego produktu. W przypadku analizowanego browaru zalecono dodatkowe formy eliminacji mikroorganizmów obecnych w wodzie, tj. wymianę wszystkich węży, zainstalowanie lamp UV i filtrów na całej długości systemu doprowadzającego wodę. Do zaleceń włączono również przegląd instalacji wodociągowej, weryfikację i kontrolę procesów mycia i dezynfekcji urządzeń oraz przeprowadzenie szkoleń pracowników w zakresie zagrożeń mikrobiologicznych i higieny. Wszystkie zalecenia zostały uwzględnione oraz wykonane przez zleceniodawcę badań.

Literatura:

- Barrell R. A. E., Hunter P. R., Nichols G. 2000. Microbiological standards for water and their relationship to health risk. *Commun. Dis. Public Health*, 3(1):8-13.
- Dyrektywa Rady 98/83/WE z dnia 3 listopada 1998 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi, *Dziennik Urzędowy Wspólnot Europejskich*.
- Jagodziński J., Dziągów S., Krzywonos M. 2016. Stabilność mikrobiologiczna domowych piw niepasteryzowanych. *Acta Sci. Pol., Biotechnologia*, 15: 15-24.
- Matuszewska R., Krogulska B., Maziarka D. Ogólna liczba mikroorganizmów w 22°C w wodzie przeznaczonej do spożycia przez ludzi. Państwowy Zakład Higieny, Główny Inspektorat Sanitarny, Warszawa, 2018.
- Priest F. G. 2006. *Microbiology and Microbiological Control in the Brewery*. [w:] *Handbook of brewing* (reds.) Priest F. G, Stewart G. G, Taylor & Francis Group, L. L. C.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 7 grudnia 2017 r. w sprawie jakości wody przeznaczonej do spożycia przez ludzi. *Dz. U.* 2017 poz. 2294.
- Rożej A., Aftyka A. 2013. Zmiany jakości mikrobiologicznej wody podczas stagnacji w instalacji wodociągowej budynku użyteczności publicznej. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, 8:312-316.
- Rygała A., Kręgiel D. 2017. Jakość wody a system HACCP. *Kierunek Spożywczy*, 3: 24-28.

- Satora P., Tuszyński T. 2004. Zakażenia mikrobiologiczne piwa. *Laboratorium Przegląd Ogólnopolski*, 4: 13-18.
- Tuszyński T., Makarewicz M. 1998. Drożdże dzikie w przemyśle piwowarskim-zagrożenia i wybrane metody wykrywania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 3: 43-57.
- Zamorska J., Papciak D., Zdeb M. 2015. New method for evaluation of the microbiological quality of water. *J. Civil Engineering, Environ. Archi.*, 62: 523-530.
- Zamorska J., Zdeb M., Papciak D. 2016. Jakość bakteriologiczna wody wodociągowej. *Inżynieria Ekologiczna*, 48: 219-225.
- Żyrek E. 2006. Zagrożenia mikrobiologiczne przy „aseptycznym” rozlewie piwa-przyczyny infekcji na rynku, zapobieganie. *Agro Przemysł*, 6: 23-28.

ABSTRACT

MICROBIOLOGICAL ASSESSMENT OF WATER IN A CRAFT BREWERY

The article presents the results of microbiological analysis of water in a craft brewery in Olsztyn. A total of 9 water samples were taken, which were analysed by surface culture and membrane filtration. The total number of heterotrophic bacteria at 25°C and 37°C, the number of staphylococci, bacteria of Enterobacteriaceae family, *E. coli* and coliforms were determined. The presence of both psycho- and mesophilic heterotrophic bacteria in water collected from direct connection to the water supply has been demonstrated. This research revealed structural flaws in city and in-house pipelines resulting in the formation of biofilms and an increased number of bacteria in water. The use of hoses in a production has similar effects. The main recommendations for the examined plant were the replacement of water carriers and the installation of UV lamps and filters at various stages of the production line. It was recommended to train employees on microbiological hazards in breweries, control washing and disinfection processes throughout the entire production line as well as review and possible repairs of the internal water supply network.

Słowa kluczowe: jakość wody, zagrożenia mikrobiologiczne, browar, bakteria, *E. coli*

Keywords: quality of water, microbiological hazards, brewery, bacteria, *E. coli*

Dane do kontaktu z autorem:

alicja.komar@student.uwm.edu.pl

SEKCJA NAUK MEDYCZNYCH

Maria Derkaczew, Ewelina Joniec

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Studenckie Koło Naukowe Patomorfologii

Opiekun: lek. Magdalena Misiukiewicz-Poć

STUDIUM PRZYPADKU PACJENTKI Z OSTRĄ BIAŁACZKĄ LIMFOBLASTYCZNĄ Z WCZESNYM ZAJĘCIEM OUN

Wstęp

Nowotwory złośliwe u dzieci występują relatywnie rzadko. Co roku w państwach rozwiniętych 140-160 przypadków na milion, czyli jedno na ok. 6700 dzieci ma zdiagnozowany nowotwór złośliwy (Lacour i in. 2010; Li i in. 2008; Kaatsch, Spix 2006; Miachel i in. 2008). Wśród dzieci od pierwszego do czwartego roku życia nowotwory złośliwe występują częściej: u ok. 200 na milion rocznie. Najczęstszymi nowotworami złośliwymi u dzieci do 15 roku życia są: białaczki (29% przypadków), nowotwory złośliwe OUN (23%), chłoniaki (12%) oraz neuroblastoma (8%) (Lacour i in. 2010). Na przestrzeni lat obserwuje się stały wzrost częstości występowania u dzieci nowotworów złośliwych, w tym białaczek. Badania prognozują utrzymywanie się tendencji wzrostowej w kolejnych latach (Pesola i in. 2017).

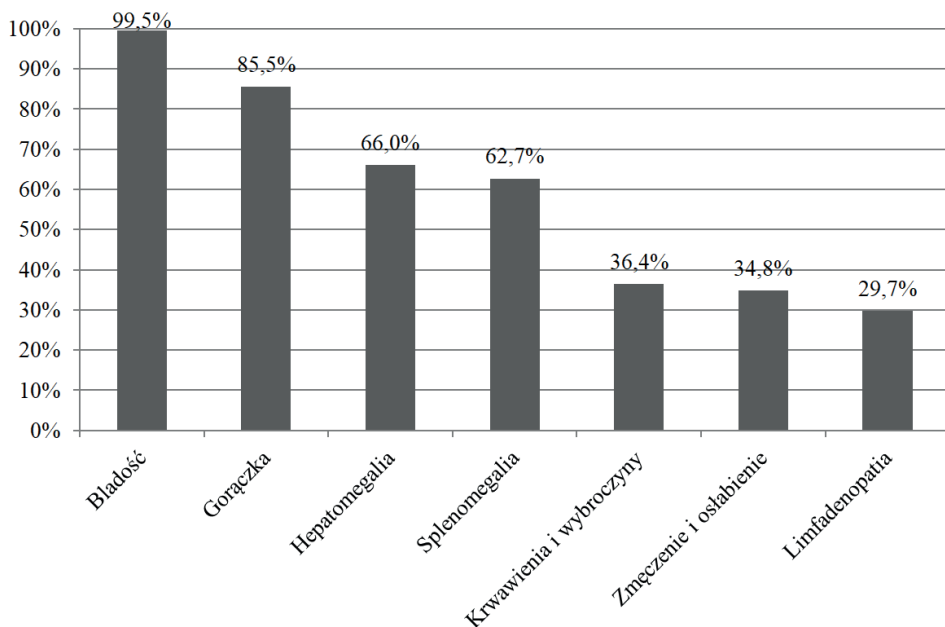
77% wszystkich białaczek u dzieci stanowi ostra białaczka limfoblastyczna (ALL) (Pesola i in. 2017). W ostrych białaczkach limfoblastycznych dochodzi do proliferacji komórek progenitorowych pochodzących z linii limfocytów B lub T – na tej podstawie określa się typ białaczki B-komórkowy lub T-komórkowy (Kawalec i in. 2018). Szczyt zachorowań na ostrą białaczkę limfoblastyczną przypada między trzecim a piątym rokiem życia, nieznacznie częściej u chłopców (55%) niż u dziewcząt (45%) (Hunger, Mullighan 2015). W prezentowanym przypadku ALL wystąpiła u dwuletniej dziewczynki. ALL u dzieci w drugim roku życia występuje z częstotliwością prawie 70 dzieci na milion na rok (Lacour i in. 2010). Większe ryzyko wystąpienia ostrej białaczki limfoblastycznej jest związane z zespołem Downa, ataksją teleangiektazją oraz niedokrwistością apla-

styczną Fanconiego (Kawalec i in. 2018). Dzięki wprowadzeniu nowych metod i schematów leczenia ALL uzyskano znaczną poprawę skuteczności leczenia. W ciągu 15 lat dziesięcioletnie przeżycie dzieci chorych na ALL wzrosło o ok. 10 punktów procentowych, osiągając ponad 80% (Nakata i in. 2018).

Wystąpienie ALL jest zwykle związane z obecnością aberracji cytogenetycznych: translokacji oraz zmiany liczby chromosomów (Bhojwani i in. 2015). Najczęściej występującymi nieprawidłowościami cytogenetycznymi w białaczkach z komórek B u dzieci są: hiperdiploidia, t(12;21)(p13;q22)(ETV6- RUNX1) oraz Ph-/ BCR- ABL1-like, zaś w białaczkach z komórek T: rearanżacje genu TAL1 (1p32), t(5;14)(q35;q32)(TLX3- BCL11B) oraz rearanżacje genu LMO2 (RBTN2) (11p13) (Cancer Cytogenetics 2016). Hipodiploidia występuje rzadko, tylko w 1% przypadków ALL (Bhojwani i in. 2015).

W wyniku niekontrolowanych podziałów komórek nowotworowych dochodzi do wyparcia ze szpiku prawidłowych komórek krwiotwórczych, co skutkuje zazwyczaj obniżonymi poziomami hemoglobiny, granulocytów oraz płytek krwi w morfologii. Na obraz kliniczny ostrych białaczek limfoblastycznych składa się: błądź, gorączka, hepatomegalia, splenomegalia, krwawienia i wybroczyny, zmęczenie i osłabienie oraz limfadenopatia (częstotliwość występowania wymienionych objawów przedstawiono na wykresie 1) (Kawalec i in. 2018).

Wykres 1 Częstość występowania objawów klinicznych u chorych na ALL.



Początkowe objawy choroby są mało charakterystyczne. Wczesne zajęcie ośrodkowego układu nerwowego występuje u ok. 1/3 niemowląt z ALL, podczas gdy u dzieci powyżej pierwszego roku życia jest bardzo rzadkie (Kajdas i in. 2013). Wczesne zajęcie OUN częściej występuje w przypadku białaczki T-komórkowej niż B-komórkowej. (Interna... 2019)

W morfologii stwierdza się zwykle anemię, małopłytkowość i granulocytopenię, zaś liczba leukocytów może być obniżona, prawidłowa bądź podwyższona. Do rozpoznania białaczki uprawnia stwierdzenie w badaniu rozmazu szpiku kostnego obecności 25% blastów białaczkowych. Badanie szpiku obejmuje również diagnostykę cytogenetyczną komórek, która ma znaczenie w ocenie rokowania; korzystnym czynnikiem rokowniczym jest obecność >50 chromosomów, zaś do niekorzystnych czynników rokowniczych zalicza się hipodiploidię, czyli <45 chromosomów, obecność translokacji t(9;22)/BCR/ABL lub t(4;11)/MLL/AF4. Pozostałymi niekorzystnymi czynnikami rokowniczymi są: zła reakcja na steroidy w ósmym dniu terapii, obecna minimalna choroba resztkowa, obecność co najmniej 25% blastów w szpiku kostnym w 15. dobie leczenia oraz brak pełnej remisji w szpiku kostnym w 33. dobie leczenia (Kawalec i in. 2018).

W leczeniu ostrych białaczek limfoblastycznych stosuje się obecnie program AIEOP-BFM ALL 2017. Przebieg leczenia zależy od grupy ryzyka określanej na podstawie występowania czynników rokowniczych oraz wieku dziecka i liczby leukocytów w momencie rozpoznania (Kawalec i in. 2018). Leczenie trwa 104 tygodnie, z czego intensywne leczenie stanowi ok. 6 miesięcy, zaś leczenie podtrzymujące remisję – około 1,5 roku (Schrappe 2017). W leczeniu stosuje się leki steroidowe, np. enkorton oraz deksametazon, i cytostatyki, np. winkrystynę, metotreksat, merkaptopurynę, cyklofosamid, cytarabinę (Schrappe 2017). Do wznowy dochodzi u 10-15% dzieci; wówczas w leczeniu nie powinno się stosować tych samych leków, które były wykorzystywane podczas pierwotnej terapii (Kawalec i in. 2018). U niektórych pacjentów z grupy wysokiego ryzyka należy zastosować przeszczep hematopoetycznych komórek macierzystych od dawcy spokrewnionego (Kawalec i in. 2018). Innymi metodami leczenia są radioterapia, immunoterapia oraz terapia celowana. W prezentowanym poniżej przypadku pacjentka była leczona według protokołu AIEOP-BFM ALL 2017, nieskutecznie. Zgon można powiązać z wysokim stopniem zaawansowania choroby w momencie rozpoczęcia leczenia.

Cel pracy

Prezentujemy przypadek dwuletniej dziewczynki przyjętej do Oddziału Klinicznego Onkologii i Hematologii Dziecięcej Wojewódzkiego Specjalistycznego

Szpitala Dziecięcego w Olsztynie ze zdiagnozowaną ostrą białaczką limfoblastyczną.

Material

W wywiadzie: nawracające gorączki, apatia, utrata łaknienia oraz zmiany krwotoczne na powłokach skórnych, objawy narastały od kilku tygodni. W dniu przyjęcia rodzice zauważyli u pacjentki obrzęk powieki oka lewego. W morfologii wykonanej miesiąc przed hospitalizacją nie stwierdzono niepokojących odchyleń. Tydzień przed przyjęciem u pacjentki wystąpiła infekcja górnych dróg oddechowych. Pacjentka leczona była Sumamedem. W badaniu przedmiotowym stwierdzono liczne podbiegnięcia krwawe na kończynach dolnych, powiększenie wątroby oraz śledziony, limfadenopatię węzłów podżuchwowych i szyjnych, a także obrzęk powieki oka lewego. W morfologii krwi obwodowej stwierdzono hiperleukocytozę ($144 \times 10^9 / l$), małopłytkowość ($44 \times 10^9 / l$) oraz obniżenie stężenia hemoglobiny (9,4 g/dl). W rozmazie mikroskopowym 99% komórek stanowiły blasty. W pozostałych badaniach stwierdzono podwyższoną aktywność LDH (2891 U/l) oraz podwyższone stężenie kwasu moczowego (6,1 mg/dl). W rozmazie szpiku kostnego obraz monotony, rozrostowy, 97% utkania stanowiły blasty o immunofenotypie ALL pre-B o wielkości średniego i dużego limfocyta. Reakcja POX w opisywanych blastach była ujemna. Na podstawie badania immunofenotypu stwierdzono ostry rozrost limfoblastyczny typu B-common. W badaniach cytogenetycznych wykonanych u pacjentki nie wykryto rearanzacji genów BCR/ABL, KMT2A, ETV6 oraz TCF3. Nie stwierdzono również delecji z grupy IKZF-1. Przeprowadzono diagnostykę choroby pozaszpikowej. Nie stwierdzono cech zajęcia śródpiersia u pacjentki. Badanie USG ujawniło hepatosplenomegalię. W badaniu okulistycznym stwierdzono obustronnie obrzęk tarczy nerwu wzrokowego oraz wyboczyny zlokalizowane na siatkówce. W badaniu MRI obecne były liczne rozsiane ogniska krwotoczne w półkulach mózgu, pniu mózgu oraz masywne nacieki tkanek miękkich obu oczodołów.

Rozpoznano ostrą białaczkę limfoblastyczną B-common z zajęciem ośrodkowego układu nerwowego. Pacjentka została zakwalifikowana do chemioterapii według schematu AIEOP-BFM ALL 2017.

W drugiej dobie hospitalizacji u pacjentki znacznie narosła leukocytoza ($719 \times 10^9 / l$). U chorej zastosowano intensywne nawadnianie z alkalizacją, podawano Rasburykazę, rozpoczęto stopniowo sterydoterapię (7,5 mg Encortonu). W godzinach wieczornych zaobserwowano zwiększoną senność u dziecka. W kolejnej dobie u dziewczynki narastały objawy zaburzenia świadomości, aż do

całkowitego braku kontaktu z zachowaną reakcją na ból. W kolejnej dobie kontynuowano leczenie (7,5 mg Encortonu, Rasburykaza, intensywne nawadnianie z alkalizacją). W kontrolnej morfologii krwi stwierdzono obniżenie liczby leukocytów. Zgodnie z protokołem leczniczym wykonano punkcję łądźwiową z dokanałowym podaniem Methotrexatu. Pobrano płyn mózgowo-rdzeniowy w celach diagnostycznych. W płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdzono podwyższoną cytozę z obecnością świeżych erytrocytów.

W trzeciej dobie zaobserwowano u pacjentki incydenty prężeń kończyn, a następnie całego ciała. Zastosowano u pacjentki mannitol celem zmniejszenia ciśnienia wewnątrzczaszkowego i leczenia obrzęku mózgu wywołanego krwotokami śródmózgowymi.

W czwartej dobie zaobserwowano u dziecka asymetrię twarzy z zezem zbieżnym oka lewego, asymetrię źrenic, a incydenty prężeń uległy nasileniu. W badaniu przedmiotowym objaw Babińskiego był obustronnie dodatni. W wykonanym kontrolnie MRI głowy znacznie zwiększyła się liczba oraz wielkość ognisk krwotocznych, największa zmiana krwotoczna została zaobserwowana w płacie skroniowym, o wymiarach 34x25 mm. W związku z drastycznie pogarszającym się stanem pacjentki z towarzyszącymi spadkami saturacji zdecydowano o przeniesieniu jej na Oddział Intensywnej Terapii.

Podczas pobytu pacjentki na Oddziale Intensywnej Terapii jej stan nadal ulegał pogorszeniu. Dziecko zostało zaintubowane, zastosowano analgezację, prowadzono oddech kontrolowany, monitorowanie ciągłe parametrów życiowych, leczenie przeciwobrzękowe mózgu, osmoterapię, utrzymywano stabilizację krążenia oraz regulację gospodarki wodno-elektrolitowej. Pacjentka nadal była leczona według schematu AIEOP-BFM ALL 2017. W badaniach diagnostycznych stwierdzono głębokie zaburzenia elektrolitowe, hiperglikemię, wzrost parametrów nerkowych, małopłytkowość, leukopenię, obniżoną liczbę erytrocytów. Pomimo zastosowania leczenia w siódmej dobie od przyjęcia pacjentki zaobserwowano pogorszenie stanu klinicznego i hemodynamicznego dziecka. Zlecona została konsultacja neurologiczna. W badaniu stwierdzono całkowitą arefleksję, brak odruchów neurologicznych. W kontrolnym badaniu obrazowym głowy wykryto znaczne powiększenie ognisk krwotocznych, masywny obrzęk mózgu oraz wgłobienie migdałków mózdzku do otworu wielkiego. Po poinformowaniu rodziców o złym rokowaniu podjęto decyzję o odstąpieniu od uporczywej terapii u pacjentki z dalszym podawaniem leków przeciwbólowych oraz nawadnianiem dożylnym. W 16 dobie pobytu w szpitalu stwierdzono zgon pacjentki.

Wyniki i dyskusja

Najczęstszymi objawami ostrych białaczek limfoblastycznych są: bladość, gorączka, hepatomegalia i splenomegalia, które występują u ponad 50% pacjentów pediatrycznych. Do rzadszych objawów należą: krwawienia i wybroczyny, zmęczenie i osłabienie oraz powiększenie węzłów chłonnych (Pediatría I. 2018). U omawianej pacjentki występowały: nawracające gorączki, apatia, utrata łaknienia i zmiany krwotoczne na powłokach skórnych, obrzęk powieki, powiększenie wątroby i śledziony oraz limfadenopatia. Oprócz tego w morfologii stwierdzono podwyższone stężenie leukocytów, małopłytkowość i obniżone stężenie hemoglobiny. Taki obraz kliniczny pacjenta zawsze powinien nasuwać podejrzenie ostrej białaczki limfoblastycznej, dlatego też niezwłocznie została podjęta diagnostyka w tym kierunku. Badania naukowe podkreślają, że czujność lekarza pediatry, obraz kliniczny pacjenta i wyniki morfologii krwi mają większe znaczenie w wykrywaniu ostrej białaczki limfoblastycznej niż skomplikowane badania laboratoryjne (Bernbeck i in. 2009).

Wczesne postawienie diagnozy choroby nowotworowej wiąże się z większą szansą wyleczenia. O zaawansowaniu choroby u prezentowanej przez nas pacjentki może świadczyć mnogość objawów klinicznych, bardzo wysoka ilość krwinek białych oraz zajęcie OUN. Pacjentka miała miesiąc wcześniej wykonaną morfologię, która nie wykazała żadnych odchyleń od normy, co mogło uspić czujność onkologiczną lekarza prowadzącego. Tydzień wcześniej była leczona z powodu infekcji górnych dróg oddechowych. Choroby rozrostowe układu krwiotwórczego u dzieci mogą występować pod postacią tzw. masek nowotworowych, co stanowi znaczącą trudność diagnostyczną. Wyróżnia się m.in. maskę aplastyczną, reumatyczną, małopłytkową i infekcyjną (Niedźwiecki i in. 2009). Objawy prezentowane przez pacjentkę, które narastały od kilku tygodni, przybrały obraz maski infekcyjnej; w infekcji często występuje gorączka, powiększenie węzłów chłonnych oraz uczucie zmęczenia. Za rozpoznaniem infekcji przemawiało również niedawne rozpoczęcie przez pacjentkę uczęszczania do żłobka. Jest to okres, w którym pierwszy kontakt z dużą grupą osób wystawia układ odpornościowy pacjenta na próbę, a infekcje są szczególnie częste.

Wczesne zajęcie OUN w białaczce występuje stosunkowo rzadko i jest niekorzystnym czynnikiem rokowniczym. Częściej obecność białaczki w ośrodkowym układzie nerwowym jest wynikiem wznowy niż pierwotnej choroby tego układu. Nasza pacjentka prezentowała znacznie zaawansowane objawy zajęcia OUN pomimo faktu, iż badania morfologii krwi wykonane miesiąc wcześniej były prawidłowe. Zazwyczaj białaczka OUN klinicznie wykazuje objawy zwiększonego ciśnienia wewnątrzczaszkowego, takie jak: nudności, wymioty, bóle głowy, obrzęk tarczy nerwu wzrokowego, senność, sztywność

karku, drażliwość, drgawki i śpiączka. Wszystkie wymienione objawy występowały u pacjentki (Bleyer 1988; Jin i in. 2018).

Pomimo znacznej poprawy skuteczności leczenia ALL u dzieci (pięcioletnie przeżycie w latach 1980-1984 wynosiło 67%, obecnie >90%) uwarunkowanej rozwojem metod diagnostycznych oraz wprowadzeniem nowoczesnych schematów terapii, takich jak protokół AIEOP-BFM-ALL 2017 zastosowany w leczeniu naszej pacjentki, nadal na skuteczność terapii ma wpływ czas od wystąpienia objawów do postawienia diagnozy oraz związany z tym stopień zaawansowania klinicznego schorzenia w momencie rozpoczęcia leczenia. W przypadku naszej pacjentki stan chorobowy w momencie rozpoznania był już bardzo zaawansowany z dodatkowym występowaniem znacznie nasilonych, niekorzystnych rokowniczo objawów spowodowanych zajęciem ośrodkowego układu nerwowego. Pomimo zastosowania intensywnego leczenia u dziewczynki już w drugiej dobie hospitalizacji, jej choroba była tak zaawansowana, że terapia nie okazała się skuteczna (Stiller, Eatock 1999; Interna... 2019).

Badania laboratoryjne służące do wczesnego potwierdzenia lub wykluczenia choroby nowotworowej to morfologia krwi oraz rozmaz mikroskopowy krwi. Najbardziej przydatnym badaniem diagnostycznym w rozpoznaniu choroby jest wykonanie rozmazu szpiku kostnego i wykrycie w nim ponad 25% komórek blastycznych. W rozmazie szpiku kostnego naszej pacjentki wykryto obecność aż 97% blastów, co wskazuje na bardzo szybki postęp choroby (Interna... 2019).

Badania obrazowe, które są najbardziej przydatne w wykrywaniu ognisk choroby w układzie nerwowym, to tomografia komputerowa oraz rezonans magnetyczny. Badania te pozwalają jak najlepiej uwidocznić tkankę mózgową i zlokalizować ogniska krwawień śródmózgowych, następczy obrzęk tkanki mózgowej wokół krwawienia oraz inne charakterystyczne objawy zwiększonego ciśnienia wewnątrzczaszkowego. Rezonans magnetyczny jest bardziej specyficzny przy wykrywaniu zmian w obrębie OUN, dlatego też był on metodą z wyboru w wykrywaniu zmian mózgowych u naszej pacjentki. Badania MRI wykonywane systematycznie podczas pobytu pacjentki na oddziale wykazały stopniowe zwiększanie się wymiarów ognisk krwotocznych oraz zwiększanie się ich liczby, co wskazuje, że badanie to umożliwia ocenę zaawansowania klinicznego choroby, a także określenie szybkości, z jaką choroba się rozwija (Liu i in. 2017).

Zazwyczaj pierwszym etapem transformacji komórek w ostrych białaczkach limfoblastycznych z komórek B jest translokacja chromosomowa, w wyniku której powstaje gen fuzyjny, którego aktywność jest zmieniona w porównaniu do prawidłowego genu. Geny te mogą wykazywać aktywność na różnych poziomach, np. zakłócać transkrypcję lub aktywować szlaki sygnałowe promujące

onkogenezę. Proces transformacji jest przyspieszany przez inne mutacje, które odpowiadają m.in. za hamowanie apoptozy oraz indukcję podziałów i proliferacji komórek (Malouf, Ottersbach 2018). W prezentowanym przypadku w badaniach cytogenetycznych nie wykryto rearanżacji genów. Jako że rutynowo wykonywane badania cytogenetyczne mogą nie wykazać żadnych odchyłeń od normy, postawienie rozpoznania ostrej białaczki limfoblastycznej opiera się na podstawie badania rozmazu szpiku kostnego.

Znaczenie badań cytogenetycznych jest istotne w ocenie klinicznej grupy ryzyka pacjenta, co ma wpływ na schemat leczenia, który powinien być zastosowany. Dzięki licznym badaniom udało się ustalić znaczenie rokownicze konkretnych mutacji genowych. W ostrej białaczce limfoblastycznej z komórek B odchyleniami cytogenetycznymi rokującymi korzystnie są: hiperdiploidia i ETV6-RUNX1. Hipodiploidia, mutacje BCR-ABL1, BCR-ABL1-like, TCF3-HLF oraz rearanżacje genu MLL rokuja niekorzystnie. Pośrednie znaczenie rokownicze mają m.in. mutacje TCF3-PBX1 i rearanżacje genów IGH oraz MYC. Wciąż wpływ niektórych mutacji na przebieg ostrej białaczki limfoblastycznej typu B nie został zbadany, jest to zjawisko, którym mogą zająć się przyszłe badania (Cancer Cytogenetics 2016). U przedstawianej przez nas pacjentki nie stwierdzono rearanżacji BCR/ABL, KMT2A, ETV6 oraz TCF3 ani delecji z grupy IKZF-1. Kariotyp w prezentowanym przypadku był prawidłowy (46, XX), tak jak u ok. 75% dzieci z ostrą białaczką limfoblastyczną z prekursorów limfocytu B (Derwich, Zajac-Spychała 2012).

Pomimo faktu, że ALL jest najczęstszym rodzajem białaczki występującym u dzieci i dostępne są skuteczne schematy leczenia tej choroby, to nadal w przypadkach, gdy pojawienie się objawów klinicznych jest opóźnione z powodu występowania masek nowotworowych, zastosowane leczenie może nie przynieść pozytywnych rezultatów. Im wyższy jest stopień zaawansowania choroby w momencie rozpoznania, tym gorsze jest rokowanie. Wczesne zajęcie OUN w przebiegu ostrej białaczki limfoblastycznej występuje rzadko, lecz jest objawem niekorzystnym rokowniczo. W przypadku tak zaawansowanych zmian krwotocznych w mózgu, jak u naszej pacjentki, ryzyko zgonu jest wysokie.

Literatura:

- Bernbeck B., Wüller D., Janssen G., Wessalowski R., Göbel U., Schneider D. T. 2009. Symptoms of childhood acute lymphoblastic leukemia: red flags to recognize leukemia in daily practice. *Klinische Pädiatrie*, 221(06): 369-373.

- Bhojwani D., Yang J. J., Pui C. H. 2015. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics*, 62(1): 47-60.
- Bleyer W. A. 1988. Central nervous system leukemia. *Pediatric Clinics of North America*, 35(4): 789-814.
- Derwich K., Zając-Spychała O. 2012. Zaburzenia genetyczne w ostrej białacze limfoblastycznej u dzieci i ich wykorzystanie w praktyce klinicznej. *Hematologia*, 3(3): 221-230.
- Hunger S. P., Mullighan C. G. 2015. Acute lymphoblastic leukemia in children. *New Eng. J. Med.*, 373(16): 1541-1552.
- Jin M. W., Xu S. M., An Q. 2018. Central nervous disease in pediatric patients during acute lymphoblastic leukemia (ALL): a review. *European review for medical and pharmacological sciences*, 22(18): 6015-6019.
- Kaatsch P., Spix C. 2006. Annual Report 2005 (1980–2004): German Childhood Cancer Registry. Mainz: Deutsches Kinderkrebsregister.
- Kajdas L., Sędek Ł., Karpe J., Balwierz W., Ćwiklińska M., Drabko K., Wysocki M. 2013. Charakterystyka kliniczna, immunofenotypowa i genetyczna ostrej białaczki limfoblastycznej u niemowląt. *Postępy Nauk Med.*, 26(9).
- Kawalec W., Grenda R., Kulus M. 2018. *Pediatrics I. PZWL*, Warszawa, s. 640-644.
- Lacour B., Guyot-Goubin A., Guissou S., Bellec S., Désandes E., Clavel J. 2010. Incidence of childhood cancer in France: national children cancer registries, 2000–2004. *Eur. J. Cancer Prev.*, 19(3): 173-181.
- Li J., Thompson T. D., Miller J. W., Pollack L. A., Stewart S. L. 2008. Cancer incidence among children and adolescents in the United States, 2001–2003. *Pediatrics*, 121(6): e1470-e1477.
- Liu J., Wang Y., Sun X., Liu S., Yu Z., Ji N., ... Liu, Y. 2017. Lesions of the central nervous system in leukemia: Pathological and magnetic resonance imaging features at presentation in 14 patients. *Oncology letters*, 14(6): 8162-8170.
- Malouf C., Ottersbach K. 2018. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cellular and molecular life sciences*, 75(3): 417-446.
- Michel G., Von Der Weid N. X., Zwahlen M., Redmond S., Strippoli M. P., Kuehni C. E., Swiss Paediatric Oncology Group (SPOG). 2008. Incidence of childhood cancer in Switzerland: The Swiss childhood cancer registry. *Pediatric blood & cancer*, 50(1): 46-51.
- Nakata K., Ito Y., Magadi W., Bonaventure A., Stiller C. A., Katanoda K., Racht B. 2018. Childhood cancer incidence and survival in Japan and England: A population-based study (1993-2010). *Cancer Sci.*, 109(2): 422-434.
- Niedźwiecki M., Płoszyńska A., Maciejka-Kapuścińska L., Balcerska A. 2009. Małki kliniczne chorób rozrostowych układu krwiotwórczego u dzieci-prezentacja przypadków. In *Forum Medycyny Rodzinnej*, 3(2): 143-153.

- Pesola F., Ferlay J., Sasieni P. 2017. Cancer incidence in English children, adolescents and young people: past trends and projections to 2030. *British Journal of Cancer*, 117(12): 1865-1873.
- Schrapppe M. 2017. Treatment Protocol for Children and Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia-AIEOP-BFM ALL.
- Stiller C. A., Eatock E. M. 1999. Patterns of care and survival for children with acute lymphoblastic leukaemia diagnosed between 1980 and 1994. *Archives of disease in childhood*, 81(3): 202-208.
- Szczeklik A. 2019. *Interna Szczeklika 2019. Medycyna Praktyczna, Kraków.*
- Wan Thomas S. K. 2016. *Cancer Cytogenetics. Humana Press Inc., New York, s. 257-278.*
- Ward E., DeSantis C., Robbins A., Kohler B., Jemal A. 2014. Childhood and adolescent cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*, 64(2): 83-103.

ABSTRACT

ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA (ALL) WITH EARLY CNS DISEASE IN 2-YEAR-OLD PATIENT: A CASE REPORT

ALL is the most common malignancy in children. (Ward i in. 2014) The clinical picture includes pallor, fever, hepatosplenomegaly, hemorrhages and ecchymosis, fatigue, weakness and lymphadenopathy. (Pediatria I. 2018)

We present the case of 2-year-old girl admitted to the Clinical Department of Pediatrics Oncology and Hematology at WSSD in Olsztyn. The patient presented typical ALL symptoms. ALL B-common with CNS disease was diagnosed and treatment according to AIEOP-BFM-ALL 2017 scheme was started. The patient died about 2 weeks after being admitted to hospital.

Early diagnosis of leukemia in children determines good prognosis. Main difficulty during diagnosis of leukemia is the fact that this disease can be manifested by so-called cancer masks. In our case the girl presented with infectious mask. The patient's death was associated with the high stage of the disease at the time of diagnosis.

Słowa kluczowe: ALL, ostra białaczka limfoblastyczna, pediatria

Keywords: ALL, acute lymphoblastic leukemia, pediatrics

Dane do kontaktu z autorem:

Maria Derkaczew: m.derkaczew@gmail.com

Ewelina Joniec: ewelina.joniec@gmail.com

Michał Gola, Hanna Snarska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Lekarski

Studenckie Koło Patomorfologiczne

Opiekun: lek. Magdalena Misiukiewicz-Poć

EGZOGENNE LIPIDOWE ZAPALENIE PŁUC – TRUDNOŚCI DIAGNOSTYCZNE. OPIS PRZYPADKU

Wstęp

Egzogenne lipidowe zapalenie płuc (ELZP) jest nieczęsto opisywaną jednostką chorobową, spowodowaną aspiracją produktów zawierających lipidy. Pierwsze doniesienia dotyczące ELZP pochodzą z lat dwudziestych XX wieku (Laughlen 1925), a przez lata publikacje opisów przypadków klinicznych ukazywały kolejne produkty, których używanie mogłoby doprowadzić do rozwinięcia tej choroby. Choć prognozowano spadek częstości zachorowań na ELZP w przyszłości, to pojawienie się doniesień łączących palenie e-papierosów czy też stosowanie marihuany z możliwością rozwinięcia obrazu odpowiadającego tej jednostce może odwrócić ten trend (He i in. 2017; Dicipinigitis i in. 2020). W konsekwencji ELZP prawdopodobnie stanie się schorzeniem bardziej powszechnym, a zatem istnieje potrzeba opracowania optymalnych schematów diagnostycznych oraz leczniczych dla tej choroby.

Cel

Celem artykułu jest zebranie informacji dotyczących ELZP oraz opisanie przypadku pacjenta chorującego na tę jednostkę. Zrozumienie patofizjologii tej choroby powinno ułatwić odróżnianie ELZP od innych form zapaleń płuc. Należy mieć na uwadze istotę występowania ELZP u palaczy e-papierosów, które może wzrosnąć wraz ze wzrostem zainteresowania tą formą palenia. Praca zawiera podsumowanie diagnostyki różnicowej w kierunku ELZP.

Material i metody

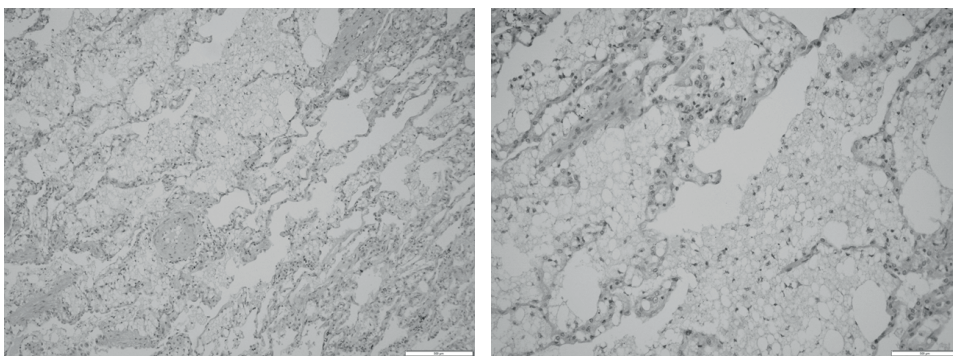
66-letni mężczyzna, zajmujący się rolnictwem, mechaniką samochodową, hodowca gołębi, kur, kaczek i gęsi, zgłosił się do szpitala powiatowego w Ostródzie w związku z nagłą dusznością poprzedzoną bólem w lewej części klatki piersiowej, który wystąpił podczas oglądania telewizji w spoczynku. Duszność miała charakter ciągły i nie ustępowała. Pacjent z historią palenia 30 paczkolet, od 12 lat jednak niepalący, negujący wszelkie alergię oraz przebycie w przeszłości gruźlicy. W wywiadzie wykazano nadciśnienie, hipercholesterolemię oraz zwyrodnienie kręgosłupa szyjnego. Pacjent w badaniu przedmiotowym normotensyjny, bez obrzęków, ze stanem podgorączkowym, bez duszności w stanie spoczynku. Osłuchowo stwierdzono brak szmeru pęcherzykowego nad płucem lewym, nad płucem prawym szmer pęcherzykowy, z trzeszczeniami nad podstawą płuca prawego. W badaniach laboratoryjnych leukocytoza zwiększona do 12,74 tys/ul, a białko C-reaktywne (CRP) na poziomie 90, 3 mg/l; inne badania laboratoryjne, razem z EKG, w normie. Rentgenogram (RTG) klatki piersiowej uwidocznił znaczną komorę odmową płuca lewego, której przypadstawa szerokość wynosiła 2,25 cm, a w szczycie – maksymalna jej szerokość – 13,7 cm. Kontrolne RTG klatki piersiowej po zastosowaniu drenażu ssącego przedstawiało odmě, której maksymalna szerokość w lewym płucu wynosiła 1,5 cm.

Tomografia komputerowa (TK) klatki piersiowej prezentowała rozległe obszary matowej szyby w podstawnych częściach dolnych płatów płuc, których brak było w okolicach szczytowych i podszczytowych górnych płatów płuc. W związku z nawracającymi dusznościami, odmě oraz zmianami śródmiąższowymi pacjenta skierowano na oddział chirurgii klatki piersiowej, gdzie wykonano mu wideoskopię lewostronną, podczas której dokonano resekcji klinowej szczytu płuca lewego oraz pobrano fragment płata dolnego płuca lewego. Przeprowadzono również pleurektomię torakoskopową oraz uzyskano wymaz z jamy opłucnowej – posiew zarówno tlenowy, jak i bez-tlenowy wyszedł ujemny. W badaniu histopatologicznym fragmentu dolnego płata płuca lewego zaobserwowano bardzo liczne makrofagi z kroplami tłuszczu wypełniającymi ich cytoplazmę (CD68 (+), S100 (-), CK Pan (-)) w świetle pęcherzyków płucnych oraz w przegrodach międzypęcherzykowych. Po uszczegółowieniu wywiadu pacjent przyznał się do wielokrotnej aspiracji oleju napędowego i benzyny oraz do stosowania przeczyszczających środków na zaparcia, których głównym składnikiem była parafina. Na podstawie wywiadu oraz wyżej wymienionych badań postawiono diagnozę: egzogenne lipidowe zapalenie płuc.

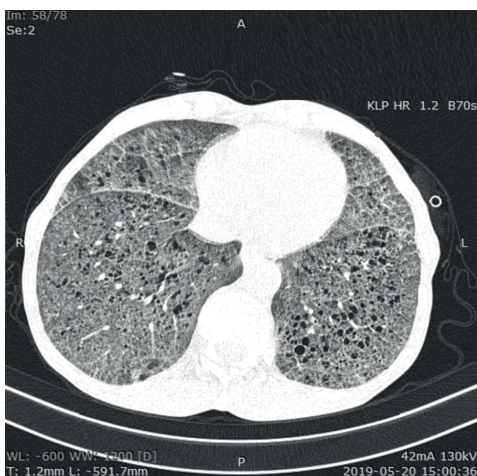
Rycina 1. i Rycina 2. Badanie histopatologiczne wycinka lewego płuca wykonane w Zakładzie Patomorfologii Wojewódzkiego Szpitala Specjalistycznego w Olsztynie: fragment płata z obecnością w świetle pęcherzyków płucnych oraz w przegrodach międzypęcherzykowych bardzo licznych makrofagów z kroplami tłuszczu wypełniającymi ich cytoplazmę, bez cech włóknienia.

Rycina 1

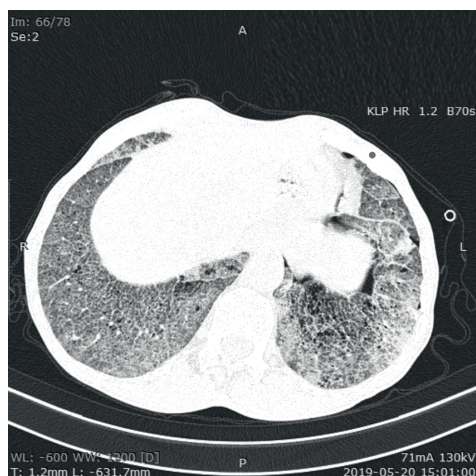
Rycina 2



Rycina 3. i Rycina 4. TK klatki piersiowej ze szpitala powiatowego w Ostródzie – rozległe obszary matowej szyby z bronchogramem powietrznym w tle w obu płucach, ogniska rozedmy w obu płucach, bardziej skonsolidowane nacieczenia są widoczne u podstawy płatów dolnych.



Rycina 3



Rycina 4

Wyniki badań

Wprowadzając słowa kluczowe *exogenous lipid pneumonia* do wyszukiwarki anglojęzycznej PubMed, 26 marca 2020 roku dokonaliśmy przeglądu literatury. Na łączną liczbę rezultatów złożyły się 172 artykuły, spośród których 108 stanowiło opisy przypadków. W części publikacji autorzy, oprócz postaci endogennej oraz egzogennej, dodatkowo wyróżnili postać idiopatyczną (Venkatnarayan i in. 2014; Rana i in. 2020). Co ciekawe, ELZP nie jest zarezerwowane tylko dla gatunku ludzkiego, bowiem odnotowano występowanie tej jednostki chorobowej również u kotów, psów, koni czy też krów, a także u żako (Jones i in. 2000; Carminato i in. 2011; Scarratt i in. 1998; Smith i in. 1969; Costa i in. 2013).

Dyskusja

Egzogenne lipidowe zapalenie płuc jest rzadką chorobą płuc, w której dochodzi do kumulacji cząsteczek lipidowych w makrofagach obecnych wewnątrz pęcherzyków płucnych. Pomimo braku precyzyjnych danych dotyczących występowania tego schorzenia u ogółu populacji, pewne badania autopsyjne sugerują, że problem lipidowych zapaleń płuc może dotyczyć nawet 1,0-2,5 % populacji (Baron i in. 2003).

W zależności od sposobu pojawienia się lipidów w pęcherzykach płucnych, wyróżniamy dwie postaci lipidowego zapalenia płuc: endogenną oraz egzogenną. W postaci endogennej cząsteczki tłuszczu docierają do płuc z surowicy krwi, podczas gdy w wariacie egzogennym dochodzi do aspiracji bądź inhalacji produktów, których składową są lipidy. W innym podziale wyróżnia się postać ostrą oraz przewlekłą, wtedy czynnikiem determinującym jest rozmiar zniszczeń tkanki płucnej oraz czas ekspozycji na substancje zawierające lipidy (Baron i in. 2003).

Opis przypadku naszego pacjenta przedstawia typową problematykę diagnostyczną. Najistotniejszym elementem procesu diagnostycznego jest szczegółowy wywiad z pacjentem, dotyczący zażywania środków, które mogą przyczyniać się do powstawania ELZP. Duszności oraz zmiany w RTG są charakterystyczne dla chorób płuc, jednak nie dają wskazówki do rozpoznania ELZP. Biopsja tkanki śródmiąższowej płuc wydaje się być jedynym i definitywnym procesem diagnostycznym potwierdzającym ELZP. Wyjątkowo istotnym aspektem w przypadku procesu diagnostycznego powinna być szczegółowa wiedza lekarzy, którzy powinni znać produkty mogące przyczyniać się do rozwinięcia ELZP. Wywiad przeprowadzony z naciskiem na historię zażywania takich produktów, jak parafina lub oleje, na przeczyszczenie, jak i e-papierosy może usprawnić

proces diagnostyczny oraz uchronić pacjenta i lekarza przed postawieniem błędnej diagnozy.

Występowanie ELZP u człowieka zostało po raz pierwszy opisane w 1925 roku przez Laughlena. Opisał on obecność kropelek tłuszczu w płucnych materiałach autopsyjnych trojga dzieci i jednego dorosłego, którzy używali kropeł do nosa zawierających olej mineralny albo środka przeczyszczającego w postaci parafiny. Zauważył też w preparatach płucnych obecność specyficznych komórek zawierających inkluzje lipidowe, które nazwał śródbłonkowymi leukocytami i dostrzegł podobieństwo pomiędzy tymi komórkami, które występują też w pylicy węglowej oraz w innych schorzeniach, gdy dochodzi do obładowania makrofagów pyłem. Co więcej, w swoich eksperymentach na królikach udowodnił, że przy podawaniu oleju mineralnego do gardła czy tchawicy u zwierząt rozwija się obraz odpowiadający ELZP, podobny do tego obserwowanego u ludzi. Dwa lata później Pinkerton odnotował kolejnych sześć przypadków zapalenia płuc wśród niemowląt oraz dzieci spowodowanych przez olej mineralny, tran z dorsza, tłuszcz mleczny czy też żółtko jaj. W swoich eksperymentach na modelu zwierzęcym ukazał, że odpowiedź patofizjologiczna na spożyte tłuszcze dotycząca płuc może być zależna od źródła substancji – pochodzenie tłuszczów podzielił w swej pracy na roślinne, zwierzęce oraz mineralne. W 1935 roku Graef zasugerował mechanizm, w którym oleje mineralne przedostają się do płuc. Oleje mineralne oraz podobne substancje nie podrażniają błony śluzowej gardła; a zatem nie powodują odruchu wymiotnego. W odróżnieniu od tłuszczów zwierzęcych, które wywołują reakcję zapalną, oleje mineralne są względnie bierne oraz nie mogą być metabolizowane przez enzymy tkankowe (Baron i in. 2003). Są one emulsyfikowane oraz pochłaniane przez makrofagi. Po kilku miesiącach komórki olbrzymie oraz zwłóknienie tworzą się wokół dużych ilości oleju, które najwyraźniej rozwijają się z kropelek tłuszczu wyzwolonych z komórek fagocytujących – makrofagów (Baron i in. 2003; Schwartz, King 2003). Uważa się, że oleje roślinne powodują znikomą reakcję i są zwykle usuwane z płuc, głównie przez odkrztuszanie (Spickard, Hirschmann 1994; Wright, Jeffrey 1990). Wraz ze spadkiem użycia mineralnych oraz zwierzęcych olejów zaobserwowano powiązane z tym zjawiskiem zmniejszenie częstości występowania lipidowych zapaleń płuc. Niestety w niektórych częściach globu ELZP występuje relatywnie częściej, co jest związane z tradycyjnym oraz kulturowym wykorzystaniem substancji na bazie oleju, wtedy wraz z ich użyciem wzrasta prawdopodobieństwo ich aspiracji do płuc (Annobil i in. 1995).

ELZP spowodowane jest aspiracją tłuszczów pochodzenia zwierzęcego, roślinnego oraz lipidów sztucznych. Wraz z wiekiem zmieniają się czynniki ryzyka, które mogą powodować ELZP. U dzieci jedną z przyczyn są niepra-

widłowe oddychanie i przetykanie, najczęściej spowodowane nieprawidłowościami w rozwoju neurologicznym oraz anomaliami anatomicznymi (Hugosson i in. 1991; Ridaura-Sanz i in. 2006; Papla i in. 2011). Wraz z występującym ELZP może dojść do koinfekcji między innymi: *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium smegmatis* oraz *Mycobacterium abscessus*, koronawirusem oraz różnymi innymi bakteriami, wirusami i grzybami (Subramanian i in. 1982; Ridaura-Sanz i in. 2006; Marangu i in. 2018).

Przypadkowe spożycie balsamu i oliwki do ciała oraz spożywanie pokarmów w pozycji na wznak są jednymi z głównych przyczyn ELZP u dzieci (Marangu i in. 2020). Ostre ELZP u dzieci najczęściej spowodowane jest przypadkowym zatruciem benzyną. Przewlekłe ELZP występuje u nieletnich z predyspozycją do aspiracji, czyli między innymi zaburzeniami rozwojowymi oraz z rozszczepem podniebienia (Betancourt i in. 2010). Stosowanie przez rodziców lipidowych produktów mających na celu ułatwienie karmienia jest również jedną z przyczyn egzogenego lipidowego zapalenia płuc (Annobil i in. 1995). W większości przypadków występowania tej choroby aspiracja produktów oleistych była wielorazowa. ELZP u dorosłych najczęściej ma postać przewlekłą i spowodowane jest regularnym stosowaniem parafinowych środków przeczyszczających oraz stosowaniem kropli do nosa na bazie tłuszczów (Spickard, Hirschmann 1994). Innymi substancjami będącymi częstym powodem do rozwinięcia się ELZP są: olej mineralny, olej z wątroby ryb, tłuste mleko, żółtko jaja, nafta, mieszanka benzynowa, smary przemysłowe, oliwa, masło bawole (Krychniak-Soszka i in. 2005; Guo i in. 2019). Choroba ta może być także wynikiem zawodowej ekspozycji na mieszanki olejowe przy produkcji stali i mebli, w lotnictwie, oraz – niezawodowej – u połykaczy ognia, u osób używających pomadek lub błyszczaków do ust, u stosujących substancje w aerozolu do smarowania stawów lub używających lakieru do włosów (Becton i in. 1984; Kitchen i in. 2008; Shaikh, Oliveira 2014). Palacze tytoniu, którzy mieszają go z tłustymi substancjami, których przykładem jest melasa owocowa, są również narażeni na ELZP. Jednym z uprzednio nieznanych powodów ELZP jest palenie e-papierosów oraz stosowanie marihuany (He i in. 2017; Viswam i in. 2018; Davidson i in. 2019; Dicipinigaitis i in. 2020). Okazało się bowiem, że zatwierdzony przez FDA glikol propylenowy jako bezpieczny do spożycia może powodować uszkodzenie płuc w przypadku wdychania go pod wpływem podwyższonej temperatury. Niestety brak jest wystarczającej ilości badań, aby dokładnie określić ryzyko, jakie niesie ze sobą stosowanie e-papierosów.

Patofizjologia ELZP nie jest w pełni zrozumiała. W zależności od pochodzenia materiału lipidowego – tłuszcze podzielono na te pochodzenia zwierzęcego, roślinnego i mineralnego – uważa się, że reakcja organizmu może być róż-

na. Dla człowieka najmniej groźne wydają się być w tym przypadku lipidy roślinne, zawarte między innymi w oliwie z oliwek, oleju sezamowym czy też oleju makowym, gdyż wywołują one znikomą reakcję ze strony organizmu, a także są usuwane z płuc poprzez odkrztuszanie (Spickard, Hirschmann 1994; Wright, Jeffrey 1990; Furuya i in. 2000). Tłuszcze pochodzenia zwierzęcego natomiast indukują powstanie aktywnego stanu zapalnego (Annobil i in. 1995), podczas gdy lipidy mineralne są względnie bierne, a po przedostaniu się do pęcherzyków płucnych zostają zfagocytowane przez makrofagi (Krychniak-Soszka i in. 2005). Lipidy mogą dostać się do płuc z surowicy krwi (postać endogenna) bądź poprzez aspirację czy inhalację produktów, których składową są lipidy (postać endogenna). Co ciekawe, tłuszcze unoszące się na powierzchni soków żołądkowych mogą dostać się do dróg oddechowych w odruchu regurgitacji, a następnie aspiracji treści pokarmowej do tchawicy (Marangu i in. 2020). Jak już zostało wspomniane, część lipidów jest usuwana z płuc przy pomocy odruchu kaszlu, jednakże przeważająca ich część jest niema oraz niedrażniąca, a co z tym związane – nie wywołuje tego odruchu. A zatem cząsteczki te, przedostając się do dolnych dróg oddechowych, hamują klirens śluzowo-rzęskowy, co implikuje zahamowanie pozbywania się znacznej części lipidów z dróg oddechowych. Zdeponowane lipidy nie mogą być zmetabolizowane z powodu braku odpowiednich enzymów u ludzi, jednakże dochodzi do ich emulgacji oraz w konsekwencji pochłonięcia przez makrofagi w pęcherzykach płucnych, gdzie mogą one pozostawać przez długi czas wewnątrzkomórkowo. W odpowiednim czasie może dojść do uwolnienia lipidów zdeponowanych w tychże makrofagach, inicjacji stanu zapalnego wraz z jednoczesową akumulacją aktywowanych makrofagów, które łącząc się, formują wielojądrowe komórki olbrzymie. W konsekwencji prowadzi to do włóknienia śródmiąższu płuc oraz zaburzeń obejmujących pęcherzyki płucne oraz oskrzela (Venkatnarayan i in. 2014).

Duszność oraz kaszel to najczęściej spotykane objawy ELZP. Krwioplucie, gorączka, ból w klatce piersiowej, utrata wagi, przyspieszony oddech, hipoksja, palce pałeczkowate to rzadsze objawy egzogenne lipidowe zapalenie płuc, które występują zarówno u dzieci, jak i u dorosłych (Soczek 2004; Ridaura-Sanz i in. 2006). Wyniki badań krwi zwykle znajdują się w przedziale wartości referencyjnych, czasami występuje leukocytoza oraz wzrost OB (Soczek 2004). Spirometria może wskazywać na chorobę restrykcyjną płuc lub nie wykazywać odchyień od normy (Krychniak-Soszka i in. 2005). RTG klatki piersiowej oraz tomografia komputerowa to zwykle pierwsze narzędzia diagnostyczne, które po przeprowadzeniu prawidłowego wywiadu mogą wskazywać ELZP. Potwierdzeniem diagnozy powinno być badanie histopatologiczne traktowane jako

ostateczne potwierdzenie. Zmiany radiologiczne typowe dla ELZP to obszary matowej szyby zlokalizowane głównie w dolnej części płuc (Schwartz, King 2003; Baron i in. 2003). Miąższowe zagęszczenia z bronchogramem powietrznym są również charakterystycznymi zmianami w przypadku ELZP (Furuya i in. 2000). W badaniu tomografii komputerowej wysokiej rozdzielczości (high resolution computer tomography – HRCT) w przypadku przewlekłego ELZP dostrzec można rozległe nacieki w płucach, których brak jest jednak w postaciach ostrych tego schorzenia. Większość przypadków przewlekłych prezentuje włóknienie oraz rozstrzenie oskrzeli, które są rzadko spotykane w postaci ostrej. Obraz radiologiczny klatki piersiowej pacjentów z ostrym ELZP może przedstawiać niewielki wysięk opłucnowy, którego brak jest w przewlekłej formie tego zapalenia płuc (Baron i in. 2003).

W zależności od klinicznej prezentacji oraz badań obrazowych dalszy proces diagnostyczny mający na celu postawienie diagnozy może przebiegać dwukierunkowo – rozpoznanie ustala się przy pomocy oceny cytologicznej pobranego materiału uzyskanego podczas płukania oskrzelowo-pęcherzykowego (BAL – bronchoalveolar lavage) czy też przez wykonanie biopsji cienkoigłowej (FNA – fine needle aspiration), przezoskrzelowej biopsji płuca, a czasem również biopsji otwartej płuca (Krychniak-Soszka i in. 2005; Venkatnarayan i in. 2014; Shaikh, Oliveira 2014; Rea i in. 2016). Jednakże wartość badania cytologicznego bywa kwestionowana, gdyż często daje ono wyniki fałszywie negatywne (Spickard, Hirschmann 1994). Preferowana jest w większości przypadków FNA, a gdy i tu wynik badania jest niepewny, stosuje się okazjonalnie działania bardziej inwazyjne, z biopsją otwartą płuca włącznie. Co ważne, obecność różnic histologicznych w preparatach pozwala na różnicowanie pomiędzy formą egzogenną oraz endogenną zapalenia płuc (Rana i in. 2020).

W histopatologii używa się specyficznych barwień do wykrycia obecności lipidów, pośród których prym wiodą barwniki Sudan III, Sudan IV oraz barwienie metodą Oil Red O (Soczek 2004; Rana i in. 2020). Charakterystyczna w obrazie ELZP jest obecność obładowanych lipidami makrofagów, zwanych również makrofagami piankowatymi – co jest związane z ich wyglądem pod mikroskopem świetlnym, które wypełniają pęcherzyki płucne oraz tkankę śródmiąższową. Co istotne, same lipidy mogą być obserwowane również pozakomórkowo. Ważną składową obrazu ELZP są także ziarniniaki z obecnymi w nich wielojądrowymi komórkami olbrzymimi oraz komórki zapalne obejmujące zarówno pęcherzyki, jak i śródmiąższ (Rana i in. 2020). Specyficzne jest również włóknienie śródmiąższu, bardziej zaznaczone w postaci przewlekłej ELZP. Rzadko obserwuje się erytrocyty w świetle pęcherzyków płucnych, związane z krwawieniami w tym obszarze.

Podstawą w diagnostyce ELZP jest przeprowadzenie szczegółowego wywiadu z pacjentem. Niestety w większości przypadków informacje na temat zachowań, które mogą być przyczyną ELZP, są najczęściej podawane po postawieniu diagnozy. Poza zmianami radiologicznymi, które zwykle nie są charakterystyczne i nie są podstawą do postawienia diagnozy, powinno się wykonać badanie popłuczyn oskrzelowo-pęcherzykowych lub/i płwocin, których obraz przedstawia makrofagi wypełnione lipidami, co jest podstawą do rozpoznania ELZP. W przypadku braku w wywiadzie czynników narażenia i/lub braku charakterystycznych zmian w badaniu BAL należy wykonać badanie histopatologiczne z wycinka płuca, które prezentuje największe zmiany w badaniu radiologicznym. Typowy obraz makrofagów wypełnionych materiałem lipidowym widoczny jest również w badaniu mięszu oraz śródmięszu płuc.

Z powodu niepospolitego występowania ELZP nie ustalono dotąd optymalnego leczenia tej jednostki chorobowej, bowiem nie została ona jeszcze wystarczająco dobrze opisana. Dotychczas nie utworzono schematów, które można byłoby zastosować w leczeniu tego schorzenia, gdyż większość opublikowanych przez klinicystów doświadczeń zawarto w nielicznych opisach przypadków. Istnieje jednak zgoda, że kluczowe w postępowaniu w ELZP są: identyfikacja oraz zaprzestanie dalszej ekspozycji na środek uszkadzający. Leczenie jest głównie podtrzymujące oraz zachowawcze, a wtóruje mu leczenie powikłań. Nierzadko stosowane są inne działania wspomagające, pośród których należy wymienić terapię tlenową, respiratoroterapię czy też kontrolę czynników ryzyka (Baron i in. 2003). Leczenie u pacjentów bezobjawowych jest na ten moment sporne. U części pacjentów z rozproszonym uszkodzeniem płuc stosowano bardziej zdecydowane działania. Czasami warto rozważyć wykonanie BAL. Należy też nadmienić, że antybiotykoterapię stosowano dotychczas tylko w bardzo trudnych przypadkach, szczególnie przy nadkażeniach bakteryjnych (Furuya i in. 2000, Ridaura-Sanz i in. 2006). Część autorów wykazała użyteczność glikokortykosteroidów (GKS) w spowolnieniu stanu zapalnego (Amato i in. 1997). Steroidoterapia ogranicza odpowiedź zapalną oraz będące w toku włóknienie płuc. Co interesujące, zastosowanie prednizolonu u pacjentów pediatrycznych z ELZP powodowało całkowite kliniczne oraz radiologiczne ustąpienie objawów choroby (Annobil i in. 1997). Wykazano, że skuteczność stosowania GKS zależy od stopnia intoksykacji, jednak samo ich stosowanie pozostaje kontrowersyjne i powinno być zarezerwowane dla ciężkich przypadków (Ayvasian i in. 1966; Russo i in. 2006). Istnieją także doniesienia, że powtarzane płukanie całych płuc może być użyteczne; do płukania używano emulgatorów tłuszczu, takich jak: polisorbaty czy roztwór Ringera z mleczanami (Nakashima i in. 2015; Russo i in. 2006; Sias i in. 2009;). W najcięższych przypadkach dokonywano

również chirurgicznej resekcji fragmentów płuc najbardziej zajętych zmianami chorobowymi (Furuya i in. 2000; Ridaura-Sanz i in. 2006).

Podsumowanie

ELZP jest rzadko występującą jednostką chorobową. W związku z częstym bezobjawowym przebiegiem i niespecyficznymi objawami klinicznymi oraz radiologicznymi proces diagnostyczny może się przedłużać, a mimo to nie zawsze kończy się ustaleniem rozpoznania, jakim jest ELZP. Opisany powyżej przypadek ukazuje, jak istotna jest rola dobrze zebranego wywiadu. Z drugiej strony widzimy także, jak trudna byłaby rola lekarza klinicysty, gdyby nie miał do dyspozycji wyników badania histopatologicznego, które były kluczowe do uzyskania rozpoznania w postaci ELZP. Do postawienia prawidłowej diagnozy niezbędna jest ścisła współpraca interdyscyplinarna: specjalisty internisty – najlepiej pulmonologa, oraz patomorfologa. Ze względu na niepowszednie występowanie tego schorzenia powinno rozważyć się globalne zbieranie danych dotyczących ELZP, aby móc opracować optymalne schematy diagnostyki oraz sposoby leczenia tej przypadłości.

Literatura:

- Amato G. M., Novara V., Amato G. 1997. Lipid pneumonia. Favorable outcome after treatment with intravenous immunoglobulins, steroids, cephalosporins. *Minerva Pediatr.*, 49: 163-169.
- Annobil S. H., Morad N. A., Khurana P. 1995. Reaction of human lungs to aspirated animal fat (ghee): a clinicopathological study. *Virchows Archiv*, 426(3).
- Annobil S. H., el Tahir M., Kameswaran M. 1997. Olive oil aspiration pneumonia (lipoid) in children. *Trop. Med. Int. Health*, 2: 383-388.
- Ayvasian F., Steward D. S., Merkel C. G., Federick W. W. 1966. Diffuse lipoid pneumonitis successfully treated with prednisone. *Am. J. Med.*, 43: 930-934.
- Baron S. E., Haramati L. B., Rivera V. T. 2003. Radiological and clinical findings in acute and chronic exogenous lipoid pneumonia. *J. Thorac. Imaging.*, 18(4): 217-224.
- Becton D. L., Lowe J. E., Falletta J. M. 1984. Lipoid Pneumonia in an adolescent girl secondary to use of lip gloss. *J. Pediatrics*, 105(3): 421-423.
- Betancourt S. L., Martinez-Jimenez S., Rossi S. E., Truong M. T., Carrillo J., Erasmus J. J. 2010. Lipoid Pneumonia: Spectrum of Clinical and Radiologic Manifestations. *Am. J. Roentgenol.*, 194: 103-109.

- Carminato A, Vascellari M, Zotti A, Fiorentin P, Monetti G., Mutinelli F. 2011. Imaging of exogenous lipid pneumonia simulating lung malignancy in a dog. *Can. Vet. J.*, 52(3): 310-312.
- Chin N. K., Hui K. P., Sinniah R., Chan T. B. 1994. Idiopathic lipid pneumonia in an adult treated with prednisolone. *Chest*, 105: 956-957.
- Corwin R. W., Irwin R. S. 1985. The lipid-laden alveolar macrophage as a marker of aspiration in parenchymal lung disease. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 132: 576-581.
- Costa T., Grífols J., Perpiñán D. 2013. Endogenous Lipid Pneumonia in an African Grey Parrot (*Psittacus Erithacus Erithacus*). *J. Comp. Pathol.*, 149(2-3): 381-384.
- Davidson K., Brancato A., Heetderks P. 2019. Outbreak of Electronic-Cigarette–Associated Acute Lipoid Pneumonia - North Carolina, July–August 2019. *Weekly, September 13*, 68(36): 784-786.
- Dicpinigaitis P. V., Trachuk P., Fakier F. 2020. Vaping-Associated Acute Respiratory Failure Due to Acute Lipoid Pneumonia. *Lung*, 198(1): 31–33.
- Furuya M. E., Martínez I., Zúñiga-Vásquez G. 2000. Lipoid pneumonia in children: clinical and imagenological manifestations. *Arch. Med. Res.*, 31(1): 42-47.
- Guo M., Liu J., Jiang B. 2019. Exogenous lipid pneumonia in old people caused by aspiration: Two case reports and literature review. *Resp. Med. Case Rep.*, 27.
- Graef I. 1935. Pulmonary changes due to aspirations of lipids and mineral oil. *Am. J. Pathol.* 11: 862–863.
- He T., Oks M., Esposito M. 2017. „Tree-in-Bloom”: Severe Acute Lung Injury Induced by Vaping Cannabis Oil. *Ann. Am. Thorac. Soc.*, 14(3): 468–470.
- Hugosson C. O., Riff E. J., Moore C. C. 1991. Lipoid pneumonia in infants: a radiological-pathological study. *Pediatr. Radiol.*, 21(3): 193–197.
- Jones D. J., Norris C. R., Samii V. F. 2000. Endogenous lipid pneumonia in cats: 24 cases (1985–1998). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 216: 1437–1440.
- Kitchen J. M., O’Brien D. E., McLaughlin A. M. 2008. Perils of fire eating. An acute form of lipoid pneumonia or fire eater’s lung. *Thorax*, 63(5): 401-439.
- Krychniak-Soszka A., Lewandowska K., Skorupa W. 2005. Egzogenne lipidowe zapalenie płuc – różnorodność obrazu klinicznego i radiologicznego. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 73: 182:188.
- Laughlen G. F. 1925. Studies on pneumonia following nasopharyngeal injection of oil. *Am. J. Pathol.*, 1: 407–414.
- Marangu D., Gray D., Vanker A. 2020. Exogenous lipid pneumonia in children: A systematic review. *Paediatr. Respir. Rev.*, 33: 45–51.
- Marangu D., Pillay K., Banderker E. 2018. Exogenous lipid pneumonia: an important cause of interstitial lung disease in infants. *Respirol. Case Rep.*, 6(7).
- Marchiori E., Zanetti G., Mano C. M. 2011. Exogenous lipid pneumonia. Clinical and radiological manifestations. *Resp. Med.*, 5: 659-666.

- Nakashima S., Ishimatsu Y., Hara S. 2015. Exogenous lipoid pneumonia successfully treated with bronchoscopic segmental lavage therapy. *Respir. Care*, 60(1): e1–e5.
- Papla B., Urbańczyk K., Gil T. 2011. Exogenous Lipoid Pneumonia (Oil Granulomas of the Lung). *Pol. J. Pathol.*, 4: 269-273.
- Pinkerton H. 1927. Oils and fats - their entrance into and fate in the lungs of infants and children: a clinical and pathologic report. *AJDC*, 33: 259-285.
- Pinkerton H. 1928. The reaction to oils and fats in the lung. *Arch. Pathol.*, 5: 380-401.
- Rahaghi F., Varasteh A., Memarpour R. 2016. Teppanyaki/hibachi pneumonitis: an exotic cause of exogenous lipoid pneumonia, *Case Rep. Pulmonol.*, 2016(4).
- Rana D., Kaushik N., Sadhu S. 2020. Idiopathic Lipoid Pneumonia: An incidental finding in autopsy specimen. *Autops. Case Rep.*, [Internet]. Jan-Mar.
- Rea G., Perna F., Calabrese G. 2016. Exogenous lipoid pneumonia (ELP): when radiologist makes the difference. *Transl. Med. UniSa.*, 14: 64-68.
- Ridaura-Sanz C., López-Corella E., Salazar-Flores M. 2006. Exogenous lipoid pneumonia superinfected with acid-fast bacilli in infants: a report of nine cases. *Fetal Pediatr. Pathol.* 25(2): 107-117.
- Russo R., Chiumello D., Cassani G. 2006. Case of Exogenous Lipoid Pneumonia: Steroid Therapy and Lung Lavage with an Emulsifier. *Anesthesiology*, 104(1): 197-198.
- Scarratt W. K., Moon M. L., Sponenberg D. P. 1998. Inappropriate administration of mineral oil resulting in lipoid pneumonia in three horses. *Equine Vet. J.*, 30: 85-88.
- Schwartz M. I., King T. E. 2003. Interstitial lung disease. B.C. Decker Hamilton, s. 901-905.
- Shaikh A. Y., Oliveira P. J. 2014. Exogenous lipoid pneumonia (fire-eater's lung). *Am. J. Med.*, 127(2): e3–e4.
- Sias S. M., Ferreira A. S., Daltro P. A. 2009. Evolution of exogenous lipoid pneumonia in children: clinical aspects, radiological aspects and the role of bronchoalveolar lavage. *J. Bras. Pneumol.*, 35(9): 839-845.
- Smith B. L., Alley M. R., McPherson W. B. 1969. Lipid pneumonia in a cow. *N. Z. Vet. J.*, 17: 65–67.
- Soczka A. 2004. Egzogenne tłuszczowe zapalenie płuc. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 72: 124-127.
- Spickard A. III., Hirschmann J. V. 1994. Exogenous Lipoid Pneumonia. *Archives of Internal Medicine*, 154(6): 686.
- Subramanian S., Kherdekar S. S., Babu P. G. V. 1982. Lipoid pneumonia with *Cryptococcus neoformans* colonization. *Thorax*, 37: 319-320.
- Wright B. A., Jeffrey P. H. 1990. Lipoid pneumonia. *Semin. Respir. Infect.*, 5: 314–321.

- Viswam D., Trotter S., Burge P. S. 2018. Respiratory failure caused by lipoid pneumonia from vaping e-cigarettes. *BMJ Case Rep.*, 2018: bcr2018224350.
- Venkatnarayan K., Madan K., Walia R. 2014. 'diesel siphoner's lung': exogenous lipoid pneumonia following hydrocarbon aspiration. *Lung India*, 31(1): 63–66 .

ABSTRACT

EXOGENOUS LIPOID PNEUMONIA - CLINICAL DIFFERENCES. CASE REPORT.

Exogenous lipoid pneumonia (ELP) is a rare form of pneumonia, caused by aspiration of substances which are containing lipids. The products which can cause this illness are: petrol, diesel, paraffin. Not specific symptoms and the possibility of asymptomatic course of disease make it harder to diagnose this entity.

66 year old man was admitted to the hospital due to sudden, unstoppable dyspnea and left sided pain in the thoracic cavity. On chest cavity radiogram emphysema of left lung was visible, which was uneffectively treated. The cut of left lung was taken during videothoracoscopy. In the material, the macrophages filled with lipids together with fibrosis were observed.

In ELP it is important to conduct precise data collection, as also detailed clinical diagnosis. Informations about ELP should be collected and systematized, to create base for systematic diagnosis and treatment of ELP. Due to the increase of interest of e-cigarette smoking, there is a risk of increase of ELP. Together with ELP, the incidence of coinfection with bacteria, fungi and viruses is increased, including coronaviruses.

Słowa kluczowe: egzogenne zapalenie lipidowe płuc (ELZP), płuca, e-papieros,

Keywords: Exogenous Lipoid Pneumonia (ELP), lungs, e-cigarette

Dane do kontaktu z autorem:

Michał Gola

michal.gola@student.uwm.edu.pl

Jan Maciej Kapala, Tomasz Maroszczuk

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Lekarski

Studenckie Koło Naukowe Chirurgii Ogólnej, Małoinwazyjnej i Wieku

Podeszłego

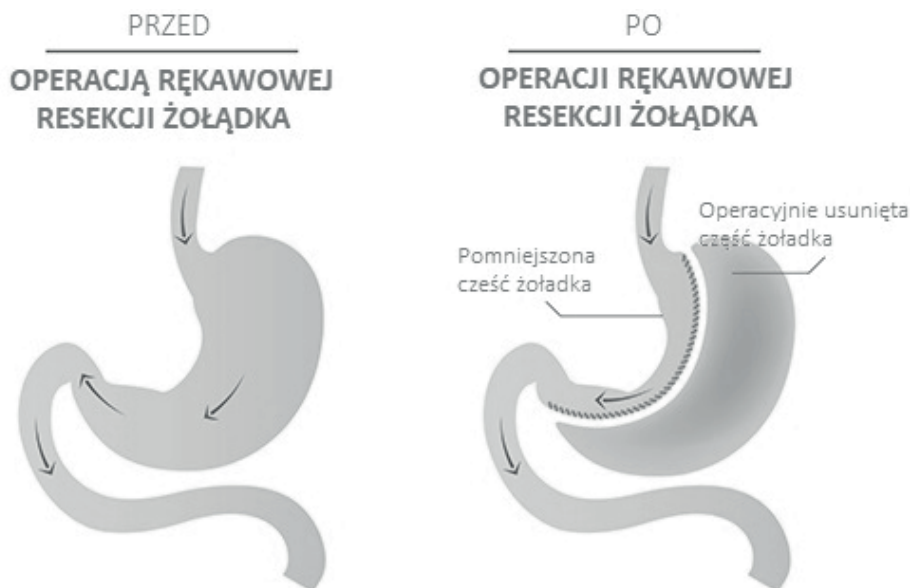
Opiekun: lek. Paweł Lech

PORÓWNANIE WYNIKÓW CHIRURGICZNEGO LECZENIA OTYŁOŚCI U KOBIET I MĘŻCZYŹN

Wstęp

Otyłość to nieprawidłowa, nadmierna akumulacja tkanki tłuszczowej, stanowiąca zagrożenie dla zdrowia człowieka. Według raportu WHO z 2018 roku, liczba osób dorosłych chorych na otyłość przekracza 650 milionów. Wśród osób poniżej 18 roku życia odnotowano około 380 milionów przypadków nadwagi lub otyłości (WHO, <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> [dostęp 20.02.2020]). Otyłość jest chorobą negatywnie wpływającą na funkcjonowanie wszystkich układów w organizmie człowieka. Do najczęstszych powikłań otyłości należą cukrzyca typu II, nadciśnienie tętnicze oraz procesy kancerogenezy, znacząco podnoszące ryzyko zgonu (Flegal i in. 2013).

Operacje bariatryczne należą do najbardziej efektywnych metod leczenia otyłości oraz towarzyszących jej powikłań (Nguyen, Varela 2016). W zestawieniu z innymi sposobami leczenia otyłości zabiegi te wyróżniają się długoterminową redukcją masy ciała pacjentów (Sjostrom 2012). Inną zaletą operacji bariatrycznych jest regularne wykorzystywanie techniki laparoskopowej (stanowią 94,6% przypadków w Polsce), co warunkuje małą inwazyjność zabiegu i zmniejsza prawdopodobieństwo pojawienia się powikłań pooperacyjnych. Najczęściej wykonywanym zabiegiem bariatrycznym w Polsce, stanowiącym 60,4% wszystkich zabiegów bariatrycznych, jest rękawowa resekcja żołądka (ang. *sleeve gastrectomy*) (Janik i in. 2016). Zabieg polega na wycięciu ok. 85% żołądka i utworzeniu z pozostałej jego części cienkiego przewodu (rys. 1). Wycięty fragment żołądka jest usuwany poza organizm.

Rysunek 1 Schemat operacji rękawowej resekcji żołądka (ang. *sleeve gastrectomy*).

Źródło: Na podstawie Atlanta Bariatrics, <https://www.atlantabariatrics.com/weight-loss-surgery-options/sleeve-gastrectomy/> (dostęp 16.02.2020)

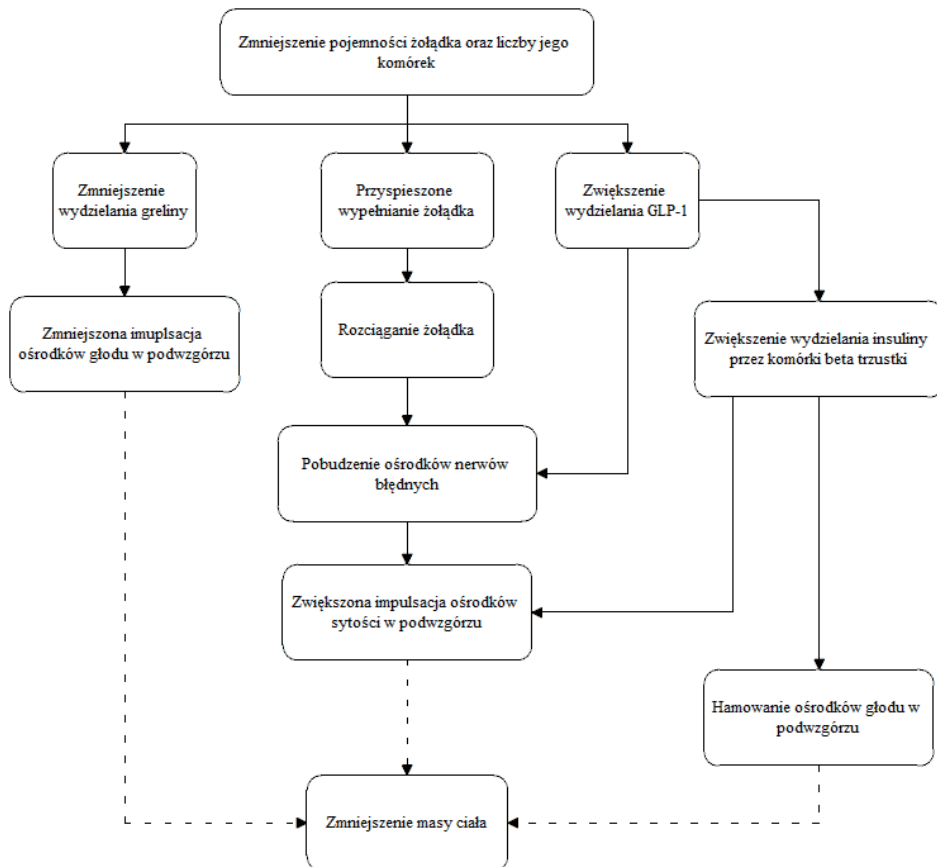
Spadek masy ciała pacjentów poddanych operacji rękawowej resekcji żołądka jest związany z działaniem mechanizmów angażujących nie tylko układ pokarmowy, ale także układ hormonalny i nerwowy.

W trakcie operacji bariatrycznej dochodzi do znacznego zmniejszenia żołądka, co warunkuje obniżenie jego pojemności. Efektem tej zmiany jest znacznie szybsze wypełnianie żołądka pokarmem. Rozciąganie ścian żołądka prowadzi do impulsacji nerwów żołądkowych oraz nerwu błędnego, które przekazują pobudzenie do ośrodków sytości zlokalizowanych w jądrze przykomorowym podwzgórza (rys. 2).

Zmniejszenie żołądka prowadzi również do zmniejszenia liczby komórek enteroendokrynnych typu A wydzielających grelinę, będącą hormonem odpowiadającym za uczucie głodu. Komórki te występują szczególnie obficie w dnie żołądka, który w trakcie rękawowej resekcji żołądka ulega całkowitemu usunięciu. Zmniejszone wydzielanie greliny prowadzi do zmniejszonej impulsacji ośrodków głodu zlokalizowanych w obszarze bocznym podwzgórza (rys. 2) (Puzziferri, Almandoz 2018).

Kolejny mechanizm prowadzący do obniżenia masy ciała u pacjentów opiera się na zależności między zwiększonym wydzielaniem inkretyny – glukagonopodobnego peptydu 1 (ang. *glucagon-like peptide-1*, GLP-1) przez komórki

Rysunek 2 Schemat opisujący wybrane mechanizmy powodujące spadek masy ciała po operacji rękawowej resekcji żołądka.



Źródło: Opracowanie własne

enteroendokrynowe L, a podwyższoną ilością pokarmu w dystalnych częściach jelita cienkiego (Chia, Egan 2020). Zwiększone wydzielanie GLP-1 wywołuje impulsację ośrodków nerwów błędnych, w efekcie czego dochodzi do pobudzenia jądra przykomorowego podwzgórza – ośrodka sytości (rys. 2). Ponadto inkretyny pobudzają komórki beta trzustki do wydzielania insuliny, będącej czynnikiem zarówno pobudzającym ośrodki sytości, jak i hamującym ośrodki głodu (rys. 2) (Chambers i in. 2014).

Operacje bariatryczne zmniejszają uczucie głodu, wzmagają uczucie sytości oraz obniżają wchłanianie w układzie pokarmowym. Pozwala to na znaczne zmniejszenie ilości spożywanego pokarmu przez pacjentów. Ograniczenie ilości przyjmowanej żywności w połączeniu z obniżonym wchłanianiem w układzie

pokarmowym stwarza wśród pacjentów wysoki deficyt kaloryczny, co bezpośrednio przekłada się na utratę wagi w okresie po operacji.

Cel pracy

Celem badania jest analiza porównawcza wyników chirurgicznego leczenia otyłości u kobiet i mężczyzn podczas dwuletniej obserwacji.

Materiały i metody

W badaniu wzięło udział 392 pacjentów, którzy przeszli operację rękawowej resekcji żołądka w Klinice Chirurgii Ogólnej, Małoinwazyjnej i Wieku Podeszłego w Olsztynie w latach 2013-2018. Przedział wiekowy badanych wynosił 20-71 lat. Średni wiek pacjentów wynosił 40,14 lat ($\sigma=10,53$ lat).

Pacjentów poddano obserwacji pooperacyjnej podczas osobistych i telefonicznych konsultacji. W przeprowadzonym badaniu zebrano następujące informacje o pacjentach: masa ciała przed operacją, wzrost i masa ciała dwa lata po operacji, niezbędne do obliczenia wartości wskaźników masy ciała, które wykorzystano w ocenie efektów leczenia otyłości. W badaniu użyto dwóch wskaźników. Pierwszym zastosowanym był wskaźnik masy ciała (ang. *body mass index*, BMI) (Medycyna Praktyczna, <https://www.mp.pl/pacjent/dieta/odchudzanie/leczeniechirurgiczne/63452,rekawowa-resekcja-zoladka> [dostęp 16.02.2020]).

Do pomiaru wyników leczenia otyłości wykorzystano również wskaźnik procentowej utraty nadmiaru wyjściowego BMI (ang. *percentage of excess body mass index loss*, %EBMIL). Za wyjściowe BMI (ang. *initial body mass index*, IBMI) uznano jego wartość z dnia, w którym została przeprowadzona operacja (Binda i in. 2015).

$$\%EBMIL(2\text{ lata po operacji}) = \left(\frac{IBMI - BMI\ 2\text{ lata po operacji}}{IBMI - PBMI} \right) \cdot 100$$

Do obliczenia %EBMIL wykorzystano przewidywany BMI (ang. *predicted body mass index*, PBMI), liczony wzorem:

$$PBMI = IBMI \cdot 0,4 + 11,75$$

Celem zastosowania wskaźnika %EBMIL było określenie rezultatów leczenia bariatrycznego z pominięciem różnic w wyjściowej masie ciała pacjentów.

Do porównania wyników leczenia otyłości u kobiet i mężczyzn wykorzystano średnią arytmetyczną BMI oraz %EBMIL dla poszczególnych grup. Istotność statystyczną różnicy średnich sprawdzano przy pomocy testu t-Studenta dla grup niezależnych ($p=0,05$) z wykorzystaniem oprogramowania StatSoft Inc. *Statistica 13.1*. Leczenie bariatryczne uznano za skuteczne, przy BMI < 35 kg/m² lub %EBMIL > 50%. Na podstawie wcześniej wymienionych warunków opracowano wzory służące do wyznaczenia skuteczności leczenia bariatrycznego w badanej próbie:

skuteczność wg. BMI

$$= \frac{\text{liczba pacjentów z BMI} < 35 \frac{\text{kg}}{\text{m}^2} \text{ w grupie}}{\text{liczebność grupy}} \cdot 100$$

skuteczność wg. %EBMIL

$$= \frac{\text{liczba pacjentów z \%EBMIL} > 50\% \text{ w grupie}}{\text{liczebność grupy}} \cdot 100$$

Wyniki badań

W badaniu 62,76% pacjentów ($n=392$) odpowiedziało w ankiecie popooperacyjnej. Analizie poddano grupę 246 pacjentów (190 kobiet i 56 mężczyzn). Wyjściowe parametry pacjentów zostały opisane w tabeli 1.

Tabela 1. Porównanie wartości BMI kobiet i mężczyzn przed operacją.

Cecha porównywana	Wszyscy n=246	Kobiety n=190	Mężczyźni n=56
BMI przed operacją [kg/m ²]	43,86	43,57	44,84
σ [kg/m ²]	6,06	6,06	6,01

Źródło: Opracowanie własne

Zarówno u kobiet, jak i mężczyzn zauważono znaczący spadek BMI po dwu latach od operacji o średnio 14,05 kg/m² ($\sigma=5,14$ kg/m²) (tab. 2, wyk. 2). Różnica między średnią wartością BMI u kobiet i mężczyzn jest nieistotna statystycznie ($p>0,05$). Średni wskaźnik %EBMIL u kobiet po dwóch latach od operacji charakteryzował się znacznie wyższą wartością niż u mężczyzn (tab. 2,

Tabela 2. Porównanie średnich wartości BMI oraz %EBMIL kobiet i mężczyzn dwa lata po operacji.

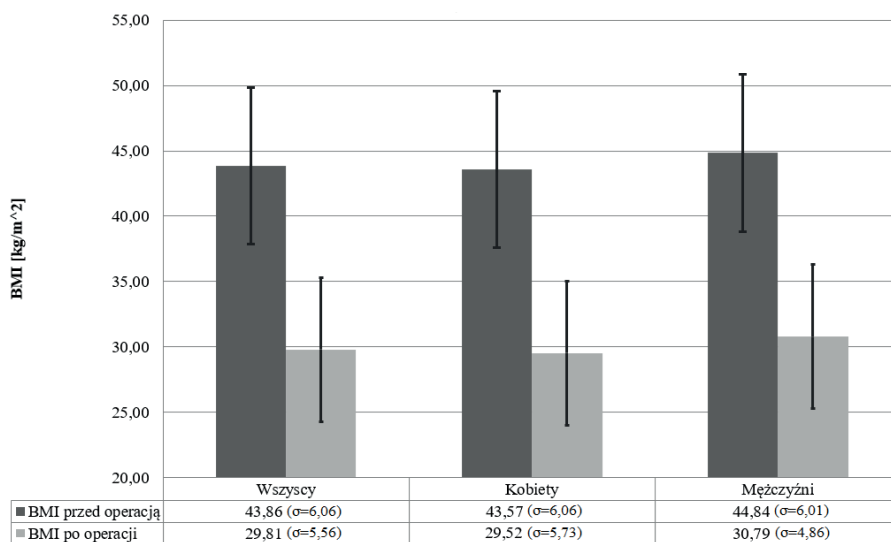
Cecha porównywana	Wszyscy n=246	Kobiety n=190	Mężczyźni n=56
BMI 2 lata po operacji [kg/m ²]	29,81	29,52	30,79
σ [kg/m ²]	5,56	5,73	4,86
%EBMIL 2 lata po operacji	97,59%	99,29%	91,84%
σ	30,70%	31,24%	28,29%

Źródło: Opracowanie własne

wyk. 2). Różnica między średnią wartością %EBMIL u kobiet i mężczyzn jest istotna statystycznie ($p < 0,05$).

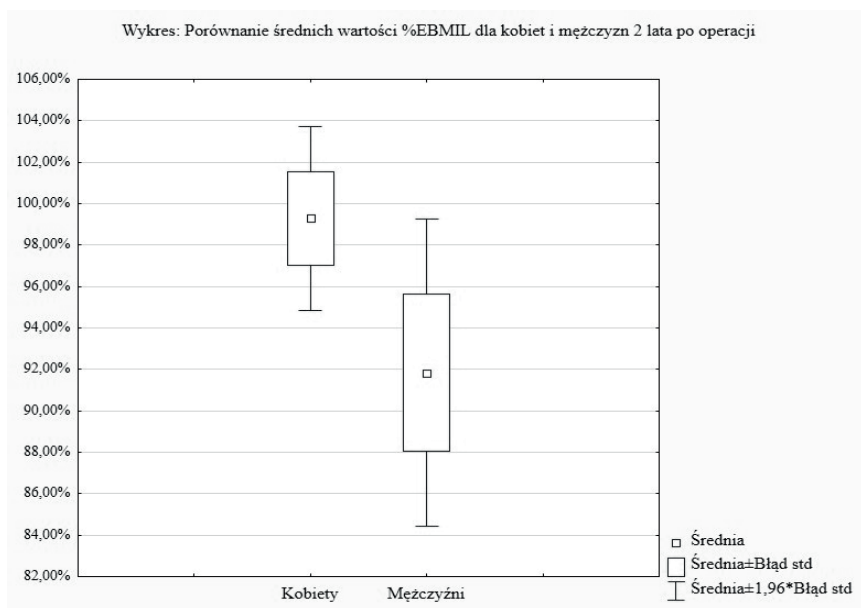
Skuteczność operacji bariatrycznych zarówno u kobiet, jak i mężczyzn wyniosła powyżej 90%, co jest bardzo zadowalającym wynikiem w krótkim czasie obserwacji. W przeprowadzonym badaniu skuteczność operacji bariatrycznych wśród kobiet cechowała się nieznacznie wyższą wartością niż u mężczyzn (wyk. 3).

Wykres 1. Porównanie BMI wyjściowego i po dwu latach od operacji u kobiet i mężczyzn.



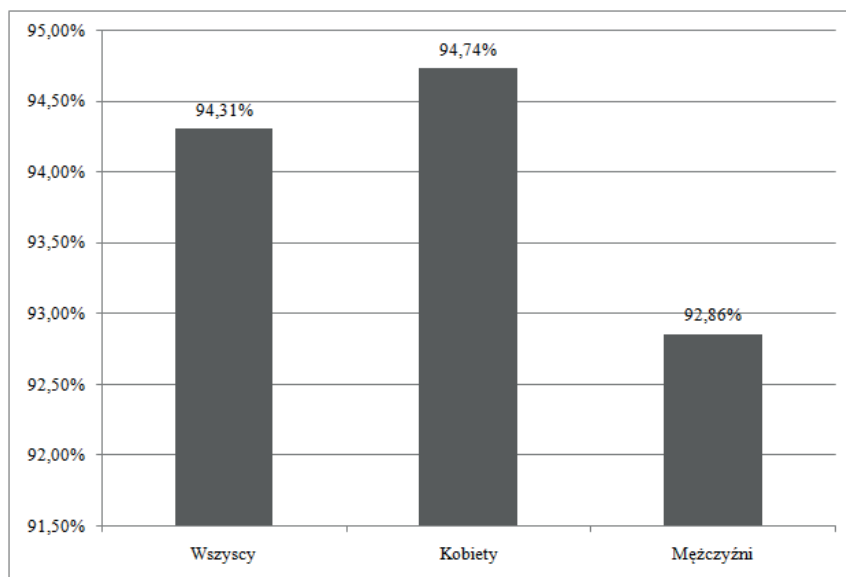
Źródło: Opracowanie własne

Wykres 2. Porównanie średniej wartości %EBMIL dla kobiet i mężczyzn dwa lata po operacji.



Źródło: Opracowanie własne

Wykres 3. Porównanie skuteczności leczenia bariatrycznego u kobiet i mężczyzn po dwóch latach od operacji wg. wskaźnika %EBMIL.



Źródło: Opracowanie własne

Dyskusja

W badaniu poddano analizie wyniki leczenia otyłości dwóch grup: kobiet i mężczyzn. Do określenia postępów w utracie masy ciała pacjentów po operacji bariatrycznej wykorzystano dwa wskaźniki: BMI oraz %EBMIL. Średnie, początkowe wartości BMI badanych były nieznacznie wyższe wśród mężczyzn (tab. 1). Po dwuletnim okresie obserwacji średnie wyniki BMI nadal był wyższe u mężczyzn (tab. 2, wyk. 1), jednakże nie była to różnica istotna statystycznie. Odmienne wyniki przyniosła analiza wskaźnika %EBMIL, który porównuje regresję BMI po operacji z prognozowanym rezultatem leczenia wyznaczonym przed zabiegiem. Analiza statystyczna wartości %EBMIL po dwuletniej obserwacji (tab. 2, wyk. 2) ukazała istotną statystycznie różnicę między średnimi wartościami tego parametru u kobiet i mężczyzn.

W toku interpretacji wyników badania zaobserwowano porównywalną utratę masy ciała u obu płci po dwóch latach od operacji. Wyrażna rozbieżność dotyczyła osiągnięcia przewidywanych przed zabiegiem wyników leczenia. Masa ciała kobiet była w większym stopniu niż u mężczyzn zbliżona do wartości, którą miały osiągnąć po operacji. Ma to swoje odzwierciedlenie w częstszym osiągnięciu pozytywnych rezultatów leczenia bariatrycznego przez kobiety.

Wśród przyczyn różnic w wynikach leczenia bariatrycznego u kobiet i mężczyzn kluczową rolę odgrywają swoiste dla każdej z płci cechy anatomiczne, psychiczne i społeczne warunkujące predyspozycje do niepowodzeń w leczeniu bariatrycznym.

Najnowsze badania wykazały, że istnieje wiele czynników prowadzących do niepowodzeń w leczeniu bariatrycznym. Należą do nich między innymi: zachwiania hormonalne/metaboliczne, komplikacje pooperacyjne, nieprzestrzeganie zaleceń żywieniowych, zaburzenia zdrowia psychicznego i zbyt niska aktywność fizyczna (Kushner, Webb Sorensen 2015).

Zachwiania metaboliczne dotyczą głównie wpływu operacji bariatrycznej na gospodarkę hormonalną organizmu. Wycięcie ok. 85% żołądka w trakcie rękawowej resekcji żołądka prowadzi do zmniejszenia populacji komórek odpowiedzialnych za wydzielanie greliny – hormonu głodu. W przypadku nieprzestrzegania zasad diety dochodzi u pacjentów do zwiększenia rozmiaru żołądka. Skutkuje to zwiększeniem wydzielania greliny, co według badań, w większości przypadków wiąże się z ponownym przyrostem masy ciała (Serrenho i in. 2019) (Itlaybah i in. 2018).

Niezwykle ważnym elementem leczenia bariatrycznego jest stosowanie się do zaleceń żywieniowych obejmujących zmniejszenie podaży kalorii oraz wycofanie z diety niektórych produktów (np. słodzonych napojów). Większość pacjentów bez problemu trzyma się diety we wczesnym okresie po operacji.

Z czasem jednak spożycie kalorii staje się mniej powściągliwe, co ma bezpośredni związek ze stylem życia jednostki. Zgodnie z analizą przeprowadzoną przez Chapmana i in. na zwiększone spożycie pokarmów mają wpływ głównie trzy czynniki: brak snu, oglądanie telewizji i picie alkoholu (Chapman i in. 2012). Nieprzestrzeganie diety i nieodpowiednie wzorce odżywiania są ważnym czynnikiem zwiększającym ryzyko wzrostu masy ciała po operacji bariatrycznej.

Najbardziej pospolitymi zaburzeniami psychicznymi u osób z nawrotem otyłości są zespół gwałtownego objadania się (ang. *binge eating disorder*, BED) i zespół nocnego jedzenia (ang. *night eating syndrome*, NES). Oba wymienione zaburzenia mają negatywny wpływ na proces leczenia otyłości. Ponadto kompleksowe badania na temat wpływu spontanicznie pojawiających się stresujących sytuacji (np. śmierci bliskiej osoby) na jakość życia wykazały istnienie zależności między złym stanem psychicznym, a mniej efektywnym kontrolowaniem diety (Elfhag, Rossner 2005).

Innym czynnikiem mającym wpływ na niekorzystne wyniki leczenia otyłości jest aktywność fizyczna. W badaniu przeprowadzonym przez Kinga i in. wśród wielu pacjentów zaobserwowano znaczne zmniejszenie aktywności fizycznej po operacji bariatrycznej w stosunku do tej, jaką wykonywali przed zabiegiem (King i in. 2012). Należy pamiętać, że obniżona aktywność fizyczna nie wynika jedynie z zaniedbania ze strony pacjentów, ale także np. z chorób, które ich dotykają. Niemniej jednak, niezależnie od przyczyny, zmniejszona aktywność fizyczna przy stałej podaży kalorii doprowadzi do wzrostu masy ciała pacjentów.

Na podstawie analizy wyników doświadczenia oraz innych przeprowadzonych badań można wskazać liczne czynniki warunkujące różnice w wynikach chirurgicznego leczenia otyłości u kobiet i mężczyzn. Głównymi uwarunkowaniami dysproporcji są czynniki: behawioralne, biologiczne oraz społeczne (Harvard Health Publishing, https://www.health.harvard.edu/newsletter_article/mars-vs-venus-the-gender-gap-in-health [dostęp 2.03.2020]).

Zgodnie z wcześniej opisaną zależnością, picie alkoholu negatywnie wpływa na proces leczenia otyłości. W zestawieniu z płcią przeciwną, mężczyźni spożywają znacznie większą ilość trunków oraz wykazują większą skłonność do popadania w nałóg związany z tą używką (Wilsnack i in. 2018). Opisana różnica jest szczególnie widoczna w ocenie spożycia trunków o niskiej zawartości etanolu (np. piwo). Należy zwrócić uwagę na fakt, iż wzrost masy ciała pacjentów nie wynika głównie z kaloryczności trunków, ale przede wszystkim z powiązanymi ze spożywaniem alkoholu nieodpowiednimi wzorcami odżywiania oraz stylem życia niesprzyjającym leczeniu otyłości.

W innym badaniu wykazano, że w odróżnieniu od mężczyzn, kobiety częściej systematycznie kontrolują swoją dietę oraz unikają niezdrowych posiłków. Posiadanie dobrych wzorców żywieniowych jest zasadnicze w utrzymaniu deficytu kalorycznego po operacji leczenia otyłości. Ponadto obecność zdrowych schematów żywieniowych przed operacją bariatryczną zmniejsza ryzyko spożycia przez pacjentów niedozwolonych posiłków (np. sweatserów) w okresie po operacji (Wardle i in. 2004).

Czynnikiem o pozytywnym wpływie na przebieg leczenia otyłości jest większa dbałość o własne zdrowie prezentowana przez kobiety. Według ankiety przeprowadzonej przez Commonwealth Fund, trzy razy więcej mężczyzn niż kobiet unika wizyty u lekarza, a ponad połowa wszystkich mężczyzn nie miała przeprowadzonego badania fizykalnego i pomiaru cholesterolu we krwi w ciągu ostatniego roku. Większa dbałość o własne zdrowie u kobiet prowadzi do ich zwiększonego zaangażowania w proces rekonwalescencji, co przekłada się na osiągnięcie lepszych wyników leczenia bariatrycznego.

Bardziej korzystne wyniki kobiet mogą mieć również podłoże w ich większej motywacji do uzyskania niskiej masy ciała (Czech i in. 2018). Podczas konsultacji telefonicznych wiele kobiet jako źródło swojej motywacji wskazywało chęć zajęcia w ciąży, która u pacjentek z otyłością jest niemożliwa lub obarczona bardzo wysokim ryzykiem zarówno dla matki, jak i płodu (Stubert i in. 2018).

W przeprowadzonym badaniu są obecne pewne ograniczenia. Informacje na temat zmieniającej się masy ciała pacjentów były częściowo uzyskiwane podczas konsultacji telefonicznych. Wartości podawane przez badanych mogły być niedokładne lub zaokrąglone, co prowadzi do zniekształcenia wyników badań. Rozwiązaniem tego ograniczenia byłoby wykonywanie pomiarów masy ciała pacjentów wyłącznie w placówkach medycznych. W badanej grupie pacjentów liczebność kobiet (n=190) wielokrotnie przewyższa liczebność mężczyzn (n=56). Wykorzystanie grup nierównolicznych stanowi pewne ograniczenie dla uzyskanych wartości średnich BMI oraz %EBMIL. W celu uzyskania bardziej wiarygodnego obrazu należałoby zwiększyć liczebność mężczyzn do takiej wartości, aby obie grupy były równoliczne statystycznie.

Podsumowanie

Wyniki przeprowadzonego badania wskazują na wysoką efektywność leczenia bariatrycznego prowadzącego do utraty wagi. W badaniu wykazano, że kobiety osiągały wyższy %EBMIL po dwóch latach od operacji, co prowadzi do wniosku, iż operacje bariatryczne charakteryzują się wyższą skutecznością u kobiet niż u mężczyzn w krótkim czasie obserwacji. Porównanie wyników

chirurgicznego leczenia otyłości u kobiet i mężczyzn pozwala na bardziej spersonalizowany sposób traktowania pacjenta. Resumując, prognozowany wynik leczenia bariatrycznego jest uzależniony od płci pacjenta.

Literatura:

- Atlanta Bariatrics, <https://www.atlantabariatrics.com/weight-loss-surgery-options/sleeve-gastrectomy/> (dostęp 16 lutego 2020).
- Benaiges D., Goday A., Pedro-Botet J., Más A., Chillarón J. J., Flores-Le Roux J. A. 2015. Bariatric surgery: to whom and when? *Minerva endocrinologica*, 42(2).
- Binda A., Jaworski P., Ciesielski A., Tarnowski W. 2015. Metodologia prezentacji wyników chirurgicznego leczenia otyłości. *Postępy Nauk Medycznych*, t. XXVIII, nr 9.
- Chambers A. P., Smith E. P., Begg D. P., Grayson B. E., Sisley S., Greer T., Sorrell J., Lemmen L., LaSance K., Woods S. C., Seeley R. J., D'Alessio D. A., Sandoval D. A. 2014. Regulation of gastric emptying rate and its role in nutrient-induced GLP-1 secretion in rats after vertical sleeve gastrectomy. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 306(4): E424–E432.
- Chapman C., Benedict C., Brooks S., Schioth H. B. 2012. Lifestyle determinants of the drive to eat: a meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 96(3): 492-497.
- Chia C. W., Egan J. M. 2020. Incretins in obesity and diabetes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1461: 104-126.
- Czech D. R., Melton B., Biber D. D., Wittenberg M. 2018. Influence of Gender, Race and Generation on College Students' Exercise Motivation Levels: A Generational Comparison. *J. Sports Sci.*, 6: 268-275.
- Elfhag K., Rossner S. 2005. Who succeeds in maintaining weight loss? A conceptual review of factors associated with weight loss maintenance and weight regain. *Obes. Rev.*, 6(1): 67-85.
- Flegal K., Kit B., Orpana H., Graubard B., 2013, Association of All-Cause Mortality With Overweight and Obesity Using Standard Body Mass Index Categories. American Medical Association.
- Harvard Health Publishing, https://www.health.harvard.edu/newsletter_article/mars-vs-venus-the-gender-gap-in-health (dostęp 2 marca 2020).
- Itlaybah A., Elbanna H., Emile S., Thabet W., Elkashef W., Abdelsalam N., AbdelMawla A., Elkafas H. 2018. Correlation Between the Number of Ghrelin-Secreting Cells in the Gastric Fundus and Excess Weight Loss after Sleeve Gastrectomy. *Obes. Surg.*, 29(1): 76-83.
- Janik M. R., Stanowski E., Paśnik K. 2016. Present status of bariatric surgery in Poland. *Videosurgery and Other Miniinvasive Techniques*.

- King W. C., Hsu J. Y., Belle S. H., Courcoulas A. P., Eid G. M., Flum D. R., Mitchell J. E., Pender J. R., Smith M. D., Steffen K. J., Wolfe B. M. 2012. Pre- to post-operative changes in physical activity: report from the longitudinal assessment of bariatric surgery-2 (LABS-2). *Surg. Obes. Relat. Dis.*, 8(5): 522-532.
- Kushner R. F., Webb Sorensen K. 2015. Prevention of Weight Regain Following Bariatric Surgery. *Curr. Obes. Rep.*, 4(2): 198-206.
- Medycyna Praktyczna, <https://www.mp.pl/pacjent/dieta/odchudzanie/leczeniechirurgiczne/63452,rekawowa-resekcja-zoladka> (dostęp 16 lutego 2020).
- Nguyen N. T., Varela J. E. 2016. Bariatric surgery for obesity and metabolic disorders: state of the art. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 14(3): 160–169.
- Puzziferri N., Almandoz J. P. 2018. Sleeve Gastrectomy for Weight Loss. *JAMA*, 319(3): 316.
- Serrenho D., Santos, S. D., Carvalho A. L. 2019. The Role of Ghrelin in Regulating Synaptic Function and Plasticity of Feeding-Associated Circuits. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13: 205.
- Sjostrom L. 2012. Review of the key results from the Swedish Obese Subjects (SOS) trial – a prospective controlled intervention study of bariatric surgery. *The Association for the Publication of the Journal of Internal Medicine*.
- Stubert J., Reister F., Hartmann S., Janni W. 2018. The Risks Associated With Obesity in Pregnancy. *Deutsches Arzteblatt International*, 115(16): 276–283.
- Wardle J., Haase A. M., Steptoe A., Nillapun M., Jonwutiwes K., Bellisle F. 2004. Gender differences in food choice: The contribution of health beliefs and dieting. *Ann. Behav. Med.* 27: 107–116.
- Wilsnack, R. W., Wilsnack, S. C., Gmel, G., Kantor L. W. 2018. Gender Differences in Binge Drinking. *Alcohol research. Curr. Rev.*, 39(1): 57–76.
- World Health Organization, <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight> (dostęp 20 lutego 2020).

ABSTRACT

GENDER DIFFERENCES IN BARIATRIC SURGERY RESULTS

Objective: The purpose of this study is to evaluate the outcomes of bariatric surgery with emphasis on differences between female and male patients' results.

Materials and methods: A total of 392 patients underwent sleeve gastrectomy in the Department of General, Minimally Invasive and Elderly Surgery in Olsztyn in 2013-2018. The research examined changes in patients' body weight 2 years after the surgery. Body

Mass Index (BMI) and the percentage of Excess Body Mass Index Loss (%EBMIL) were used to determine the results of obesity treatment.

Research results: The follow up rate was 62,76%. The average BMI of the examined patients before surgery was equal to 43,86 kg/m² ($\sigma=6,06$ kg/m²) and after surgery it decreased to an average of 29,81 kg/m² ($\sigma=5,56$ kg/m²) was noted both in female and male patients. The average %EBMIL for female patients had higher value 99,29% ($\sigma=31,24\%$) than in male patients 91,84% ($\sigma=28,29\%$).

Słowa kluczowe: operacja bariatryczna, otyłość, rękawowa resekcja żołądka, wskaźnik masy ciała (BMI), różnice płci.

Keywords: bariatric surgery, obesity, sleeve gastrectomy, body mass index (BMI), sex differences.

Dane do kontaktu z autorem:

Jan Maciej Kapała tel.: 798763735 email: jas.kapala@gmail.com

Tomasz Maroszczyk tel.: 669646866 email: tomasz.maroszczyk@gmail.com

Kinga Kondrat

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Studenckie Koło Naukowe Chirurgii Ogólnej, Małoinwazyjnej i Wieku

Podeszłego

Opiekun: lek. Paweł Lech

PORÓWNANIE WYNIKÓW CHIRURGICZNEGO LECZENIA OTYŁOŚCI U PACJENTÓW W RÓŻNYCH GRUPACH WIEKOWYCH

Wstęp

Otyłość jest obecnie najczęstszą jednostką wśród chorób metabolicznych, osiągającą według WHO rozmiar epidemii. Wynika z nieprawidłowej lub nadmiernej akumulacji tkanki tłuszczowej, która stanowi zagrożenie dla zdrowia i życia. Nadmierna ilość tkanki tłuszczowej w organizmie niekorzystnie wpływa na funkcjonowanie organów wewnętrznych, jak i całego organizmu. Niesie to za sobą indukowanie szerokiego wachlarza powikłań takich, jak: nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, choroby sercowo-naczyniowe, choroba zwyrodnieniowa stawów, kamica pęcherzyka żółciowego, obturacyjny bezdech senny, nietrzymanie moczu, nowotwory i wiele innych. W Europie szacuje się, że nadwaga i otyłość wśród dorosłych odpowiedzialna jest za występowanie ponad 50% przypadków nadciśnienia tętniczego, 80% cukrzycy typu 2, jak również stanowi czynnik sprawczy występowania 35% przypadków choroby niedokrwiennej serca (*A simple estimate of...* 2003; tabela 1).

Otyłość jest chorobą o złożonym mechanizmie powstawania. Występują w nim czynniki środowiskowe, genetyczne, metaboliczne oraz psychologiczne. W dzisiejszych czasach skala problemu, jaką stanowi otyłość, jest zbyt rozległa, aby wnioskować, że w głównej mierze odpowiada za nią genetyka. Na pierwszym miejscu aktualnie stawiane są czynniki środowiskowe przekładające się na nawyki żywieniowe. Współczesne technologie i przemysł sprawiają, że czas oraz aktywność, którą musimy włożyć, aby zdobyć pożywienie, są sukcesywnie redukowane. Rozwój transportu, urbanizacja kosztem terenów rekreacyjnych

Tabela 1. Klasyfikacja otyłości wg WHO (w oparciu o BMI).

BMI (kg/m ²)	Klasyfikacja WHO
<18,5	niedowaga
18,5-24,9	norma
25,0-29,9	nadwaga
30,0-34,9	otyłość I stopnia
35,0-39,9	otyłość II stopnia
≥40,0	otyłość II stopnia (olbrzymia)

Źródło: według WHO

także przekłada się na ograniczanie aktywność społeczeństwa. Z drugiej strony zwiększa się dostępność jedzenia. W dobie wszechobecnego pośpiechu coraz częściej uznane zyskują restauracje typu fast-food, które w stosunkowo niskich cenach oferują produkty wysokotłuszczowe. Badania przeprowadzane w polskich miastach pokazują, że coraz częściej odchodzimy od prawidłowych nawyków żywieniowych. W rozmowach respondenci najczęściej wskazują na nadmierne spożywanie produktów wysokoenergetycznych, małą zawartość owoców i warzyw w diecie, nieregularne spożywanie posiłków oraz podjadanie między głównymi posiłkami. Nie bez znaczenia dla jakości spożywanych posiłków jest też sytuacja materialna oraz wykształcenie. Wykazuje się, że osoby z wyższym wykształceniem oraz te znajdujące się w lepszej sytuacji materialnej częściej utrzymują prawidłowe nawyki żywieniowe, wiążące się z systematyką spożywanych posiłków oraz urozmaiconą, pełnowartościową dietą.

Z uwagi na możliwość wystąpienia tak licznych powikłań wiele towarzystw naukowych opracowuje wytyczne zapobiegania i leczenia tej jednostki chorobowej. Obecne spojrzenie na terapię otyłości obejmuje interdyscyplinarne podejście oraz ukierunkowuje się na zapobieganie szerokiemu wachlarzowi powikłań będących jej efektem.

Chirurgiczne leczenie otyłości stanowi bezpieczną i skuteczną metodę leczenia w obserwacjach długoterminowych. Zgodnie z wytycznymi do zabiegu bariatrycznego kwalifikują się pacjenci z BMI co najmniej 40 kg/m² (otyłość olbrzymia) lub BMI w przedziale 35-40 kg/m² z chorobami towarzyszącymi (w przypadku, gdy przeprowadzenie operacji prowadzić będzie do ich poprawy lub ustąpienia).

W artykule analizowano efekty laparoskopowej rękawowej resekcji żołądka (sleeve gastrectomy – SG). Jest to zabieg operacyjny wykonywany od 2000 roku. Obecnie jest najczęściej stosowaną metodą operacyjnego leczenia otyłości na całym świecie. Zabieg SG przeprowadzany jest w znieczuleniu ogólnym i trwa zazwyczaj około 30-40 minut. Procedura rozpoczyna się wytworzeniem

odmy otrzewnowej, którą wykonuje się za pomocą igły Veresa lub metodą Hassona. W dalszej kolejności chirurg przechodzi do wprowadzenia do otrzewnej trokarów, przez które wkłada się narzędzia chirurgiczne. Metoda polega na wycięciu znacznej części żołądka wzdłuż krzywizny większej za pomocą staplera. Usunięte zostaje dno i około 80% trzonu żołądka, a pozostawiany jest mały (100-150 ml) zbiornik żołądkowy w kształcie rękawa i nienaruszony odzwiernik. Ostatecznie objętość żołądka maleje o około 80-90%, co zmniejsza możliwość spożywania większej ilości pokarmów, ale przede wszystkim za efekt bariatryczny i metaboliczny operacji odpowiadają zmiany hormonalne i inkretynowe. Między innymi redukcja wydzielania greliny, która produkowana jest głównie w proksymalnej części żołądka. Skutkuje to zmniejszonym odczuwaniem łaknienia (*Operacyjne leczenie otyłości...* 2013).

W okresie okołooperacyjnym obowiązuje profilaktyka przeciwzakrzepowa polegająca na stosowaniu heparyny drobnocząsteczkowej i metod mechanicznych (np. pończoch o stopniowanym ucisku oraz standardowa profilaktyka antybiotykowa stosowana w danym oddziale chirurgicznym do operacji w obrębie jamy brzusznej). Przy braku przeciwwskazań pacjenci zostają wypisani w pierwszej dobie pooperacyjnej. Bezpośrednio po operacji oraz w ciągu pierwszych 1-2 lat, gdy następuje gwałtowna zmiana stylu życia, sposobu odżywiania oraz zachodzi konieczność modyfikacji dotychczasowego leczenia, pacjent powinien zgłaszać się na kontrolę co trzy miesiące w pierwszym roku, co sześć w drugim roku, a później raz do roku. Należy regularnie kontrolować parametry metaboliczne oraz stan odżywienia pacjenta i na bieżąco korygować niedobory poprzez suplementację (*Operacyjne leczenie otyłości...* 2013).

Do niedawna SG stanowiła pierwszy etap w leczeniu dwuetapowym pacjentów, u których ze względu na bardzo dużą otyłość ($BMI > 50-60 \text{ kg/m}^2$) i ryzyko powikłań nie można było wykonać od razu operacji wyłączenia żółciowo-trzustkowego z przełączeniem dwunastniczym lub wyłączenia żołądkowego typu Roux-en-Y. Wielu pacjentów uzyskuje zadowalające wyniki leczenia bez konieczności wykonywania drugiego etapu i operację SG stosuje się obecnie jako samodzielną metodę.

Niewątpliwymi zaletami tej metody jest fakt, że oszczędzony zostaje odzwiernik żołądka, dzięki czemu opróżnianie żołądka jest fizjologiczne. Metoda ta nie zaburza również wchłaniania jelitowego (zwłaszcza jonów wapniowych i żelazowych). Możliwa jest kolejna operacja w przypadku ponownego wzrostu wagi. SG jest stosunkowo łatwa w wykonaniu i nie wymaga wykonywania zespoła. Bardzo rzadko dochodzi do wystąpienia zespołu poposiłkowego i hipoglikemii, które występują częściej przy operacjach polegających na ominięciu żołądkowo-jelitowym.

Rozpatrując ewentualne wady zabiegu SG, możemy wymienić konieczność suplementacji witamin z grupy B – zwłaszcza B12, możliwość nasilenia objawów refluksu żołądkowo-przelykowego, nieodwracalne usunięcie znacznej części żołądka oraz długą linię resekcji żołądka. Możliwymi powikłaniami są nieszczelność zespolenia, krytyczne zwężenie żołądka, krwawienie do jamy otrzewnej.

Tabela 2. Czynniki wpływające na ryzyko otyłości.

Czynniki:	zmniejszające ryzyko	zwiększające ryzyko
przekonujące	- regularna aktywność fizyczna - wysokie spożycie błonnika pokarmowego	- siedzący tryb życia - nadmierna podaż energii w diecie, szczególnie pochodzącego z tłuszczów i węglowodanów prostych
prawdopodobne	- prozdrowotne zwyczaje żywieniowe w otoczeniu człowieka (szkoła, rodzina) - karminie piersią	- reklama wysoko przetworzonej żywności i typu fast-food - nadmierne spożycie słodzonych napojów - niski status socjoekonomiczny
możliwe	- spożywanie żywności o niskim indeksie glikemicznym	- duże porcje pokarmów - częste spożywanie żywności poza domem - nieprawidłowe zwyczaje żywieniowe
niewystarczające	- częste spożywanie żywności w małych porcjach	- spożywanie alkoholu

Źródło: według WHO

Cel pracy

Celem pracy jest przedstawienie i porównanie wyników chirurgicznego leczenia otyłości metodą SG w różnych grupach wiekowych.

Material i metody

W badaniu wzięło udział 158 pacjentów. Poddani oni zostali SG. Operacje przeprowadzono w latach 2016-2017 w Klinice Chirurgii Ogólnej, Małoinwazyjnej i Wieku Podeszłego w Olsztynie. Badanych podzielono na dwie grupy wiekowe. Za kryterium podziału przyjęto wiek czterdziestu lat (*Outcomes of Sleeve Gastrectomy...* 2019). Do grupy pierwszej (1) przyporządkowano osoby w przedziale wiekowym 18-40 lat. W grupie drugiej (2) znalazły się osoby od 40

do 69 roku życia. Analiza danych dotyczyła utraty masy ciała oraz procentowej utraty nadmiaru wyjściowego BMI (%EBMIL) (*Metodologia prezentacji wyników...* 2015). Obserwację przeprowadzono na przestrzeni 12 miesięcy. Dane zbierano podczas osobistych i telefonicznych konsultacji po sześciu miesiącach oraz po 12 miesiącach od operacji.

Wzór na wskaźnik masy ciała (BMI):

$$BMI = \frac{\text{masa ciała [kg]}}{\text{wzrost[m}^2\text{]}}$$

Wzór na procentową utratę nadmiaru wyjściowego BMI (%EBMIL):

$$\%EBMIL = 100 - \frac{\text{obecny BMI} - 25}{\text{początkowe BMI} - 25} \times 100\%$$

Źródło: Metodologia prezentacji wyników..., 2015.

Wyniki

W grupie respondentów większość stanowiły kobiety 79,11% (n=125), mężczyźni 20,89% (n=33). W grupie pacjentów poddanych retrospektywnemu badaniu poniżej 40 roku życia znalazło się 50,63% osób (n=80), a w grupie równej lub powyżej 40 roku życia – 49,37% pacjentów (n=78). Pacjenci zaliczeni do grupy młodszej przed operacją ważyli średnio 125,63 kg (OS 22,48), natomiast starsi – 129,02 kg (OS 21,90). W grupie młodszej po sześciu miesiącach od zabiegu średni spadek masy ciała wynosił 31,16 kg (OS 15,97) i był o 2,69 kg większy niż w grupie starszej [średnia utrata masy ciała wynosiła 28,47 kg (OS 15,80)]. Po 12 miesiącach respondenci należący do grupy młodszej stracili średnio 44,19 kg (OS 18,03). Pacjenci starsi po upływie dwunastu miesięcy stracili średnio o 3,97 kg mniej [średnio 40,22 kg (OS 17,63)]. Biorąc pod uwagę %EBMIL również w tym przypadku wartości były wyższe w młodszej grupie – po sześciu miesiącach pacjenci tracili średnio 62% (OS 29) wyjściowego BMI [o 8% więcej od osób powyżej i/lub w wieku 40 lat, którzy średnio tracili 54% (OS 29) swojego wyjściowego BMI]. Po 12 miesiącach młodzi pacjenci

Tabela 3. Utrata masy ciała u pacjentów objętych badaniem.

Wiek	18-39	40+
Średnia masa wyjściowa	125,63 kg	129,02 kg
Średnia Δ%BMIL		
Po 6 miesiącach	62%	54%
Po 12 miesiącach	87%	73%

Źródło: Opracowanie własne

tracili 87% (OS 32) wyjściowego BMI, a pacjenci starsi o 14% mniej, czyli 73% (OS 32) swojego wyjściowego BMI (tabela 3).

Dyskusja

Jednym z istotnych problemów zdrowotnych współczesnych czasów jest niewątpliwie otyłość, stanowiąca zagrożenie dla zdrowia i życia. Osoby otyłe częściej chorują na cukrzycę oraz nadciśnienie tętnicze. Nadmierna masa ciała może prowadzić również do miażdżycy, choroby wieńcowej, niewydolności krążeniowo-oddechowej. Zaprezentowane wyniki badania obrazują występowanie otyłości u osób w różnym wieku i różnej płci.

Otyłość jest chorobą, u podstaw której poza błędami metabolicznymi stoją kwestie społeczne i ekonomiczne. Medycyna stale stara się znaleźć odpowiedź na pytanie, która metoda radzenia sobie z tą przypadłością jest najlepsza (*Obesity as a social disease...*, 2010). Liczne badania na świecie wskazują, iż najskuteczniejszą metodą leczenia otyłości patologicznej jest chirurgia bariatryczna (*The impact of bariatric...*, 2015). Wyniki uzyskane w naszym badaniu w trakcie krótkoterminowej obserwacji (po sześciu miesiącach obserwacji w grupie młodszej średni spadek masy ciała wynosił 31,16 kg, a w starszej – 28,47 kg) zdają się potwierdzać te doniesienia. SG pozwala uzyskać satysfakcjonujące wyniki utraty masy ciała.

Utracony % nadmiaru masy ciała (%EWL) uzyskany przez pacjentów objętych naszym badaniem w czasie 6-miesięcznej obserwacji jest dobry – powyżej 50%. Wynosił on odpowiednio w grupie młodszej 62%, w grupie starszej 54%. W odniesieniu do wyników uzyskanych przez pacjentów leczonych w innych jednostkach medycznych na terenie Polski, pacjenci po półrocznej obserwacji osiągnęli %EWL na poziomie $56,32 \pm 15,93$ (kobiety) oraz $49,09 \pm 16,25$ (mężczyźni) (*Gender-related metabolic outcomes...*, 2019).

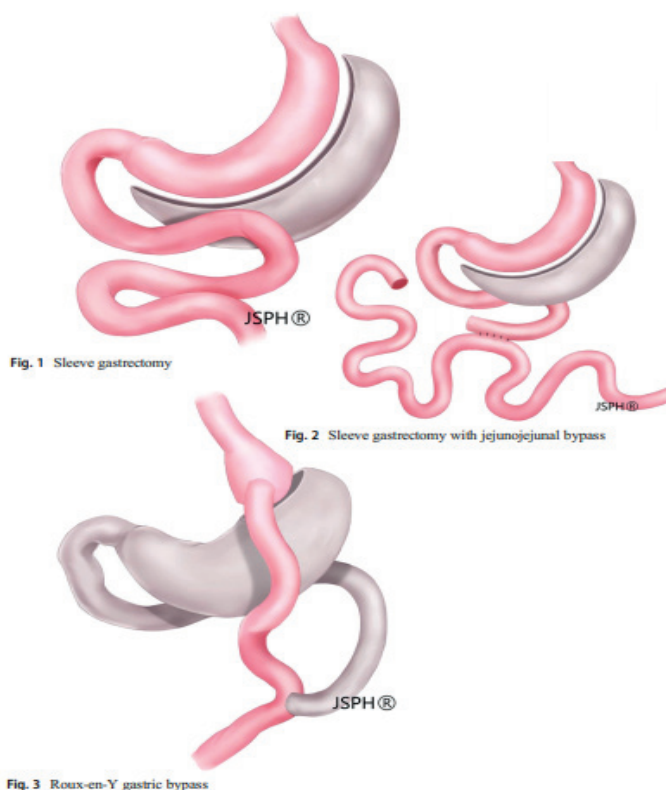
Analizy danych przeprowadzone w innych ośrodkach wykazują znaczną utratę masy ciała u pacjentów poddanych chirurgicznemu leczeniu otyłości w pierwszym roku po operacji. Również %EBMIL w ciągu pierwszego roku od operacji ulega znacznym ewolucjom wyników. Odnotowano szybki wzrost tego parametru u wszystkich pacjentów poddanych metaanalizie. Jednakże zauważono również różny stopień przyrostu %EBMIL w zależności od wyjściowego BMI pacjenta poddanego SG. Pacjenci z BMI < 40 kg/m² osiągnęli najwyższą dynamikę wzrostu %EBMIL w stosunku do innych pacjentów z wyższym początkowym BMI. Wartości te były też wyższe niż średnia %EBMIL z wyników wszystkich pacjentów biorących udział w badaniu. Pacjenci z BMI w przedziale 40-50 kg/m² osiągnęli niższe przyrosty %EBMIL niż po-

przednia grupa, a chorzy z BMI > 50 kg/m² wykazywali najniższą dynamikę wyników (Hoyuela 2017).

Przeprowadzona seria operacji cechowała się zerową śmiertelnością. Wynik ten nie jest zaskakujący. W ostatnich latach SG zyskuje na popularności ze względu na niski wskaźnik powikłań, będący konsekwencją, między innymi stosunkowo prostej techniki operacyjnej (Hoyuela 2017). Literatura podaje, iż ryzyko śmierci w okresie 30 dni od operacji wynosi od około 0,08% do 0,33%. Wśród najczęstszych powikłań pooperacyjnych wskazuje się natomiast na: objawowy refluks żołądkowo-przełykowy, krwotok odcinkowy jak również przeciek w linii zszywek.

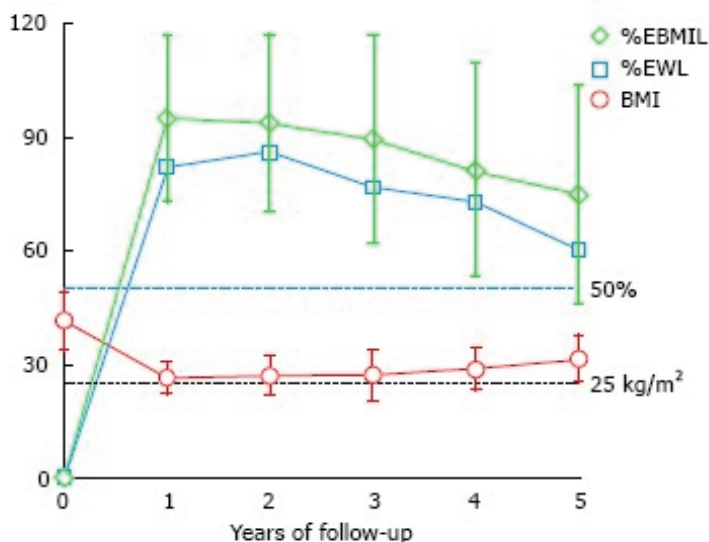
Pacjenci objęci naszym badaniem poddani zostali operacji SG, jednakże w środowisku chirurgii bariatrycznej nadal toczy się dyskusja na temat najskuteczniejszej z dostępnych technik operacyjnych (rysunek 1) w kontekście redukcji nadmiaru masy ciała. Pacjenci ujęci w naszym badaniu osiągnęli po

Rysunek 1. Techniki operacyjne w chirurgii bariatrycznej.



Źródło: *Short-Term Outcomes of Sleeve...*, 2019

Wykres 1. Ewolucja wskaźnika masy ciała, utraty wagi i utraty nadmiaru masy ciała podczas obserwacji.



BMI wskaźnik masy ciała, %EWL: procent utraty nadwagi; %EBMIL: procent utraty nadmiaru BMI

Źródło: Hoyuela 2017

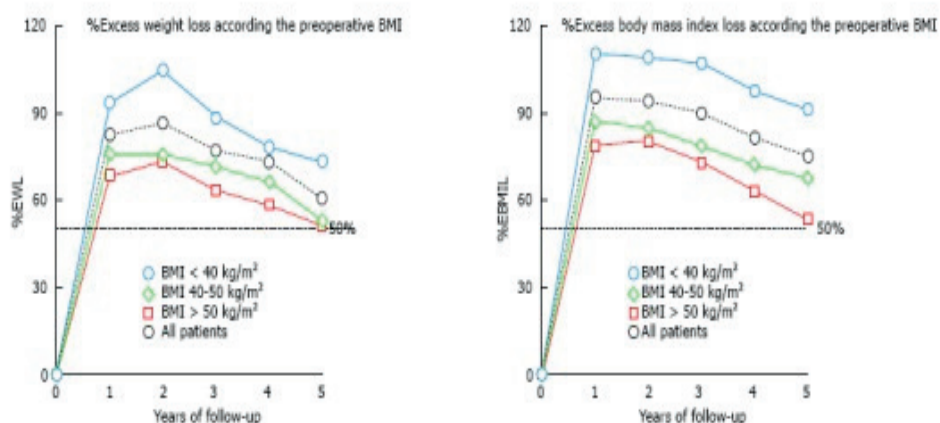
roku %EWL (73% – pacjenci ≥ 40 roku życia, 87% – pacjenci < 40 roku życia) tożsamy z rezultatami osiąganymi w innych jednostkach operujących techniką SG (*Short-Term Outcomes of Sleeve...*, 2019).

Chirurgia bariatryczna zapewnia satysfakcjonujące wyniki dla pacjentów w podeszłym wieku. Zarówno młodszy, jak i starsi pacjenci objęci naszą analizą odnieśli korzyść terapeutyczną po zabiegu SG. Wyższe wskaźniki powikłań pooperacyjnych przypisuje się natomiast grupom pacjentów, którzy podchodzą do zabiegu obciążeni chorobami współistniejącymi (*Bariatric surgery in older...*, 2019). Należy zatem kontynuować długoterminowe kontrolne badania obejmujące większe grupy pacjentów w celu wyodrębnienia grup, którym SG przynieść może największą korzyść.

Podsumowanie

Wyniki przeprowadzonej analizy obrazują, że w grupie pacjentów poniżej 40 roku życia średni spadek masy ciała oraz %EBMIL były wyższe w porów-

Wykres 2. Ewolucja %EWL i %EBMIL zgodnie z przedoperacyjnym wskaźnikiem masy ciała.



BMI: wskaźnik masy ciała; %EWL: procent utraty nadwagi; %EBMIL: procent utraty nadmiaru wskaźnika masy ciała

Źródło: Hoyuela 2017

naniu z pacjentami powyżej tej granicy wiekowej. Zauważyć można, że wraz z upływem czasu różnica danych wartości pomiędzy obiema grupami rosła.

Literatura:

- Banegas J. R., López-García E., Gutiérrez-Fisac J. L., Guallar-Castillón P., Rodríguez-Artalejo F. 2003. A simple estimate of mortality attributable to excess weight in the European Union. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 57: 201-208.
- Binda A., Jaworski P., Ciesielski A., Tarnowski W. 2015. Metodologia prezentacji wyników chirurgicznego leczenia otyłości. *Borgis - Postępy Nauk Medycznych*, s. 656-661.
- Dowgiałło-Wnukiewicz N., Janik M., Lech P., Major P., Pędziwiatr M., Kowalewski P., Wałędziak M., Wysocki M., Michalik M. 2019. Outcomes of Sleeve Gastrectomy in Patients Older Than 60 Years: A Multicenter Matched Case-Control Study, *Wideochir Inne Tech Małoinwazyjne*, 15(1): 123-128
- El-Matbouly, M. A., Khidir, N., Touny, H. A., El Ansari, W., Al-Kuwari, M., Bashah, M. 2017. A 5-Year Follow-Up Study of Laparoscopic Sleeve Gastrectomy Among Morbidly Obese Adolescents: Does It Improve Body Image and Prevent and Treat Diabetes? *Obes. Surg.*, 28(2): 513-519.

- Fried M., Hainer V., Basdevant A., Buchwald H., Deitel M., Finer N., Widhalm, K., Interdisciplinary European Guidelines for Surgery for Severe (Morbid) Obesity. *Obes. Surg.*, 17(2): 260-270.
- Gagner M., Deitel M., Erickson A. L., Crosby R. D. 2013. Survey on laparoscopic sleeve gastrectomy (LSG) at the Fourth International Consensus Summit on Sleeve Gastrectomy. *Obes. Surg.*, 23(12): 2013-2017.
- Groth, D., Woźniewska, P., Olszewska, M., Zabielski, P., Ladny, J. R., Dadan, J., Razak Hady, H. 2019. Gender-related metabolic outcomes of laparoscopic sleeve gastrectomy in 6-month follow-up. *Videosurgery and Other Miniinvasive Techniques*.
- Hady H. R., Zbucki R, Luba M. 2010. Obesity as a social disease and the influence of environmental factors on BMI in own material. *Adv. Clin. Exp. Med.*, 19: 368-378.
- Hoyuela C. 2017. Five-year outcomes of laparoscopic sleeve gastrectomy as a primary procedure for morbid obesity: A prospective study. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 9(4): 109.
<https://asmbs.org/> (dostęp 30 marca 2020 r.).
- James W. P. 2008. The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J. Intern. Med.*, 263: 336-352.
- Jarzynkowski P., Książek J., Piotrkowska R. 2016. Chirurgiczne leczenie otyłości – rola i zadania zespołu interdyscyplinarnego. *Piel. Zdr. Publ.*, 6(4): 323-329.
- Jastrzebska-Mierzynska M, Ostrowska L, Hady HR. 2015. The impact of bariatric surgery on nutritional status of patients. *Videosurgery Miniinv*; 10: 115-24
- Kalinowski P., Paluszkiwicz R., Krawczyk M. 2013. Operacyjne leczenie otyłości – co powinni wiedzieć internści i lekarze rodzinni. *Medycyna praktyczna dla lekarzy*.
- Lin S., Guan W., Yang N., Zang Y., Liu R., Liang H. 2019. Short-Term Outcomes of Sleeve Gastrectomy plus Jejunojunal Bypass: a Retrospective Comparative Study with Sleeve Gastrectomy and Roux-en-Y Gastric Bypass in Chinese Patients with BMI ≥ 35 kg/m². *Obes. Surg.*
- Olszanecka-Glinianowicz M. 2017. Leczenie farmakologiczne otyłości w świetle aktualnych wytycznych. *American Association of Clinical Endocrinologists i American College of Endocrinology. Med. Prakt.*, 1: 52-61
- Susmallian, S., Raziell, A., Barnea, R., Paran, H. 2019. Bariatric surgery in older adults. *Medicine*, 98(3): e13824.
- Tarnowski W., Jaworski P. 2018. Operacje bariatryczne w praktyce. *Via Medica*
- WHO. 2000. Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. Geneva, WHO Technical Report Series 894.
- WHO. 2003. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. Technical Report Series, No 916, Geneva.

ABSTRACT

OUTCOMES OF BARIATRIC SURGERY IN DIFFERENT AGE GROUPS

Sleeve gastrectomy (SG) is nowadays the most common procedure around the world. The results of weight loss after this procedure may depend on the age.

The aim of the study is to compare the results of surgical treatment of obesity regarding patients in different age groups.

158 patients underwent sleeve gastrectomy in the years 2016-2017 at the Department of General, Minimally Invasive and Elderly Surgery in Olsztyn. The subjects were divided into two age groups: below and above 40 years old. The analysis concerned weight loss and percentage of excess BMI loss (%EBMIL) collected during personal and telephone consultations.

There were 80 patients in the group under 40 and 78 patients in the group above 40 years old. In the younger group, 6 months after surgery, the average weight loss was 2.69 kg greater than in the older, while after 12 months the difference was 3.97 kg. Considering %EBMIL, also in this case the values were higher in the younger group – after 6 months 8%, and after 12 months 14%.

SG is an effective treatment for obesity regardless of age. However, in the group of patients under 40 years old the results were better compared to patients above the age limit.

Słowa kluczowe: otyłość, wiek, leczenie chirurgiczne

Keywords: obesity, age, surgical treatment

Dane do kontaktu z autorem:

kinga.kondrat@wp.pl

tel: 605 088 233

SEKCJA NAUK O ZDROWIU

Angelika Jankowska, Patrycja Jankowska, Kinga Żukowska
Państwowa Szkoła Wyższa im. Papieża Jana Pawła II w Białej Podlaskiej
Wydział Nauk o Zdrowiu
Studenckie Koło Naukowe „eRka”
Opiekun: dr n. o zdr. Martyna Krukowska

WIZERUNEK PIELĘGNIARSTWA W OPINII SPOŁECZEŃSTWA

Wstęp

Opieka pielęgniarska to jeden z obszarów świadczenia usług zdrowotnych, który przebiega w bezpośrednim kontakcie z pacjentem. Wszelkie działania wykonywane przez pielęgniarkę opierają się na funkcji łącznika pomiędzy pacjentem, jego środowiskiem i rodziną a pozostałymi członkami zespołu terapeutycznego (Jurkiewicz, Konos 2017).

W dostępnym piśmiennictwie istnieje wiele interpretacji terminu pielęgnowania, które zmieniają się wraz ze zmianami socjoekonomicznymi i rozwojem otoczenia (Ślusarska i in. 2008).

Międzynarodowa Rada Pielęgniarek określa pielęgnowanie jako „pomaganie człowiekowi zdrowemu lub choremu (grupie ludzi) w wykonywaniu czynności znaczących dla utrzymania zdrowia lub jego odzyskania (także dla zapewnienia spokojnej śmierci), które mógłby on wykonać sam, gdyby miał potrzebną do tego siłę i wiedzę. Świadczenie tej pomocy winno jak najszybciej doprowadzić do usamodzielnienia człowieka.” (Górajek-Jóźwik 2004).

W XIX wieku, uważanym za czas powstawania pielęgniarstwa, działania wykonywane przez tę grupę ograniczane były do działań opiekuńczych, opierających się na pomocy przy zaspokajaniu podstawowych potrzeb pacjenta (Jurkiewicz, Konos 2017).

Intensywny rozwój sprawił, że pielęgniarstwo obecnie stanowi samodzielny zawód. Zawód regulowany jest Ustawą o zawodach pielęgniarki i położnej (Ustawa z dnia 5 lipca 1996 r. o zawodach pielęgniarki i położnej Dz.U. 1996 nr 91 poz. 410). Działania pielęgniarskie opierają się na funkcjach

zawodowych, takich jak: diagnostyczna, opiekuńczo-terapeutyczna, rehabilitacyjna, edukacyjna, profilaktyczna, wychowawcza, naukowo-badawcza, a także promocji zdrowia. Realizacja tych funkcji działa w sferze pacjenta, jego bliskich i środowiska. Współczesne pielęgniarstwo poprzez realizację swoich zadań dąży do rozwoju nauki o pielęgnowaniu i własnego zawodu (Ślusarska i in. 2008).

Rozwój pielęgniarstwa wymusił zmiany w funkcjonowaniu, głównie w systemie kształcenia pielęgniarek i położnych. Uzyskane przez pielęgniarki prawo do wykonywania zawodu respektowane jest we wszystkich krajach UE. Zmiany te znacznie poprawiają jakość oraz profesjonalizm w świadczeniu usług pielęgniarstkich (Siwek, Nowak-Starz 2017).

Pielęgniarstwo jest zwodem w pełni samodzielnym, posiada swój samorząd w postaci Izb Pielęgniarskich. Pielęgniarki przysługują także ochrona, tak jak funkcjonariuszowi publicznemu, podczas i w związku z wykonywaniem czynności polegających na udzielaniu świadczeń zdrowotnych wymienionych w Ustawie o zawodach pielęgniarstkich i położnej (Ustawa o zawodach pielęgniarstkich i położnej Dz.U. 2011 Nr 174poz. 1039 z późn. zm.).

Według badań CBOS, zaliczenia jakiegoś zawodu do grona zawodów zaufania publicznego wymaga spełnienia następujących kryteriów: jest to zawód, który pełni istotną rolę dla ogółu społeczeństwa, charakteryzuje się wysoką jakością świadczonych usług, przedstawiciele cechuje nienaganna postawa etyczna i moralna oraz obowiązuje tajemnica zawodowa, między klientem a osobą wykonującą dany zawód powinna istnieć szczególna więź zaufania (Badora, Roguska 2004).

Celem przeprowadzonych badań było poznanie poziomu wiedzy społeczeństwa zamieszkałego we wschodniej części Polski na temat funkcjonowania, prestiżu oraz zaufania do zawodu pielęgniarki.

Material i metody

Badaniem objęto 215 osób, w tym 175 kobiet (81%) oraz 40 mężczyzn (19%), zamieszkałych w województwie podlaskim, lubelskim oraz we wschodniej części województwa mazowieckiego. Badania zostały zrealizowane na przełomie grudnia i stycznia 2019-2020. Dane dotyczące wieku, płci, wykształcenia, miejsca zamieszkania, stanu cywilnego, źródła utrzymania przedstawiono w tabeli 1. Charakterystyka grupy badanej przedstawia się następująco: największą grupę stanowiły osoby w wieku 18-30 lat (66%), 58% badanych to osoby stanu wolnego, 51% posiada wykształcenie wyższe, 41% zamieszkuje w miastach do 100 tys. mieszkańców.

Tabela 1. Charakterystyka grupy badawczej.

Lp.	Analiza zmiennych N		Łącznie	
			%	
1.	Płeć	Kobieta	175	81
		Mężczyzna	40	19
2.	Wiek	18-30	143	66
		31-40	35	16
		41-50	14	6
		51-60	16	7
		61 i więcej	7	3
3.	Stan cywilny	Panna/ kawaler	124	58
		Mężatka/ żonaty	78	36
		Wdowa/ wdowiec	6	3
		Separacja/ rozwód	7	3
4.	Miejsce zamieszkania	Wieś	59	27
		Miasto do 100 tys. mieszkańców	87	41
		Miasto powyżej 100 tys. mieszkańców	69	32
5.	Wykształcenie	Podstawowe	8	3
		Zawodowe	12	6
		Średnie	86	40
		Wyższe	109	51
6.	Źródło utrzymania	Praca zarobkowa	125	58
		Wsparcie od rodziny	53	25
		Renta	9	4
		Emerytura	8	4
		Zasiłki	4	2
		Stypendia	16	7

Źródło: Opracowanie własne

Do przeprowadzenia badania zastosowano metodę sondażu diagnostycznego, przy użyciu kwestionariusza ankiety własnego autorstwa. Badani udzielali anonimowych odpowiedzi na 29 pytań, przez co wyrażali swoje opinie na temat prestiżu zawodowego, zaufania publicznego oraz posiadanej wiedzy dotyczącej funkcjonowania pielęgniarstwa w Polsce. W opracowaniu danych wykorzystano Microsoft Office Excel.

Wyniki badań

W jednym z pytań respondentom zostały przedstawione trzy definicje pojęcia „pielęgniarstwo”. 63% (n=135) spośród badanych odpowiedziało, iż jest to termin stosowany do określenia różnego rodzaju zadań i działań zawodowych pielęgniarki oraz sztuki, wiedzy i nauki z tą działalnością związanych. Najbardziej wybieraną odpowiedzią 12% (n=26) było określenie, iż jest to zawód o charakterze opiekuńczym.

W kolejnym pytaniu uczestnicy badania byli poproszeni o wybranie najtrafniejszej według nich definicji określających pojęcie „pielęgnowanie”. Najwięcej badanych, 52% (n=112), uznało pielęgnowanie za pomaganie człowiekowi zdrowemu lub choremu w wykonywaniu czynności znaczących dla utrzymania zdrowia lub jego odzyskania. Najmniej ankietowanych zdefiniowało pielęgnowanie, 7,4 % (n=16), jako wykonywanie zleconych przez lekarza działań wobec chorego.

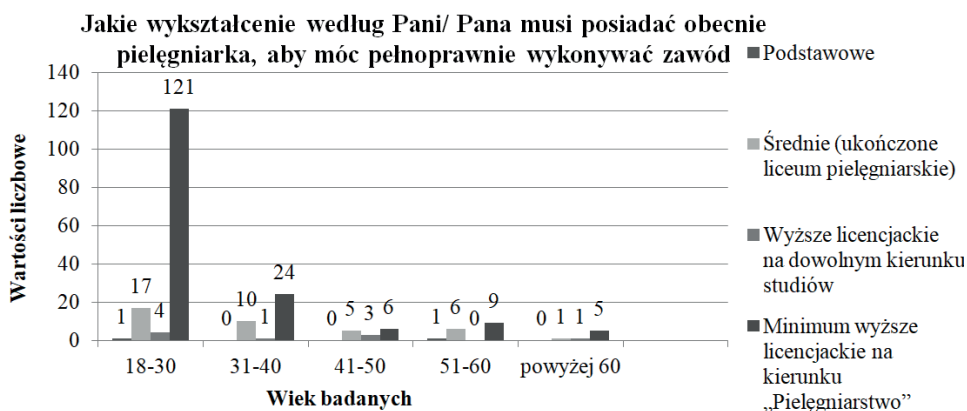
Następne pytanie miało ujawnić poglądy ankietowanych na temat istoty pracy pielęgniarek. 64% (n=137) respondentów stwierdziło, iż jest to pomaganie choremu, a 55% (n=119) asystowanie lekarzowi. Co czwarty badany za istotę pracy pielęgniarek uważa wspieranie i edukowanie pacjenta oraz jego bliskich.

W kolejnym z pytań przedstawiono ankietowanym różne rodzaje odpowiedzialności. Zadaniem respondentów było wskazanie, którym rodzajom odpowiedzialności podlegają pielęgniarki w Polsce. Wśród najczęściej wskazywanych odpowiedzi były: odpowiedzialność prawna (n=193) oraz moralna (n=187). Respondenci uznali, że pielęgniarki nie podlegają odpowiedzialności: materialnej (n=58) oraz cywilnej (n=17). Najwięcej wątpliwości wśród ankietowanych wzbudziło podleganie pielęgniarek pod odpowiedzialność cywilną (n=37) oraz karną (n=27).

Na pytanie dotyczące wykształcenia, które musi posiadać pielęgniarka, aby uzyskać prawo wykonywania zawodu 79% (n=169) ankietowanych podało wykształcenie minimum wyższe licencjackie na kierunku pielęgniarstwo. Natomiast 17% (n=36) uważa, że współczesne pielęgniarki mogą posiadać wykształcenie średnie (ukończone liceum pielęgniarstwie). Zależności odpowiedzi na to pytanie w stosunku do wieku badanych uwzględniono na rycinie 1.

W omawianych badaniach zapytano także respondentów, jaki tytuł zawodowy może posiadać współczesna pielęgniarka. Najliczniej 33% (n=72) badanych wskazywało na tytuł licencjata, magistra i specjalisty określonej dziedziny pielęgniarstwa. Aż 15% (n=33) uważa, że współczesna pielęgniarka może osiągnąć maksymalnie tytuł licencjata. 28% ankietowanych (n=61) stwierdziło, iż współczesne pielęgniarki mogą osiągnąć następujące tytuły naukowe: tytuł

Rycina 1. Ocena wiedzy badanych na temat poziomu wykształcenia pielęgniarek.



Źródło: Opracowanie własne

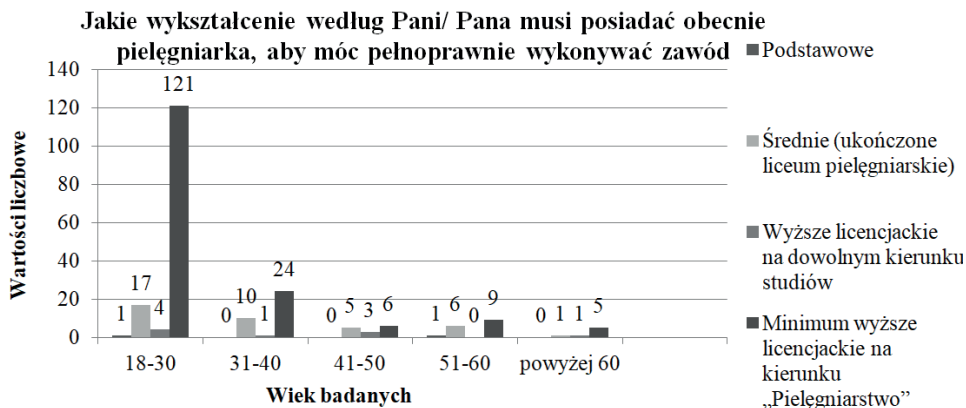
licencjata, magistra, specjalisty określonej dziedziny pielęgniarstwa, a także doktora nauk o zdrowiu lub doktora nauk medycznych.

W kolejnym pytaniu przedstawiono badanym listę różnorodnych zadań pielęgniarckich. Zadaniem ankietowanych było ustosunkowanie się do wymienionych kolejno zadań pielęgniarckich odpowiedziami „tak”, „nie” lub „nie wiem”, w zależności od tego, czy ich zdaniem pielęgniarka wykonuje dane czynności. Wśród najczęściej wskazywanych zadań pielęgniarek były: czynności opiekuńcze ($n=206$), dokumentowanie swoich działań ($n=203$) oraz podnoszenie swoich kwalifikacji ($n=200$). Respondenci uznali, że do zadań pielęgniarki nie należy: rozpoznawanie, planowanie i rozwiązywanie problemów chorego ($n=91$) oraz samodzielne udzielanie w określonym zakresie świadczeń zapobiegawczych, diagnostycznych, leczniczych, rehabilitacyjnych oraz medycznych czynności ratunkowych i zarządzanie nimi ($n=65$). Najwięcej wątpliwości wśród ankietowanych wzbudziło zadanie pielęgniarek dotyczące prowadzenie działalności naukowo-badawczej w dziedzinie nauk o zdrowiu/ nauk medycznych ($n=58$), edukacja chorego ($n=15$), wykonywanie badań w celu diagnostyki chorego ($n=15$) oraz promocja zdrowia ($n=10$).

W następnym pytaniu respondenci mieli za zadanie ocenę pozycji zawodowej pielęgniarek w Polsce w środowisku społecznym, poprzez wskazanie jednego wariantu spośród opcji: bardzo nisko, nisko, średnio, wysoko, bardzo wysoko. 65% ankietowanych ($n=140$) ocenia pozycję zawodową pielęgniarek w Polsce jako średnią, 3% ($n=7$) jako bardzo niską, a tylko 1% ($n=3$) jako bardzo wysoką.

Wśród badanych 70% ($n=151$) zadeklarowała zaufanie do personelu pielęgniarckiego podczas pobierania świadczeń zapobiegawczych, diagnostycznych,

Rycina 1. Ocena wiedzy badanych na temat poziomu wykształcenia pielęgniarek.



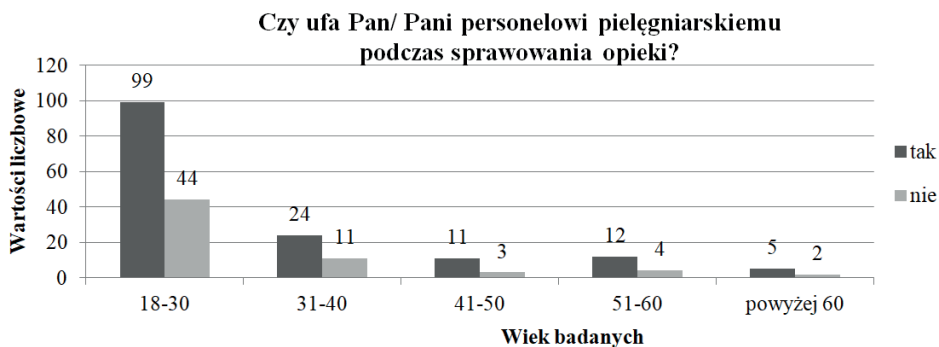
Źródło: Opracowanie własne

lecznicznych i rehabilitacyjnych. Zróżnicowanie odpowiedzi w stosunku do wieku badanych przedstawiono na rycinie 2.

Znaczna część ankietowanych – 93% (n=199) uważa, iż zawód pielęgniarki należy do grupy zawodów publicznego zaufania. Zdaniem 81% (n=174) respondentów pielęgniarki nie są prawidłowo wynagradzane za swoją pracę.

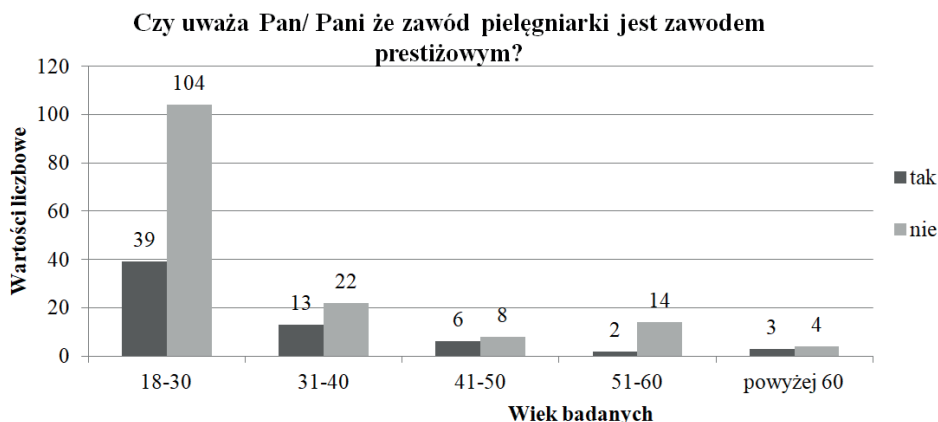
Zapytano także uczestników badania, czy uważają zawód pielęgniarki za prestiżowy. Tylko 30% (n=65) badanych twierdzi, iż zawód pielęgniarki jest zawodem prestiżowym, pozostali ankietowani 70% (n=150) nie podzielają tej opinii. Zależności odpowiedzi na to pytanie w stosunku do wieku respondentów przedstawiono w rycinie 3.

Rycina 2. Zdanie badanych na temat poziomu zaufania do personelu medycznego.



Źródło: Opracowanie własne

Rycina 3. Zdanie badanych na temat prestiżu zawodu pielęgniarki.



Źródło: Opracowanie własne

Przedstawiono badanym zestaw cech, którymi powinna charakteryzować się pielęgniarka: wysoki poziom wiedzy, doświadczenie, stałe podnoszenie kwalifikacji, samodzielność w działaniu, realizacja zleceń lekarskich, wsparcie, szacunek. Zadaniem ankietowanych było wskazanie tych najbardziej oczekiwanych. Wśród najczęściej wybieranych były: wysoki poziom wiedzy 46% (n=99) oraz szacunek 45% (n=97). Najrzadziej uwydatnianą cechą była: samodzielność w działaniach wskazana przez 5% (n=11) badanej grupy.

Wśród czynników wpływających na poprawę wizerunku pielęgniarek największy wpływ, według ankietowanych, mają posiadane kwalifikacje i stałe ich podnoszenie 81% (n=175), a także staż pracy – 52% (n=112).

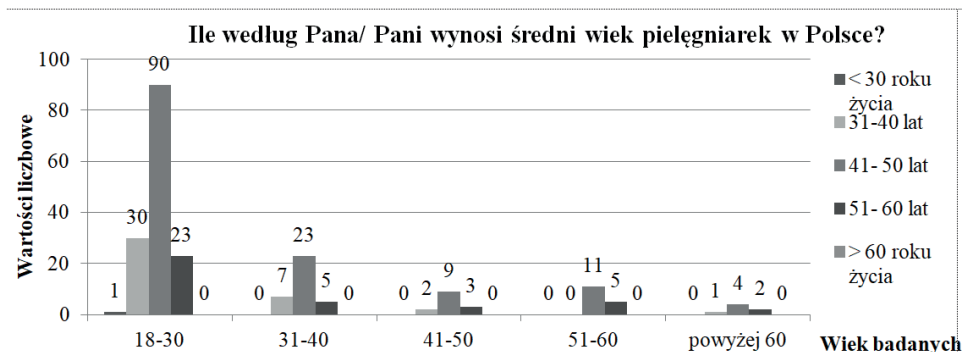
W celu sprawdzenia wiedzy ankietowanych dotyczącej funkcjonowania pielęgniarstwa w Polsce poproszono ich o wskazanie średniego wieku czynnie pracujących pielęgniarek. Zdaniem 65% (n=139) badanych, waha się on w przedziale wiekowym 41-50 lat. Zależności odpowiedzi na to pytanie w stosunku do wieku ankietowanych przedstawia rycina 4.

Zapytano ankietowanych, jakie zalety w ich opinii posiadają współczesne pielęgniarki. Respondenci najczęściej wskazali cechy takie jak: wszechstronność 37% (n=80), wysoki poziom wiedzy 35% (n=75), a także opiekuńczość 33% (n=70). Badani wskazali także wady, a wśród nich: brak czasu dla pacjenta i jego bliskich 42% (n=91), brak uprzejmości 36% (n=77) oraz obojętność 27% (n=58).

Respondenci ocenili swój poziom wiedzy na temat funkcjonowania pielęgniarstwa jako średni 59% (n=127) oraz niski 21% (n=45).

Poproszono ankietowanych, aby określili, skąd czerpią informacje dotyczące funkcjonowania pielęgniarstwa w Polsce. Wśród wymienionych propozycji

Rycina 4. Ocena badanych na temat średniego wieku pielęgniarki w Polsce.



Źródło: Opracowanie własne

najczęściej wskazywanymi odpowiedziami były: Internet 52% (n=11) oraz znajomi 46% (n=98), a najrzadziej: prasa 11% (n=24), a także książki medyczo-naukowe 14% (n=31). 45% spośród badanych potwierdziła, iż w swojej najbliższej rodzinie posiada pielęgniarkę.

Dyskusja

Minione lata przyniosły liczne zmiany w podejściu do ról i zadań, jakie pełnią pielęgniarki oraz oczekiwań i postrzegania ich zawodu przez społeczeństwo. Współczesne pielęgniarstwo nie jest już zawodem pomocniczym, pielęgniarki nie są już personelem średnim. Nowoczesne pielęgniarstwo to rozwój, podążanie za aktualnymi wytycznymi, to pasja i profesjonalizm. Pielęgniarstwo to nie służenie lub wyręczanie pacjenta, ale asystowanie, towarzyszenie mu, jego rodzinie oraz społeczeństwu w różnych sytuacjach.

Dotychczas podejmowano już próby badania opinii społecznej na temat funkcjonowania pielęgniarstwa oraz postrzegania go przez społeczeństwo, prowadzone badania obejmowały różnej liczebności grupy – od 80 do 1100 respondentów w różnych przedziałach wiekowych. Badanymi byli mieszkańcy miast, wsi, osoby pracujące zawodowo, studenci, emeryci, renciści oraz bezrobotni (Glińska, Lewandowska 2007; Gotlib, Łabęda 2008; Kądalska 2008; Malik 2009; Paluch, Strzelecki 2008; Siwek i in. 2012; Siwek, Nowak Starz 2017). Własnymi badaniami objęto grupę 215 ankietowanych o zbliżonych cechach do porównywanych grup badanych.

Analizując badania przeprowadzone w 2017 roku, biorąc pod uwagę tę samą charakterystykę grup badanych, stwierdzono, iż poziom wiedzy społeczeństwa na temat funkcjonowania pielęgniarstwa w Polsce nie jest wystarczający, a sami

badani oceniają ją na poziomie średnim lub niskim (Siwek, Nowak-Starz 2017). Podobny wynik wykazały badania własne.

Obserwacje własne, przeprowadzone wśród społeczeństwa zamieszkałego na wschodnim obszarze Polski dowiodły, iż zawód pielęgniarki należy do zawodów publicznego zaufania. Taki sam wynik osiągnęli Siwek, Dzierga, Chmiel, badając społeczeństwo zamieszkałe w Małopolsce (Siwek i in. 2012).

Z badań przeprowadzonych przez CBOS w 2004 roku wynika, że w Polsce zawód pielęgniarki jest jednym z tych, które zalicza się do zawodów zaufania społecznego. Na zaufanie to składa się wiele elementów, między innymi pewność, że osoby wykonujące ten zawód zachowują dobrą wolę, przykładają należyłą staranność oraz dbają o najistotniejsze wartości, jakimi są życie i zdrowie podopiecznych. Pielęgniarki cechują się wrażliwością na los drugiego człowieka, kierują się uniwersalnymi zasadami etycznymi, w tym: poszanowanie godności istoty ludzkiej, sprawiedliwości i odpowiedzialności moralnej, przestrzegają praw człowieka oraz jego autonomii. W pielęgniarstwie ważna jest także solidarność, gotowość niesienia pomocy i ofiarność. Pielęgniarstwo to również jedna z najliczniejszych grup zawodowych w naszym kraju (Badora, Roguska 2004).

Z analiz własnych wynika, że respondenci w wieku od 18 do 30 lat, najchętniej zaliczają pielęgniarstwo do zawodów publicznego zaufania, u Stachoń oraz Rybki byli to badani w przedziale wiekowym 31-50 lat (Stachoń, Rybka 2016).

Analiza zgromadzonych badań ilościowych potwierdza wyniki badań własnych dotyczących czynników wzmacniających wizerunek pielęgniarek w Polsce. Sobczak i Kamińska w opublikowanych przez siebie wynikach ukazały, iż na poprawę wizerunku pracujących pielęgniarek wpływa stałe podnoszenie ich kwalifikacji zawodowych (Sobczak, Kamińska 2012). Na profesjonalizm w pracy pielęgniarki, według respondentów, znaczący wpływ ma wysoki poziom umiejętności, doświadczenie zawodowe, samodzielność, co potwierdzają badania przeprowadzone w 2008 roku przez Kądalską oraz Palucha i Strzeleckiego (Kądalska 2008; Paluch, Strzelecki 2008).

Porównując dostępne wyniki opublikowane przez CBOS z badaniami własnymi, nie stwierdzono znaczących zmian. W badaniach opublikowanych w 2019 roku pielęgniarstwo znalazło się na drugiej pozycji za strażakami wśród zawodów godnych uznania. Pielęgniarka cieszy się wysokim poważaniem wśród społeczeństwa. Znaczna większość badanych uważa jednak, iż jest on zbyt mało wynagradzany zawodem (Omyła-Rudzka 2019).

Z informacji zebranych przez Mędrzycką-Dąbrowską wynika, iż najmłodsza grupa badanych ocenia zawód pielęgniarki na najniższym poziomie prestiżu zawodowego (Mędrzycka-Dąbrowska i in. 2012). Potwierdzenie tego stanu zaobserwowano w badaniach własnych.

Z badań własnych wynika, że społeczeństwo nie jest w stanie jednoznacznie określić średniego wieku pielęgniarek pracujących w Polsce. Podobne wnioski wyciągnęły także Siwek i Nowak-Starz w opublikowanych przez siebie badaniach (Siwek, Nowak-Starz 2017).

Obecnie z dostępnych danych Naczelnej Rady Pielęgniarek i Położnych wynika, iż średni wiek pielęgniarki pracującej w Polsce to 48 lat (NIPIP 2015).

Pielęgniarki w pracy narażone są na zagrożenie utraty zdrowia w następstwie czynników: biologicznych, chemicznych, podlegają też obciążeniom emocjonalnym, przeciążeniom własnego organizmu pod wpływem nadmiaru obowiązków podczas pełnionej dyżuru. Uwarunkowania te sprawiają, że zawód ten uważany jest przez młode społeczeństwo za mało atrakcyjny. Może spowodować to nienaturalne zastąpienie pokoleniowe w zawodzie (Siwek, Nowak-Starz 2017).

Opublikowane przez Siwek, Chmiel, Dziergę badania wykazują, że dokumentowanie działań pielęgniarskich nie należy do działań pielęgniarki. Badania własne ukazały odmienne stanowisko (Siwek i in. 2012).

Według badań własnych oraz tych przeprowadzonych przez Siwek, Chmiel, Dziergę wynika, że najważniejszą cechą pielęgniarki jest opiekuńczość (Siwek i in. 2012). Zdaniem Ciechaniewicz na opiekuńczość składają się: zapewnienie odpowiednich warunków do utrzymywania funkcji biologicznych pacjenta; troska o aktywności życia codziennego, dbanie o komfort w sferze biologicznej, psychicznej, społecznej, duchowej i kulturowej; łagodzenie reakcji pacjenta na zastosowane diagnozowanie, leczenie i rehabilitację poprzez wsparcie przy radzeniu sobie z lękiem, bólem, strachem czy niskim samopoczuciem; pomoc w zaaklimatyzowaniu się chorego w instytucji opiekuńczej lub ochrony zdrowia; a w razie potrzeby wskazanie grupy wsparcia i ułatwienie kontaktu i wejścia do niej (Ciechaniewicz 1997).

Na podstawie analizy zebranych materiałów i wyników własnych autorzy wnioskują, że wiedza dotycząca funkcjonowania pielęgniarstwa w Polsce wymaga stałej obserwacji, podejmowania prób jej pogłębiania oraz kontynuacji badań w tym obszarze.

Podsumowanie i wnioski

1. Poziom wiedzy społeczeństwa na temat funkcjonowania pielęgniarstwa w Polsce nie jest zadowalający.
2. Znaczna większość ankietowanych za istotę działań pielęgniarskich podaje działania opiekuńcze, a także asystowanie lekarzowi, nie identyfikując zarazem działań pielęgniarskich z rolą edukatora, naukowca, bądź też osoby promującej zdrowie.

3. Zawód pielęgniarki w opinii badanych jest uważany za zawód publicznego zaufania społecznego.
4. Niewielka część (zaledwie ok. 1/3) ankietowanych uważa zawód pielęgniarki za prestiżowy, a pozycję zawodową pielęgniarek w Polsce większość respondentów ocenia jako średnią.

Literatura:

- Badora B., Roguska B. 2004. Opinia społeczna na temat zawodów zaufania publicznego. Komunikat z badań, BS/73/2004, Centrum Badania Opinii Społecznej, Warszawa, https://www.cbos.pl/SPISKOM.POL/2004/K_073_04.PDF (dostęp: 11.06.2020).
- Omyła-Rudzka M. 2019. Komunikat z badań Nr 157/2019 Które zawody uważamy? Centrum Badania Opinii Społecznej, Warszawa. https://www.cbos.pl/SPISKOM.POL/2019/K_157_19.PDF (dostęp: 15.01.2020).
- Ciechaniewicz W. 1997. Funkcje zawodowe pielęgniarek, cz. III. Funkcja opiekuńcza. *Pielęgniarstwo* 2000, 5 (34): 19-22.
- Glińska J., Lewandowska M. 2007. Autonomiczność zawodu pielęgniarskiego w świadomości pielęgniarek z uwzględnieniem pełnionych funkcji zawodowych. *Problemy Pielęgniarstwa*, 5:249-253.
- Gotlib J., Łabęda W. 2008. Postrzeganie zawodu pielęgniarki/ pielęgniarskiego przez studentów Akademii Medycznej w Warszawie. *Pielęgniarstwo XXI wieku*, 1:25-30.
- Górajek-Jóźwik J. 2004. Działalność praktyczna w pielęgniarstwie. [w:] *Pielęgniarstwo Ćwiczenia*. PZWL, 44.
- Jurkiewicz A., Konos E. 2017. Opinia pacjentów na temat pracy pielęgniarek. *Pielęgniarstwo Polskie*, 3(65): 473-480.
- Kądalska E., Fronczyk K., Wrońska I. 2008. Postrzeganie zawodu pielęgniarki przez studentów studiów licencjackich. *Pielęgniarstwo XXI wieku*, 1-2: 115-119.
- Kieczka K. 2010. Kompetencje polskiej pielęgniarki. *Magazyn Pielęgniarki i Położnej*, 11: 10-11.
- Malik M. 2009. Zawód pielęgniarki w opinii studentów medycyny. *Pielęgniarstwo XXI wieku*, 3: 23-30.
- Mędrzycka-Dąbrowska W., Bąkowska G., Kwiecień-Jaguś K., Gaworska-Krzemińska A. 2012. Postrzeganie zawodu pielęgniarki przez młodzież szkół ponadgimnazjalnych jako wybór przyszłego zawodu – doniesienia wstępne. *Problemy Pielęgniarstwa*, 20(2): 192-200.
- Naczelna Izba Pielęgniarek i położnych, Raport Naczelnej Rady Pielęgniarek i Położnych, Zabezpieczenie Społeczeństwa Polskiego w Świadczenia Pielęgniarek i Położnych, 2015, <http://arch.nipip.pl/> (data dostępu: 15.01.2020).

- Paluch J., Strzelecki W. 2008. Ocena świadomości potocznej na temat zawodu pielęgniarki i zawodu położnej. *Pielęgniarstwo Polskie*, 1: 38-44.
- Siwek M., Chmiel I., Dzierga K. 2012. Postrzeganie zawodu pielęgniarki przez społeczeństwo z województwa małopolskiego. *Pielęgniarstwo XXI wieku*, 4(41): 73-78.
- Siwek M., Nowak-Starz G. 2017. Współczesny wizerunek pielęgniarstwa w opinii społeczeństwa. *Pielęgniarstwo Polskie*, 3(65): 487-494.
- Sobczak M., Kamińska B. 2012. Poziom prestiżu zawodowego pielęgniarek w opinii wybranych grup. *Problemy Pielęgniarstwa*, 20(2): 218-222.
- Stachoń K., Rybka M. 2016. Pielęgniarstwo jako zawód publicznego zaufania w opinii pacjentów. *Innowacje w Pielęgniarstwie i Naukach o Zdrowiu*, 4(1): 26-31.
- Ślusarska B., Zarzycka D., Zahradniczek K. 2008. *Podstawy pielęgniarstwa*. Tom I. Czelej. Lublin, s. 125, 141, 325.
- Ustawa z dnia 5 lipca 1996 r. o zawodach pielęgniarki i położnej Dz.U. 1996 nr 91 poz. 410.
- Ustawa o zawodach pielęgniarki i położnej Dz.U. 2011 Nr 174 poz. 1039 z późn. zm.

ABSTRACT

IMAGINE OF NURSING IN THE SOCIETY'S OPINION

INTRODUCTION: In recent years, there have been changes regarding the functioning of nursing in Poland. They concern the education of nurses and the development of competences possessed by this professional group. As a consequence, it has also led to an increase in society's expectations of nurses.

AIM: The aim of the research was to find out the level of knowledge of society living in the eastern part of Poland about the functioning of nursing as well as the importance and social trust in this professional group.

MATERIAL AND METHODS: The study included 215 people. The study used the diagnostic survey method, and the research tool was the author's questionnaire, built of 29 questions. Microsoft Office Excel was used in processing the results.

RESULTS: The level of public knowledge regarding the functioning of nursing in Poland is not sufficient. Nursing is a profession of public trust, but it is not considered prestigious.

Słowa kluczowe: pielęgniarstwo, wizerunek zawodowy, opinia

Keywords: nursing, professional image, opinion

Dane do kontaktu z autorem:

Angelika Jankowska ul. 11 Listopada 37 d/15 17-300 Siemiatycze Tel. 669 773 613
e-mail: angelajankowska@wp.pl Zakład Pielęgniarstwa PSW w Białej Podlaskiej

Beata Józwiak

Akademia Wychowania Fizycznego im. Eugeniusza Piaseckiego w Poznaniu
Studenckie Koło Naukowe Promocji Zdrowia

Opiekun: dr hab. Ida Laudańska-Krzemińska

WIEDZA I ZWYCZAJE ŻYWIENIOWE ORAZ POGLĄDY NA TEMAT MITÓW ŻYWIENIOWYCH STUDENTÓW POLSKICH UCZELNI

Wstęp

Studia są dla wielu osób ostatnim etapem poświęconym na proces wychowawczy, podczas którego kształtują się różne preferencje i opinie, w tym także postawy zdrowotne (Waśkiewicz 2010). Oprócz tego, młodzież akademicka dużą część swojego czasu wolnego spędza na przeglądaniu stron internetowych, które przekazują nieprawdziwe i stereotypowe informacje na temat żywienia oraz niespełniające standardów rzetelności (Dziukiewicz 2018). Jednocześnie zarówno poziom, jak i jakość wiedzy i zwyczajów w zakresie żywienia przekładają się na zdrowie (Czarnocińska i in. 2016; Willett, Stampfer 2013).

Badania wskazują, że studenci często nie stosują zasad zdrowego odżywiania w życiu codziennym (Gawlikowska-Sroka i in. 2015; Laudańska-Krzemińska 2012). Wyszczególnienie grup o podwyższonym ryzyku wystąpienia niepożądanых zachowań żywieniowych może pozwolić na ukierunkowanie programów edukacji żywieniowej. Wyższy poziom wiedzy żywieniowej wiąże się ze zwiększonym prawdopodobieństwem stosowania się do zaleceń żywieniowych (Czarnocińska i in. 2016; Galiński i in. 2016; Barzegari i in. 2011; Kolodinsky i in. 2007).

Przeszkodą na drodze zbierania rzetelnej i wiarygodnej wiedzy dotyczącej odżywiania mogą być funkcjonujące w społeczeństwie stereotypy żywieniowe. Stereotyp to obecne w społeczeństwie utarte przekonanie, które nie zawsze jest zgodne z najnowszą wiedzą. Stereotyp definiuje się jako jednostkowy, cząstkowy obraz powstający w umyśle człowieka, który tworzy się w oparciu o własne doświadczenie, ale na podstawie odpornego na zmiany przekazu społecznego

(Chlewiński, Kurcz 1992). Stereotypy odnoszą się także do sposobu myślenia o żywności i żywieniu. Mogą wówczas stanowić zagrożenie dla zdrowia. Źródła stereotypów żywieniowych mogą być różnorakie – kulturowe (przekonania przekazywane z pokolenia na pokolenie), związane z mediami (prasa kobieca), a szczególnie mediami społecznościowymi. Mogą nimi być także przestarzałe źródła naukowe, które po pewnym czasie tracą na aktualności (Rybowska 2016). Stereotypowe opinie mogą dotyczyć takich obszarów jak: wpływ danego produktu na masę ciała (Jeżewska-Zychowicz 2007), żywienie dzieci (Mrosková, Lizáková 2016), żywienie sportowców (Rosenbloom 2017), czy żywienie kobiet w ciąży (Guggino i in. 2016).

Cel

Celem badań było określenie zwyczajów i poglądów żywieniowych studentów z uwzględnieniem poglądów stereotypowych, a także ocena zróżnicowania wiedzy i nawyków żywieniowych w zależności od płci, kierunku studiów oraz BMI.

Material i metody

W kwietniu 2019 objęto badaniami populację 444 polskich studentów uczelni wyższych publicznych i niepublicznych, o średniej wieku 22,3 lat (min. 18, maks. 33, SD=1,86), w tym 111 mężczyzn (20,1%) i 333 kobiet (59,1%). Średnia wartość BMI tej grupy wyniosła 22,6 (min. 15,2, maks. 58,8, SD=4,49).

Wśród badanych znaleźli się przedstawiciele siedmiu kategorii kierunków studiów: biomedycznych (BM) – 160 studentów (36,0%), społecznych (S) – 90 (20,3%), technicznych (T) – 86 (19,4%), humanistycznych (H) – 37 (8,3%), ekonomicznych (E) – 35 (7,9%), artystycznych (A) – 27 (6,1%), przyrodniczych (P) – 9 (2,0%).

W badaniach zastosowano metodę sondażu diagnostycznego. Wykorzystanym narzędziem był kwestionariusz ankiety online, opracowany przez autorkę w oparciu o Kwestionariusz do badania poglądów i zwyczajów żywieniowych KomPAN (Gawęcki 2014). Kwestionariusz składał się z następujących części: (1) metryczka, (2) częstotliwość spożycia wybranych grup produktów spożywczych (*prozdrowotnych*: pieczywo razowe, płatki owsiane, makaron pełnoziarnisty, kasze pełnoziarniste, mleko, fermentowane napoje mleczne, sery twarogowe, mięso białe, ryby, nasiona roślin strączkowych, owoce, warzywa; *niezdrowych*: pieczywo jasne, ryż biały, makaron zwykły, drobne kasze, żywność typu fast food, potrawy smażone, masło, sery żółte, wędliny, kiełba-

sy, parówki, mięso czerwone, słodczyce, konserwy mięsne, napoje słodzone, energetyzujące, alkoholowe), określona w 6 wariantach (nigdy, 1-3 razy w tygodniu, kilka razy w tygodniu, raz dziennie, kilka razy w ciągu dnia) (źródło: KomPAN), (3) pytania o ogólną wiedzę żywieniową (źródło: KomPAN), (4) autorskie stwierdzenia badające wiedzę żywieniową pod kątem popularnych mitów i stereotypów żywieniowych. Zgodnie z wytycznymi autorów kwestionariusza, sześć kategorii oryginalnych częstotliwości spożycia żywności zostało przekształconych w dane „ilościowe”, odzwierciedlające wzrastające natężenie cechy, stosując przekształcenie ich w liczby o charakterze liczb rzeczywistych i wyrażenie częstotliwości spożycia żywności w formie krotność/dzień. Zdrowe i niezdrowe cechy mogły mieć określone natężenie odpowiednio w obrębie indeksu prozdrowotnej diety lub w obrębie indeksu niezdrowej diety. Natężenie *negatywnych* cech odżywiania uznano za *małe* przy krotności/dzień wynoszącej 0-9,33, za *umiarkowane* przy 9,34-18,66 i za *duże* przy 18,67-28. Natężenie *pozytywnych* cech odżywiania uznano za *małe* przy krotności/dzień wynoszącej 0-6,66, za *umiarkowane* przy 6,67-13,33 i za *duże* przy 13,34-20. Pytania dotyczące stereotypów zostały opracowane na podstawie publikacji analizujących te zagadnienia (Claudel i wsp. 2018; Geiker i wsp 2017; Juhl i wsp. 2018; Kreider i wsp. 2017; Lopez i wsp. 2009; Marques i wsp. 2011; Rybowska 2013). Uwzględniono w badaniu następujące sześć stwierdzeń odnoszących się do mitów żywieniowych, prosząc o określenie ich poprawności jako: prawda (P) lub fałsz (F):

1. nowoczesne mleka modyfikowane dla niemowląt nie odbiegają jakością i składem od kobiecego mleka (F),
2. powstawanie trądziku jest powiązane ze spożywaniem nabiału (P),
3. suplementacja kreatyną powoduje częstsze skurcze mięśniowe i ogólne odwodnienie organizmu (F),
4. spożywanie jaj nie powoduje silnego wzrostu stężenia cholesterolu we krwi (P),
5. szpinak jest słabym źródłem żelaza (P),
6. warto spożywać suplementy diety nawet w dużych ilościach, gdyż nie szkodzą one zdrowiu (F).

Poprawnej odpowiedzi w teście wiedzy żywieniowej oraz dotyczącej stereotypów przypisano 1 pkt. Aby uznać poziom wiedzy za *dobry* oraz w niewielkim stopniu oparty na stereotypach, należało uzyskać 67-100% prawidłowych odpowiedzi, za *dostateczny* – 34-66% prawidłowych odpowiedzi, a za *niedostateczny* – 0-33%. (źródło: KomPAN). Analizę statystyczną przeprowadzono z wykorzystaniem programu Statistica 13.3 (StatSoft Inc., 2017). Do analiz zastosowano testy nieparametryczne (testu U Manna-Whitneya dla porównania

dwóch grup, test ANOVA Kruskala-Wallisa dla porównania większej liczby grup oraz współczynnik korelacji rang Spearmana). Przyjęty poziom istotności wynosi $p < 0,05$.

Wyniki badań

Test wiedzy żywieniowej KomPAN zawierał 25 pytań, a badane osoby odpowiedziały prawidłowo średnio na 57,5%, co świadczy o dostatecznym poziomie wiedzy żywieniowej. Najlepszy wynik studenci uzyskali, odpowiadając na pytanie „Przebywanie na słońcu sprzyja wytwarzaniu witaminy D w organizmie” – 94,2% prawidłowych odpowiedzi (twierdzących). Najmniej prawidłowych odpowiedzi (14,3%) udzielono na pytanie „Stosunek wapnia do fosforu w prawidłowej diecie powinien wynosić 1:1”. Na 6 pytań sprawdzających wiarę w mity żywieniowe, prawidłowej odpowiedzi udzielono na średnio 47,5%, co świadczy o dostatecznym poziomie wiedzy żywieniowej odnoszącej się do stereotypów. Studenci opierają swoją wiedzę na mitach w stopniu umiarkowanym.

Wiedza i nawyki żywieniowe w zależności od płci

W tabeli 1 przedstawiono wyniki potwierdzające, iż kobiety mają istotnie wyższą wiedzę żywieniową i rzadziej opierają ją na stereotypach niż mężczyźni. Dane zawarte w tabeli wskazują także, że natężenie pozytywnych cech odżywiania u kobiet jest duże, a w przypadku mężczyzn umiarkowane, natomiast natężenie negatywnych cech odżywiania jest u mężczyzn duże, a w przypadku kobiet umiarkowane.

Tab. 1. Charakterystyka poziomu wiedzy i zwyczajów żywieniowych badanych kobiet i mężczyzn.

Zmienne	średnia rang i ocena kobiety (n = 333)	średnia rang i ocena mężczyźni (n = 111)	P*
Ogólna wiedza żywieniowa	234 (dost.)	207 (dost.)	0,025
Wiedza dot. stereotypów	235 (dost.)	204 (dost.)	0,009
Wiedza razem	235 (dost.)	204 (dost.)	0,011
Krotność/dzień dla niezdrowej diety	209 (umiark.)	278 (duża)	0,001
Krotność/dzień dla zdrowej diety	238 (duża)	195 (umiark.)	0,001

Źródło: Opracowanie własne; *test U Manna-Whitneya $p < 0,05$

Wiedza i nawyki żywieniowe w zależności od kierunku studiów

W zakresie wiedzy badani studenci różnią się istotnie ze względu na specyfikę kierunku studiów (tab. 2), pozytywnie wyróżniają się studenci kierunków biomedycznych. Najniższy poziom wiedzy zaobserwowano wśród studentów kierunków artystycznych i ekonomicznych. Prozdrowotnymi zachowaniami żywieniowymi najczęściej wykazują się studenci kierunków biomedycznych, a najrzadziej ekonomicznych (istotność marginalna). Z kolei niekorzystne dla zdrowia nawyki żywieniowe nie różnicowały badanych ze względu na kierunek studiów (tab. 2).

Tab. 2. Charakterystyka poziomu wiedzy i zwyczajów żywieniowych badanych w zależności od kierunku studiów, Test ANOVA Kruskala-Wallisa.

Zmienne	Średnia ranga i ocena							
	BM n=160	S n=90	T n=86	H n=37	E n=35	A n=27	P n=9	p*
Ogólna wiedza żywieniowa	303 dobra	184 dost.	189 dost.	157 dost.	164 dost.	141 dost.	221 dost.	0,000
Wiedza dot. stereotypów	257 dost.	213 dost.	197 dost.	208 dost.	198 dost.	189 dost.	204 dost.	0,003
Wiedza razem	302 dost.	187 dost.	187 dost.	162 dost.	169 dost.	140 dost.	212 dost.	0,000
Krotność/dzień dla niezdrowej diety	206 umiark.	233 umiark.	243 umiark.	210 umiark.	221 umiark.	237 duża	222 umiark.	0,402
Krotność/dzień dla zdrowej diety	247 duża	211 umiark.	205 umiark.	233 duża	188 umiark.	201 umiark.	220 duża	0,064

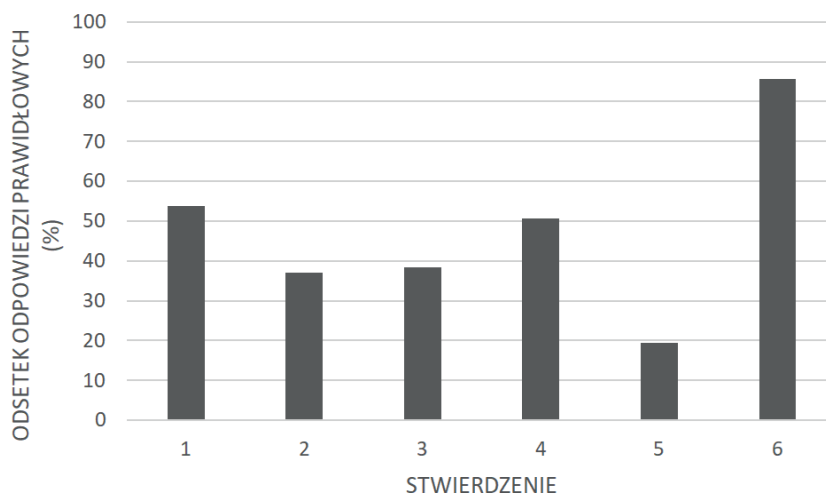
Źródło: Opracowanie własne; * test ANOVA Kruskala-Wallisa $p < 0,05$

Wiedza studentów na temat mitów żywieniowych

Na rycinie 1 przedstawiono odsetek prawidłowych odpowiedzi udzielonych przez badanych na pytania dotyczące wiedzy o stereotypach żywieniowych. Ponad 85% ankietowanych poprawnie uważa, iż nie można spożywać dużej ilości suplementów. Największą trudność sprawiło ankietowanym pytanie dotyczące zawartości żelaza w szpinaku. Prawidłowej odpowiedzi udzieliło niecałe 20% badanych.

Płeć różnicowała istotnie trafność odpowiedzi dla pytania o rodzaj mleka najbardziej odpowiedniego dla niemowląt ($p = 0,027$) i wpływ nabiału na powstawanie trądziku ($p = 0,003$). Kobiety udzieliły o 13% więcej prawidłowych

Ryc. 1. Odsetek odpowiedzi prawidłowych oceniających wiedzę o stereotypach żywieniowych.



Źródło: Opracowanie własne

odpowiedzi niż mężczyźni na pytanie dotyczące mleka dla niemowląt i o 18% więcej prawidłowych odpowiedzi na pytanie dotyczące trądziku.

Wiedza i nawyki żywieniowe w zależności od BMI

Związki poziomu wiedzy, zachowań żywieniowych i poziomu BMI badanych zaprezentowano w tabeli 3. Wiedza ogólna jest skorelowana dodatnio z wiedzą

Tab. 3. Korelacje poziomu wiedzy oraz zachowań żywieniowych i poziomu BMI badanych studentów.

Komponenty	BMI	Ogólna wiedza żywieniowa	Wiedza dot. stereotypów	Zachowania żywieniowe niekorzystne	Zachowania żywieniowe korzystne
BMI	-	-,047	-,029	-,004	-,017
Ogólna wiedza żywieniowa	-,047	-	,458***	-,162***	,271***
Wiedza dot. stereotypów	-,028	,458***	-	-,106*	,264***
Zachowania żywieniowe niekorzystne	-,004	-,162***	-,106*	-	-,145**
Zachowania żywieniowe korzystne	-,017	,271***	,264***	-,145**	-

Źródło: Opracowanie własne; korelacja rang Spearmana * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$

odnoszącą się do stereotypów. Wskazuje się na istotną statystycznie ujemną korelację pomiędzy wiedzą żywieniową dotyczącą stereotypów, a częstością spożycia niezdrowej żywności oraz dodatnią w przypadku spożycia żywności korzystnej dla zdrowia. Nie zanotowano istotnej statystycznie zależności pomiędzy wiedzą żywieniową a wartością BMI.

Dyskusja

W badaniach własnych wykazano, że wyższy poziom wiedzy żywieniowej sprzyja występowaniu korzystnych zachowań żywieniowych. Podobne związki wskazują inni autorzy (Zarzeczna-Baran, Wojdak-Hassa 2007), chociaż siła tych zależności jest raczej niewielka (Jeżewska-Zychowicz 2007). Galiński i in. (2016) wykazał, że wysoki poziom wiedzy żywieniowej sprzyja zachowaniom żywieniowym prozdrowotnym wśród studentów, zwłaszcza w odniesieniu do zmniejszenia natężenia niezdrowych cech diety. W badaniach własnych natomiast, wysoki poziom wiedzy częściej sprzyjał zwiększaniu natężenia cech diety prozdrowotnej.

W badaniach populacyjnych różnych krajów, mężczyźni zazwyczaj deklarują zdecydowanie gorsze nawyki żywieniowe (Hiza i in. 2013). Odnosi się to także do kobiet i mężczyzn będących studentami – zarówno w badaniach własnych, jak i badaniach Kim i in. (2012), w których dowiódł, że nieprawidłowe zachowania żywieniowe dotyczą częściej studentów niż studentek. Jest to najprawdopodobniej związane z faktem, iż kobiety bardziej dbają o zdrowie niż mężczyźni (Korporowicz 2013).

Zakładamy, że wiedza specjalistyczna związana ze zdrowiem przełoży się na konkretne zachowania prozdrowotne, także dotyczące sposobu żywienia. Stąd można spodziewać się, że studenci kierunków biomedycznych będą częściej deklarować realizację prawidłowych zachowań żywieniowych w porównaniu do studentów kierunków nienależących do tej grupy, gdyż zdobywają oni wiedzę z zakresu żywienia człowieka w toku studiów. Oczekiwanie to potwierdzają niniejsze badania. W badaniach Misiarz i in. (2013) wykazano, że studenci pielęgniarstwa zmieniali swoje zachowania żywieniowe w trakcie toku studiów na zdrowsze częściej niż studenci ekonomii. Ganasegeran i in. (2012) oraz Eric i Zelis (2014) wykazali korzystną tendencję w zachowaniach żywieniowych studentów uczelni medycznych. Ponadto, jak dowiedziono w badaniach Szczypańskiej i in. (2013), osoby z wykształceniem wyższym wykazują zdrowsze preferencje żywieniowe oraz wyższy poziom wiedzy żywieniowej niż osoby z wykształceniem średnim i podstawowym. Studenci kierunków biomedycznych wkraczając na ścieżkę zawodową, powinni potrafić udzielić fachowej porady na

temat sposobu odżywiania. Ważne jest, by kontrolować jakość wykształcenia na tych kierunkach.

W badaniach własnych nie wykazano korelacji pomiędzy wskaźnikiem masy ciała BMI a poziomem wiedzy i deklarowanymi nawykami żywieniowymi. Również badania innych autorów wskazują na brak związku pomiędzy BMI a wiedzą żywieniową (O'Brien, Davies 2006). Jeśli zaś chodzi o związek wskaźnika masy ciała i nawyków żywieniowych, w badaniach Misiarz i in. (2013) osoby charakteryzujące się BMI powyżej normy częściej wykazywały nieprawidłowe zachowania żywieniowe. Badania Al-Haj i in. (2015), Benazeera i Umarani (2014) i Korwin-Szymanowskiej i Tyszyńskiej (2015), podobnie jak niniejsze, nie potwierdziły takiego związku. Można wnioskować, że związek zachowań żywieniowych i poziomu BMI wymaga dobrze zaplanowanych badań populacyjnych, obejmujących odpowiednią liczbę osób z nadwagą i otyłością. W badaniach własnych odsetek takich osób był stosunkowo niewielki, a w badaniach cytowanych często nie podawany. Inną przyczyną mógł być fakt, iż w badaniach własnych nie dokonywano pomiaru masy i wysokości ciała, lecz pozyskano je w formie deklaracji. Niemniej jednak, według Korwin-Szymanowskiej i Tyszyńskiej (2015), większe znaczenie w kształtowaniu BMI można przypisać podejmowaniu aktywności fizycznej, dbaniu o odpowiednią długość snu i regenerację. Wskazuje się na konieczność kontynuowania badań na zróżnicowanych populacjach o dużej liczebności (Korwin-Szymanowska, Tyszyńska 2015). Wyszczególnienie czynników wpływających na BMI jest wysoce wartościowym przedmiotem badań naukowych ze względu na konieczność zahamowania wzrostu liczby osób otyłych w Polsce i na świecie.

W literaturze pojawia się wiele doniesień, iż tendencja do wiary w stereotypy żywieniowe jest często występującym zjawiskiem (Guggino 2016; Rosenbloom 2017; Rybowska 2016). Mrosová i Lizáková (2016) sygnalizują w swych badaniach, że wiara w mity żywieniowe zdaje się wpływać na zachowania żywieniowe rodziców i ich dzieci, co jest w zgodzie z badaniami własnymi. Sugerują także, że poszerzanie wiedzy żywieniowej społeczeństwa może wpłynąć na niższą wiarę w mity żywieniowe.

Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonych badań sugeruje się wdrożenie elementów edukacji żywieniowej w ramach działań profilaktycznych, gdyż przekłada się to na zmniejszenie wiary w stereotypy żywieniowe powielane w mediach oraz wpływa realnie na poprawę nawyków żywieniowych i może stanowić czynnik profilaktyki otyłości i innych chorób dietozależnych w późniejszym

okresie życia. Szczególną uwagę należy zwrócić na studentów kierunków niebiomedycznych, w tym mężczyzn.

Literatura

- Al-Haj M., Anwooda H., Elnimeiri M. 2015. Eating habits among medical students in a Sudanese medical faculty. *Int. Res. J. Med. Med. Sci.*, 3(3): 64-69.
- Barzegari A., Ebrahimi M., Azizi M., Ranjbar K. 2011. A study of nutritional knowledge, attitudes and food habits of college students. *World Appl. Sci. J.*, 15(7): 1012-1017.
- Bator E., Habanova M., Broniecka A., Wyka J., Bronkowska M. 2015. Porównanie poziomu wiedzy żywieniowej studentów polskich i słowackich zakresie źródeł pokarmowych wybranych składników odżywczych. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 48(1): 49-58.
- Benazeera, Umarani J. 2014. Association between eating habits and body mass index (BMI) of adolescents. *Int. J. Med. Sci.*, 3(8): 940-943.
- Chlewiński Z., Kurcz I. 1992. Stereotypy i uprzedzenia. PAN, Warszawa.
- Claudel J., Auffret N., Leccia M., Poli F., Dreno B. 2018. Acne and nutrition: hypotheses, myths and facts. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 32(10): 1631-1637.
- Czarnocińska J., Zaborowicz K., Galiński G., Kaźmierczak P., Górka K., Durczewski P. 2016. Evaluation of frequency of food products consumption among students according to their nutritional knowledge. *Probl. His. Epidemiol.*, 97(4): 348-351.
- Dziukiewicz J. 2018. Mass media jako przestrzeń kreowania zachowań zdrowotnych społeczeństwa – dwie strony medalu. *Med. Społ.*, 9: 127-142.
- Eric J., Zelis R. 2014. Integrating nutrition education into the cardiovascular curriculum changes eating habits of second-year medical students. *J. Clin. Lipidol.*, 8(2): 199-205.
- Galiński G., Czarnocińska J., Zaborowicz K. 2016. Ocena jakości diety studentów w zależności od ich płci i wiedzy żywieniowej. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 49(3): 474-478.
- Ganasegeran K., Al-Dubai, S., Qureshi A., Al-Abed A., Rizal A., Aljunid S. 2012. Social and psychological factors affecting eating habits among university students in a Malaysian medical school: a cross-sectional study. *Nutr. J.*, 11(1): 48.
- Gawęcki J. 2014. Kwestionariusz do badania poglądów i zwyczajów żywieniowych oraz procedura opracowania danych. http://www.medprew.cm-uj.krakow.pl/doku/kwestionariusz_kompan2016.pdf (dostęp 25.03.2020).
- Gawlikowska-Sroka A., Dzięciołowska-Baran E., Szczurkowski J. 2015. Evaluation of the dietary habits of polish medical students in their first year of studies. *Pom. J. Life Sci.*, 61(2): 186-190.

- Geiker N., Larsen M., Dyerberg J., Stender S., Astrup A. 2017. Eggs do not increase the risk of cardiovascular disease and can be safely consumed. *Ugeskrift Laeger*, 179(20).
- Górnicka M., Borawska U., Frąckiewicz J. 2015. Wybrane aspekty sposobu żywienia studentów polskich i norweskich. Znaczenie racjonalnego żywienia w edukacji zdrowotnej. WSiZ, Warszawa.
- Guggino A., Barbero S., Ponzio V., Viora E., Durazzo M., Bo S. 2016. Myths about nutrition in pregnancy. *J. Obstet. Gynaecol.*, 36(7): 964-965.
- Hiza H., Casavale K., Guenther P., Davis C. 2013. Diet quality of Americans differ by age, sex, race/ethnicity, income and education level. *J. Acad. Nutr. Diet.*, 113(2): 297-306.
- Jeżewska-Zychowicz M. 2007a. Stereotypy w myśleniu o żywności w kontekście jej wpływu na masę ciała. *Roczn. PZH*, 58(2): 377-388.
- Jeżewska-Zychowicz M. 2007b. Zachowania żywieniowe i ich uwarunkowania. SGGW, Warszawa.
- Juhl C., Bergholdt H., Miller I., Jemec G., Kanters J., Ellervick C. 2018. Diary intake and acne vulgaris: a systematic review and meta-analysis of 78,529 children, adolescents and young adults. *Nutrients*, 10(8): 1049.
- Kim H., Kim J., Jung H. 2012. A comparison of health related habits, nutrition knowledge, dietary habits, and blood composition according to gender and weight status of college students in Ulsan. *Korean J. Nutr.*, 45(4):336-346.
- Kolodinsky J., Harvey-Berino J., Berlin L., Johnson R., Reynolds T. 2007. Knowledge of current dietary guidelines and Food Choice by College Students: Better Eaters Have Higher Knowledge of Dietary Guidance. *J. Am. Diet. Assoc.*, 107(8): 1409-1413.
- Korporowicz V. 2013. Differences in health behavior and cost of medical care for woman and man in Poland. *Kwartalnik Kolegium Ekonomiczno-Społecznego „Studia I Prace”*, 15(3): 79-100.
- Korwin-Szymanowska A., Tuszyńska L. 2015. Zachowania żywieniowe jako nieodłączny element edukacji zdrowotnej - raport z badań. Znaczenie racjonalnego żywienia w edukacji zdrowotnej. WSiZ, Warszawa.
- Kreider R., Kalaman D., Antonio J., Ziegenfuss T., Wildman R., Collins R, Candy D, Kleiner S., Almada A., Lopez H. 2017. International society of sports nutrition position stand: safety and efficacy of creatine supplementation in exercise, sport and medicine. *J. Int. Soc. Sports Nutrition*, 13(14): 18.
- Laudanska-Krzeminska I., 2012. Dietary behavior of students from Poznan universities. *Papers on Anthropology*, 21: 163-175.
- Lopez R., Casa D., McDermott B., Gain M., Armstrong L., Maresh C. 2009. Does creatine supplementation hinder exercise heat tolerance or hydration status? A systematic review with meta-analyses. *J. Athl. Train.*, 44(2): 215-223.

- Marques E., Cotta R., Priore S. 2011. Myths and beliefs surrounding breastfeeding. *Cien. Saude Colet.*, 16(5): 2461-2468.
- Misiarz M., Malczyk E., Zołoteńka-Synowiec M., Rydelek J., Sobota O. 2013. Assessment of Dietary Behaviors of Students the Medical and Non-Medical Świętokrzyskie Voivodeship. *Piel. Zdr. Publ.*, 3(3): 265-272.
- Mrosková S., Lizáková L. 2016. Nutrition myths – the factor influencing the quality of children's diets. *Cent. Eur. J. Nurs. Midw.*, 7(1): 384-389.
- O'Brien G., Davies M. 2007. Nutrition knowledge and Body Mass Index. *Health Education Research*, 22(4): 571-575.
- Rosenbloom C. 2017. Sport nutrition myths that deserve to die but live on. *Nutrition Today*, 52(2): 57-61.
- Rybowska A. 2013. Nutritional stereotypes and their impact on consumer behavior. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 94(3): 465-468.
- Rybowska A. 2016. Powszechne przekonania dotyczące wybranych zachowań żywieniowych w opinii konsumentów 65+. *Zeszyty naukowe SGGW w Warszawie. Ekonomia i organizacja gospodarki żywnościowej nr 114*, Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- Seń M., Zacharczuk A., Lintowska A. 2012. Feeding behavior of selected students of universities and knowledge of the health effects of poor nutrition. *Piel. Zdr. Publ.*, 2(2): 113-123.
- Skibniewska K., Radzymińska M., Jaworska M., Babicz-Zielińska E. 2009. Badania zwyczajów żywieniowych studentów polskich i belgijskich. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4(65): 250-258.
- Stefańska E., Ostrowska L., Radziejewska I., Kardasz M. 2010. Mode of nutritic students of the Medical University of Białystok according to their place of residence during the study period. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 91(4): 585-590.
- Szczepańska E., Brończyk-Puzoń A., Skrzypek M. 2013. Knowledge and selected dietary behaviors of obese patients in relations to their level of education. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 94(4): 802-806.
- Walentukiewicz A., Łysak A., Wilk B. 2014. Assessment of students' nutrition in context of prevention of civilization diseases. *Probl. Hig. Epidemiol.* 95(3): 772-777.
- Waśkiewicz A. 2010. Quality of nutrition and level of health knowledge in young adult Polish population – the WOBASZ project. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 91(2): 233-237.
- Willett W., Stampfer M. 2013. Current evidence on healthy eating. *Ann. Rev. Public Health*, 34: 77-95.
- Wyka J., Żechałko-Czajkowska A. 2006. Nutritional knowledge, lifestyle and food groups intake in the group of first year students of Agricultural University in Wrocław. *Roczn. PZH*, 57(4): 381-388.

- Yahia N., Wang D., Rapley M., Dey R. 2015. Assessment of weight status, dietary habits and beliefs, physical activity, and nutritional knowledge among university students. *Perspect. Public Health*, 136(4): 231-244.
- Zarzezna-Baran M., Wojdak-Haasa E. 2007. Wiedza studentów Akademii Medycznej w Gdańsku o niektórych elementach stylu życia. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 88(1): 55-59.

ABSTRACT

DIETARY KNOWLEDGE, EATING HABITS AND VIEWS ON NUTRITIONAL MYTHS OF POLISH UNIVERSITY STUDENTS

The aim of the study was to analyze the habits and nutritional knowledge of students including stereotypes, as well as diversity in gender, field of study and BMI.

Material and methods. Data was collected through the part of KomPAN questionnaire of nutritional knowledge and behavior. Results are based on responses from 449 university students from different fields of study.

Results. Author found significant correlation between the levels of nutritional knowledge, both healthy ($r=0,3$ $p<0,001$) and unhealthy diet indicators ($r=-0,2$; $p<0,001$).

It was proven that better nutritional knowledge and habits are more characteristic for women than men ($p<0,05$ and $p<0,001$ respectively). Significant advantage in dietary knowledge was observed among the students of biomedical fields ($p<0,001$) as well as the fact that better dietary knowledge is associated with smaller belief in nutritional stereotypes. No correlation was found between the studied factors and BMI.

Słowa kluczowe: wiedza żywieniowa, mity/ stereotypy żywieniowe, nawyki żywieniowe, studenci

Keywords: dietary knowledge, eating habits, nutritional myths/stereotypes, students

Dane do kontaktu z autorem:

Beata Józwiak

ul. Powstańców Wielkopolskich 14/18, 61-895 Poznań

tel.: 511792188

e-mail: beataljozwiak@gmail.com

Paulina Mencil

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Koło Naukowe Profilaktyki Nowotworowej i Readaptacji Chorych
„rak-OFF”

Opiekun: dr Izabela Cytlak

EDUKACJA ZDROWOTNA JAKO KLUCZOWY KOMPONENT PROFILAKTYKI CHORÓB ONKOLOGICZNYCH

Wstęp

Zdrowie, wg Światowej Organizacji Zdrowia, nie jest pojmowane jako brak choroby, ale stan dobrego samopoczucia w aspekcie fizycznym, psychicznym, społecznym i duchowym. W kontekście tych informacji nasuwa się pytanie, co dokładnie determinuje zdrowie człowieka, w szczególności w obliczu choroby cywilizacyjnej jaką jest nowotwór. Zarówno Karta Ottawska, jak i Narodowy Program Zdrowia na lata 2007-2015 definiują zdrowie jako zasób czy bogactwo wpływające na jednostkę oraz społeczeństwo (Chowanna).

Holistyczne ujęcie choroby onkologicznej, które podkreślane jest coraz częściej, wymaga także interdyscyplinarnego ujęcia w jej zapobieganiu. Wynika to m.in. z aspektu społecznego czy ekonomicznego i nasuwa potrzebę popularyzowania wiedzy.

Edukacja zdrowotna stanowi coraz bardziej powszechny i ważny temat, jednak nie dotyczy on w tak istotnym stopniu tematyki chorób onkologicznych. W szczególności dotyczy to działań profilaktycznych. Zapobieganie nowotworom to etap, na który społeczeństwo ma duży wpływ, a sposoby, które prowadzą do uzyskania zdrowia poprzez profilaktykę, są bardzo różnorodne. Zwraca się uwagę na m.in. edukację żywieniową, radzenie sobie ze stresem, nazywanie i radzenie sobie z emocjami, komunikację interpersonalną czy rozwiązywanie problemów. Są to elementy, które mają także istotne znaczenie w zapobieganiu chorobom nowotworowym. Ponadto profilaktyka zajmuje istotne miejsce w odniesieniu do osób z grup ryzyka. Jednak łatwiej jest zrozumieć jej istotność,

poznając przyczyny i mechanizmy chorób nowotworowych, a także skuteczne sposoby działania.

Choroba onkologiczna występuje z dużą częstotliwością, a jej postrzeganie wśród społeczeństwa budzi negatywne emocje (Rogiewicz 2015). 80% wszystkich działań medycznych skierowanych jest do pacjentów z chorobami przewlekłymi, do których zalicza się także nowotwory. To oznacza, że pacjenci potrzebują informacji o chorobie oraz umiejętności radzenia sobie (Woynarowska 2017). „Aby ludzie aktywnie uczestniczyli w procesie leczenia chorób, potrafili im zapobiegać oraz kontrolować swoje zdrowie i wzmacniać jego potencjał, muszą wiedzieć, rozumieć, umieć i chcieć to robić”. Powyższe czynności są punktem wyjścia do działań skierowanych w obliczu choroby (terapia), zapobiegania jej (profilaktyka) czy potęgowania zasobów zdrowotnych (promocja zdrowia) (Woynarowska 2017). Pomimo świadomości wpływu czynników ryzyka i ich rozpoznania, a także faktu, że choroba nowotworowa nie jest nową jednostką chorobową, nadal budzi ona strach i wywołuje paraliż (Mencil 2018). Jak podaje Lalonde – ponad połowa czynników wpływających na zdrowie ludzkie to styl życia (Woynarowska 2008). Rogiewicz ujmuje je jako czynniki środowiskowe i zalicza do nich alkohol, tytoń czy zanieczyszczenia środowiska, a pozostałe 20% to geny. To nie jest jedyny model rozkładu czynników, wpływających na ludzkie zdrowie, gdyż nie uwzględnia aspektu psychologicznego. Autorzy zwracają uwagę m.in. na stres, a dokładniej sposób radzenia sobie z nim. Ma on wpływ na układ odpornościowy, który odgrywa znaczącą rolę w przypadku zachorowania na choroby nowotworowe (Mencil 2018). W chwili zachorowania jednostka posiada pewien zasób wiedzy oraz zna sposoby reagowania czy radzenia sobie w obliczu trudnych sytuacji. Zdarzenia te mogą wywołać u niej brak poczucia bezpieczeństwa czy utrudniać proces leczenia. Niekiedy sama wizyta u lekarza jest trudna i odkładana w czasie, a wpływ na to ma m.in. niski poziom wykształcenia. Fazy reakcji na chorobę dotyczą nie tylko pacjentów, lecz również osób bliskich. Ich zdrowie fizyczne i psychiczne jest istotne, aby mogły być źródłem wsparcia dla chorych. To oznacza dbanie nie tylko o zdrowie fizyczne, ale też o psychikę, między innymi ujawnianie swoich emocji i znalezienie odpowiednich metod redukcji stresu (Mencil 2018). Ważną rolę odgrywa także edukacja, która dotyczy zarówno rodziny, jak i osób bliskich chorego. Stanowi dodatkowe źródło wiedzy o osobie chorej oraz umożliwia lepszą adaptację do nowej sytuacji (Woynarowska 2017).

Celem pracy jest analiza koncepcji oraz strategii dotyczących edukacji zdrowotnej oraz specyfiki choroby onkologicznej. Ponadto istotne jest zaprezentowanie wybranych programów profilaktycznych dotyczących chorób nowotworowych z uwzględnieniem różnych grup odbiorców. Zastosowano przegląd

piśmiennictwa obejmującego problematykę zagadnień profilaktyki i edukacji zdrowotnej oraz badań dotyczących głównie wpływu różnych czynników na zdrowie. Wybrane badania dotyczyły działań profilaktycznych mieszkańców Polski.

Edukacja zdrowotna jako złożony element profilaktyki

Definicje edukacji zdrowotnej wskazują, że to proces dbania nie tylko o swoje zdrowie, ale też innych. B. Woynarowska analizowała różne definicje edukacji zdrowotnej. Na ich podstawie wraz z nakierunkowaniem na jej współczesne ujęcie sformułowała następującą definicję: „Edukacja zdrowotna jest całościowym procesem uczenia się ludzi jak żyć, aby:

- zachować i doskonalić zdrowie własne i innych,
- w przypadku wystąpienia choroby lub niepełnosprawności aktywnie uczestniczyć w jej leczeniu, radzić sobie i zmniejszać jej negatywne skutki” (Woynarowska 2010).

Współczesne ujęcie edukacji zdrowotnej przejawia się na przykład w zwróceniu uwagi na bycie aktywnym i zaangażowanym przez całe życie w dbałość o zdrowie oraz aby odbywało się to systematycznie i w zaplanowany sposób. Przesłanką do owych działań nie powinien być przymus. Można także wskazać pewne pojęcia, które nie odnoszą się stricte do edukacji zdrowotnej, lecz pełnią w niej znaczącą rolę. Zalicza się do nich wiedzę, nawyki, przekonania, postawy, umiejętności czy zachowania (Woynarowska 2010).

Jednym z nadrzędnych celów edukacji zdrowotnej jest dbanie o zdrowy styl życia. Przejawia się on w zdobywaniu wiedzy, ale i umiejętności zbliżających do prozdrowotnych zachowań zdrowotnych oraz radzeniu sobie z wymaganiami życiowymi (Borzućek-Sitkiewicz 2006).

Chcąc zagłębić się w tematykę profilaktyki, warto rozpocząć od jej podziałów. Wyróżnia się starą oraz nową klasyfikację. Stara klasyfikacja z roku 1957 wprowadzona przez Komisję do spraw Chronicznych Chorób, a następnie zatwierdzona przez WHO, zawiera trzy rodzaje profilaktyki. Pierwsza z nich to profilaktyka pierwszorzędowa, nakierunkowana na osoby zdrowe, której głównym celem jest promowanie zdrowego stylu życia. Miejscem realizowania powyższych działań jest szkoła. Kolejna – to profilaktyka drugorzędowa uwzględniająca osoby zagrożone, które znajdują się w grupie podwyższonego ryzyka. Natomiast ostatnią z nich, skierowaną do osób chorych, mającą na celu zaprzestanie dalszego rozwoju choroby i dysfunkcji, określa profilaktyka trzeciorzędowa (Szymańska 2012). Drugi podział z roku 2000, dotyczący nowej klasyfikacji, również zawiera trzy poziomy. Pierwszy z nich to profilaktyka

uniwersalna, skierowana do grupy, której dotyczy najmniejszy stopień ryzyka, a cel stanowi zapobieganie. Jej odnośnikiem w poprzedniej klasyfikacji jest profilaktyka pierwszorzędowa. Kolejna – to profilaktyka drugorzędowa, której w nowej klasyfikacji odpowiada profilaktyka selektywna. Uwzględnia się w niej potrzeby oraz specyfikę danej grupy. Ze względu na środowisko, w jakim jednostka się wychowuje, dostosowuje się do niej działania zapobiegające. Ostatnim poziomem jest profilaktyka wskazująca, różniąc się od poprzedniej profilaktyki tym, że u danych jednostek występują zachowania dysfunkcyjne. Nowa klasyfikacja nie uwzględnia profilaktyki trzeciorzędowej. Nastąpił w niej podział drugorzędowej na selektywną oraz wskazującą.

Atutem edukacji zdrowotnej i profilaktyki, szczególnie na poziomie makrospołecznym, jest jej dostępność dla każdego oraz to, że nie wymaga dużych nakładów finansowych. Ponadto jej działania są nakierunkowane na zdrowie przyszłych pokoleń, co bardzo często nie przykuwa uwagi jednostki skupionej na tym, co dzieje się w danym momencie. Skuteczność powyższych działań uzależniona jest także od czynników ryzyka czy zachowań ryzykownych (Wojnarowska 2017).

Omawiając edukację zdrowotną, nie sposób nie wspomnieć o jej modelach, a szczególnie o tym, który jest istotny w poniższych rozważaniach. Wyróżnia się trzy modele edukacji zdrowotnej: model zorientowany na chorobę, model zorientowany na czynniki ryzyka dla zdrowia oraz model zorientowany na zdrowie. Ostatni spośród wymienionych jako cel przyjmuje potęgowanie potencjału zdrowotnego, a u jego podstaw znajduje się holistyczne podejście do zdrowia. Założenia tego modelu koncentrują się na zaangażowaniu ludzi w podejmowanie działań, które swym zasięgiem będą obejmowały różne siedliska (Wojnarowska 2017).

W modelu edukacji zdrowotnej zorientowanym na zdrowie głównym celem nie są choroby, ale ludzie i miejsca, w jakich funkcjonują. Wśród celów edukacji zdrowotnej powyższego modelu wyróżnia się m.in. wywieranie wpływu na ludzkie wybory w kontekście zdrowia. Rozumiany jest on jednak nie jako manipulacja, lecz indywidualne upodmiotowienie (Synowiec-Piłat 2009). Podatność charakterystyczna dla tej grupy wiekowej stanowi czynnik ułatwiający kształtowanie nawyków oraz zachowań na drodze socjalizacji młodych ludzi. Powodując trwałą zmianę zachowań oraz postaw, okazuje się bardzo skutecznym działaniem do zastosowania w szkołach (Borzucka-Sitkiewicz 2006).

Edukacja zdrowotna w programach profilaktycznych

Problematyka edukacji zdrowotnej obejmuje także programy profilaktyczne, a dokładniej poziom ich skuteczności. Wyróżnia się charakterystyczne cechy dobrego oraz skutecznego programu profilaktycznego. Koncentrują się one na zapobieganiu używania substancji psychoaktywnych, lecz mogą być wykorzystywane w zakresie różnych problemów w szeroko pojętej profilaktyce. Pierwszym jego elementem są naukowe podstawy. Wiedza, która dotyczy czynników ryzyka czy teorii zachowań, reakcji lub wieku rozwojowego dzieci i młodzieży, stanowi cenną wiedzę. Uwzględniając holistyczne podejście do danego tematu, warto zaangażować w działania rodziców, środowisko szkolne, a także społeczność lokalną. Ponadto chcąc zwiększyć skuteczność zamierzonych działań, warto korzystać ze sprawdzonych strategii (Woynarowska 2010).

Wśród strategii stosowanych w działaniach profilaktycznych wyróżnia się strategie informacyjne, edukacyjne, alternatyw, interwencyjne czy zmniejszania szkód. Pierwsza z nich zaznacza się jako najmniej skuteczna. Okazuje się, że zwiększenie zasobu wiedzy nie jest równoznaczne z niepodejmowaniem zachowań ryzykownych. Badania pokazują, że następują zmiany w poziomie wiedzy czy postaw, lecz nie w zachowaniach. Warto podkreślić, że za skuteczne uznaje się strategie edukacyjne czy alternatyw. Strategie edukacyjne dotyczą rozwijania umiejętności społecznych i psychologicznych, których zestaw uzależniony jest od autora. Powyższe strategie wykorzystują różne metody działania, a te, które wymagają aktywności jednostki, bazują na cyklu uczenia się przez doświadczenie. To tzw. cykl Kolba obejmujący cztery etapy:

- konkretne przeżycie (doświadczenie) – w tej części uczeń ma być aktywny i wykorzystać dotychczasową wiedzę czy doświadczenie,
- refleksja i obserwacja – powyższe ćwiczenie analizowane jest przez uczestników i następuje wspólna wymiana informacji,
- pogłębianie, porządkowanie lub korekta wiedzy – ma na celu zebranie i uporządkowanie zdobytej wiedzy,
- własne eksperymentowanie – to etap dający możliwość wykorzystania zdobytej wiedzy (Borzucka-Sitkiewicz 2006).

Istotnym elementem edukacji zdrowotnej jest zdrowie psychospołeczne. Europejska Strategia dla Zdrowia i Rozwoju Dzieci i Młodzieży uznała, że problemy związane ze zdrowiem psychicznym są jednym z 7 priorytetów działań, jakie powinny podjąć poszczególne państwa w zakresie tematyki edukacji. Jednym z elementów tego zagadnienia jest pozytywne zdrowie psychiczne (Woynarowska 2017). Koncepcja edukacji zdrowotnej ukierunkowanej na rozwijanie umiejętności życiowych zawiera w sobie nie tylko zdobywanie

wiedzy, ale też kształtowanie postaw i umiejętności. „Umiejętności życiowe (life skills) to umiejętności umożliwiające człowiekowi pozytywne zachowania przystosowawcze, dzięki którym może skutecznie radzić sobie z zadaniami (wymaganiami) i wyzwaniem codziennego życia” (Woynarowska 2017). W Polsce powyższe umiejętności uwzględnione są w podstawie programowej. Jest to widoczne w różnych przedmiotach, szczególnie w wychowaniu fizycznym. Natomiast w niektórych krajach za granicą stanowią oddzielny przedmiot. Przykładem zajęć są lekcje *edukacji społecznej, osobistej i zdrowotnej* w irlandzkiej szkole. Uczniowie dowiadują się, jak komunikować się ze sobą oraz uzyskują informacje o zdrowiu emocjonalnym, substancjach psychoaktywnych lub podejmowaniu decyzji. Natomiast w Wielkiej Brytanii prowadzony jest przedmiot *edukacja osobista i społeczna* (Woynarowska 2017). Chcąc stworzyć własny scenariusz zajęć, można posłużyć się wskazówkami i schematem zapisu scenariusza, jaki zamieściła B. Woynarowska w książce pt. *Edukacja zdrowotna. Podstawy teoretyczne metodyka i praktyka*. Oprócz wyszczególnienia danych elementów scenariusza, znajdują się także wyjaśnienia do każdej części. Ponadto zawarta została lista jakości do oceny programu HEPS w szkołach, które promują zdrowie. To program dotyczący zdrowego odżywiania i aktywności fizycznej w szkołach. Jednak narzędzie zostało zmodyfikowane i może być używane do oceniania jakości programów dotyczących edukacji zdrowotnej w dowolnym temacie. Jego cztery główne wymiary to: jakość koncepcji, jakość struktury, jakość procesu oraz jakość efektów.

Ważnym elementem edukacji zdrowotnej jest edukacja pozytywna zawierająca w sobie założenia związane z rozwojem jednostki, jej zasobów i potencjału. Nauką, z jakiej czerpie wiedzę powyższa edukacja jest psychologia pozytywna, której twórcą jest M. Seligman. „Psychologia pozytywna to ruch na rzecz szczęścia i optymizmu, który umożliwia osiągnięcie szczęścia jako trwałej postawy, rozwija zdolności do wzbudzania emocji pozytywnych, przezwycięzania przeciwności, wykorzystywania szans życiowych i kształtowania pozytywnych cech charakteru (tzw. cnót)” (Woynarowska 2017). Wśród głównych przedmiotów zainteresowań edukacji pozytywnej znajduje się przede wszystkim dobrostan. Jako główne przyczyny dobrostanu wyróżniają się dwa modele. Pierwszy z nich, to model dół-góra, w którym dobrostan wynika ze wcześniejszych pozytywnych doświadczeń, natomiast cechy osobowości są odpowiedzialne za pojęcie dobrostanu w modelu góra-dół. Według modelu szczęścia powyższe postrzegania mogą się wzajemnie uzupełniać, a za szczęście odpowiedzialne są czynniki wrodzone, sytuacyjne i wolicjonalne. W psychologii pozytywnej wyróżnia się koncepcję, która podaje, że dobrostanu można się nauczyć (Woynarowska 2017). Wśród form aktywności zwiększania dobrostanu można przytoczyć

pozytywne działania. Mają one na celu ukazać pozytywne emocje, nakierować na pozytywne myślenie czy zaspokoić podstawowe potrzeby w aspekcie psychologicznym. Jako przykład wyróżnia się:

- „– pisanie listów wyrażających wdzięczność,
- skupianie się na pozytywnych wydarzeniach ze swojego życia,
- ćwiczenie optymizmu,
- robienie dobrych uczynków,
- używanie swoich mocnych stron w nowych sytuacjach,
- afirmację swoich najważniejszych wartości” (Woynarowska 2017).

Aspekty praktyczne – edukacja zdrowotna

Jak wskazują badania Głównego Urzędu Statystycznego, od roku 2013 w Polsce przybywa rocznie 120 tysięcy zachorowań na choroby nowotworowe, a w roku 2016 zarejestrowano ponad 160 tysięcy zachorowań (Główny Urząd Statystyczny, Zdrowie i ochrona zdrowia w 2017 r.). Ponadto z notatki informacyjnej badania EHIS *Zdrowie i zachowania zdrowotne mieszkańców Polski w świetle Europejskiego Ankietowego Badania Zdrowia (EHIS) 2014 r.* w zakresie informacji dotyczących wsparcia społecznego w życiu człowieka wynika, że wpływ ma wykształcenie jednostki czy stan zdrowia. Osoby lepiej wykształcone czy oceniające lepiej swój stan zdrowia oceniają pozytywnie dostępność oraz jakość wsparcia.

W *Badaniu postaw wobec zachowań zdrowotnych w zakresie profilaktyki nowotworowej wśród mieszkańców Polski ze szczególnym uwzględnieniem postaw Polek wobec raka szyjki macicy i raka piersi* dominują informacje, że zdrowy styl życia postrzegany jest przez pryzmat aktywności ruchowej czy diety, a np. stres stanowi dodatkowy, nie dominujący element zdrowego stylu życia. Ponadto prowadzenie zdrowego trybu życia przez badanych nie wynikało z przekonania opartych na zdobytej wiedzy, lecz było naznaczone problemami ze zdrowiem. Profilaktyka kojarzona jest przez społeczeństwo negatywnie, bo przez pryzmat wykonywania badań medycznych. Jedynym pozytywnym elementem są akcje związane z aktywnością fizyczną i żywieniem, które zaznaczyły się w świadomości Polaków bardzo dawno temu (*Biuletyn Informacji Publicznej*, 2019). Istotne są także dane z artykułu A. Dyzmann-Sroki i M. Trojanowskiego, w którym zebrano wyniki różnych badań (głównie badania typu Capibus pt. *Program profilaktyki raka piersi – dlaczego nie wszystkie kobiety poddały się badaniu mammograficznemu w ramach programu? Jak zwiększyć efektywność programu w przyszłości?* przeprowadzonego przez Millward Brown na zlecenie COK, techniką była ankieta skierowana do kobiet w wieku 50-69 lat), aby

odpowiedzieć na pytanie, dlaczego Polki nie wykonują badań profilaktycznych oraz jakie należy podjąć działania, aby to zmienić. Wśród zebranych danych wyróżniają się informacje świadczące o wpływie statusu społecznego na kierowanie się stereotypami związanymi z rakiem – niższy status społeczny wywołuje strach przed badaniami profilaktycznymi. Ponadto wyłania się potrzeba edukowania, mająca wpłynąć na błędne postrzeganie raka jako wyroku śmierci (Dyzmann-Sroka, Trojanowski 2012).

Z badań wynika, że istnieje znacząca potrzeba edukacji zdrowotnej. W części praktycznej pragnę więc zwrócić uwagę na programy czy metody będące elementem przyczyniającym się do rozwoju jednostki, w tym wzmacniania jej zdrowia psychospołecznego.

Pierwszą grupą, na którą szczególnie nakierunkowane są działania, jest społeczność szkolna. Jednym z przykładów jest Europejski Kodeks Walki z Rakiem. Obejmuje on 12 zasad dotyczących zachowań profilaktycznych w zakresie nowotworów. Strona internetowa kodekswalkizrakiem.pl zawiera informacje dotyczące działań, jakie mogą być realizowane w szkołach czy zwiększać zaangażowanie w działania profilaktyczne. Wśród tych działań wyodrębnia się projekt „Szkoła promująca zalecenia Europejskiego kodeksu walki z rakiem”, stanowiący element Narodowego Programu Zwalczania Chorób Nowotworowych, a dokładniej zadania *Prewencja pierwotna nowotworów*. Projekt ma na celu rozpowszechnianie treści zawartych w dokumencie, który został sporządzony przez specjalistów z zakresu powyższej tematyki. Zawiera także odniesienie do konkursu organizowanego przez Association of European Cancer Leagues w Brukseli, skierowanego do trzech grup wiekowych (7-10, 11-14, 15-18 lat). Przytoczona organizacja łączy Europejskie Ligi Walki z Rakiem, a kodeks stanowi cenny zbiór materiałów do wykorzystania przez nauczycieli czy uczniów. Przykładem są broszury, prezentacje, poradniki czy materiały audiowizualne (Kodeks Walki z Rakiem). Jak wyżej wspomniałam, istotne są podstawy naukowe, co zapewnia książka Joanny Szymańskiej (Szymańska 2012) zatytułowana *Programy profilaktyczne. Podstawy profesjonalnej profilaktyki*. Stanowi zaplecze teoretyczne zawierające definicje podstawowych ważnych pojęć, jak np. profilaktyka czy zachowania ryzykowne. Uwzględnia także element holistycznego ujęcia działań zdrowotnych, jakimi są np. rodzice. Interesująca jest znaczna część powyższej publikacji dotycząca skuteczności działań profilaktycznych oraz tego, że nieodpowiednio prowadzona może szkodzić. Stąd przedstawione zostały standardy programów profilaktycznych w Europie czy USA, a także informacja o możliwości skorzystania z Banku Rekomendowanych Programów Profilaktycznych, który znajduje się na stronie Ośrodka Rozwoju Edukacji (Szymańska 2012).

Wśród aspektów interdyscyplinarnego ujęcia powyższego zagadnienia ukazują się także spojrzenie na kolejną grupę odbiorców – grupy społeczne. Działania w nich nie są skierowane stricte na zapobieganie chorobom onkologicznym. Jednak w swej tematyce zawierają ważne elementy budujące zdrowie, które definiowane jest biopsychospołecznie, czyli uwzględniając różne aspekty zdrowia. Przykładem programu dla firm jest „8 x O”. Nakierunkowany jest on na aspekty związane z możliwościami uniknięcia wypalenia i sposobów zarządzania swoją energią. Jego nazwa pochodzi od pierwszych liter słów takich jak: oddech, obecność, oparcie, odreagowanie, odmawianie, odżywianie i opiekowanie się sobą. Innym przykładem jest program „Antydepresja”. Pozwala on m.in. na zapoznanie się z technikami mindfulness i polega na praktycznej nauce rozładowania emocji czy radzeniu sobie w trudnych sytuacjach (Kalbarczyk i in. 2016).

Organizacje pozarządowe również poświęcają swe działania na profilaktykę pierwszorzędową. Przeprowadzają liczne programy oraz kampanie, a wśród nich wyróżniają się np. otwarte dni onkologii znane pod nazwą *białe niedziele* czy *białe soboty*. W tym czasie społeczność lokalna może np. bezpłatnie skorzystać z badań profilaktycznych. Odbywają się także spotkania propagujące wiedzę związaną z czynnikami ryzyka, profilaktyką czy aspektami związanymi z chorobą. Ponadto działania organizacji uwzględniają różne grupy – dzieci, słuchacze Uniwersytetu III wieku, lekarzy rodzinnych oraz internistów. Każdy może wziąć udział w różnych formach aktywności, poczynając od audycji w mediach, rozdawania broszur po organizowanie całodniowych czy całomiesięcznych akcji, jak np. „Podkarpacki Dzień Walki z Rakiem” (Synowiec-Piłat 2009).

Wnioski

Holistyczne pojmowanie kategorii zdrowia to m.in. uwzględnienie wpływu stresu czy emocji, a także skutecznych strategii działania. Poprzez przybliżenie tematyki edukacji zdrowotnej oraz chorób onkologicznych zaprezentowane treści mają na celu umożliwienie zrozumienia konieczności podejmowania ważnych działań prewencyjnych.

Dostępność wielu informacji z jednej strony motywuje do dbania o zdrowie, z drugiej strony może powodować dezorientację, które z nich są prawdziwe lub ważniejsze w obliczu wielu czynników ryzyka. Przeanalizowane badania wskazują na rosnącą liczbę zachorowań. Ponadto badania, które pokazują zależność jakości zdrowia od np. poziomu wykształcenia, to informacje akcentujące potrzebę edukacji zdrowotnej, a szczególnie działań profilaktycznych.

Postrzeganie zdrowia w kategoriach zasobu i wartości otwiera perspektywę, która może przynieść życie bardziej satysfakcjonujące. Pojęcie zdrowia z uwagi

na procesualny charakter, wymaga dbałości o nie. Jak wykazano w niniejszym tekście, społeczny poziom świadomości zdrowotnej utrzymuje się wciąż na niskim poziomie, a np. rozwój zawodowy postrzegany jest jako ważniejszy niż dbałość o zdrowie. Pomimo deklarowanej przez społeczeństwo ważności zdrowia występują duże różnice w aktywnym dbaniu o swoje zdrowie. Zachowania prozdrowotne podejmowane są przez osoby młode, z wyższym wykształceniem czy statusem materialnym.

Jednocześnie, nie ulega wątpliwości, że konsekwencje choroby źle wpływają na jednostkę, jak i społeczeństwo (Dworak 2015). Powyższa wiedza generuje potrzebę przyjęcia postawy autokreacyjnej, w której człowiek jest podmiotem sprawczym, odpowiedzialnym za swoje życie oraz zdrowie i powinien o nie nieustannie dbać.

Jak wyżej wykazałam, działania te nie dotyczą tylko środowiska szkolnego czy organizacji pozarządowych, ale też miejsc pracy. Nie są one stricte nastawione na działania zapobiegające rozwojowi chorób nowotworowych, jednak ważne jest upodmiotowienie i każde działanie zmieniające postawę człowieka w kierunku wzmacniania zdrowia. To wskazuje na to, że powinien o nie dbać w różnych środowiskach, jakich funkcjonuje. A zgodnie z definicją edukacji zdrowotnej powinno odbywać się to przez całe życie i – jak podaje współczesne jej ujęcie – w sposób zaplanowany oraz systematyczny.

Literatura:

- Borzućek-Sitkiewicz K. 2006. Promocja zdrowia i edukacja zdrowotna: przewodnik dla edukatorów zdrowia. Impuls, Kraków.
- Dworak A. 2015. Zdrowie jako determinant ludzkiego potencjału. <http://bazhum.muzhp.pl/media/files/Chowanna/Chowanna-r2015-t1/Chowanna-r2015-t1-s151-163/Chowanna-r2015-t1-s151-163.pdf> (dostęp 21 lutego 2020 r.).
- Dyzmann-Sroka A., Trojanowski M. 2012. Dlaczego Polki nie robią badań profilaktycznych? *Nowiny Lekarskie*, 81(3): 258-264.
- Główny Urząd Statystyczny <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/zdrowie/zdrowie/zdrowie-i-ochrona-zdrowia-w-2017-r-,1,8.html> (dostęp 26 lutego 2020 r.).
- Główny Urząd Statystyczny <https://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/zdrowie/zdrowie/zdrowie-i-zachowania-zdrowotne-mieszkancow-polski-w-swietle-badania-ehis-2014,10,1.html?pdf=1> (dostęp 27 lutego 2020 r.).
- Heszen I. 2007. Psychologia zdrowia. PWN, Warszawa.
- Kalbarczyk W. P., Murawiec S., Kalbarczyk M. 2016. Priorytetowe działania w obszarze zdrowia psychicznego na lata 2016-2020. Warszawa.

- Kodeks Walki z Rakiem www.kodekswalkizrakiem.pl (dostęp 26 lutego 2020 r.).
- Mencel P. 2018. Formy pomocy i wsparcia osób chorych onkologicznie ich bliskich. Praca magisterska, Poznań.
- Ministerstwo Zdrowia http://www.bip.mz.gov.pl/?post_type=page&p=52520 (dostęp 3 marca 2020 r.).
- Synowiec-Piłat M. 2009. Promocja zdrowia i profilaktyka onkologiczna w działaniach organizacji pozarządowych. Adam Marszałek, Toruń.
- Rogiewicz M. 2015. Praktyczny podręcznik psychoonkologii dorosłych. Medycyna Praktyczna, Kraków.
- Szymańska J. 2012. Programy profilaktyczne. Podstawy profesjonalnej profilaktyki. Ośrodek Rozwoju Edukacji, Warszawa.
- Woynarowska B. 2017. Edukacja zdrowotna. Podstawy teoretyczne metodyka praktyka. PWN, Warszawa.
- Woynarowska B. 2008. Edukacja zdrowotna. Podręcznik akademicki. PWN, Warszawa.

ABSTRACT

HEALTH EDUCATION AS A KEY COMPONENT OF ONCOLOGICAL OF DISEASE PREVENTION

The following article contains basic information about health education and the specificity of oncological disease. The aim of the article is to make people aware of the importance and complexity of the issues. Among the available studies, information about the need for education and its impact on the quality of life. The following article provides an overview of the research and attempts to answer the questions about the role of health education in the prevention of oncological diseases and how it works.

Interdisciplinary approach to the issues, mentioned above, is particularly important in the case of civilization disease like oncological disease. The issues raised relate to psychosocial health, which includes emotions, stress or life skills.

The results of the analyzed studies indicate the need for health education in the field of prevention, because it usually occurs in situations of health problems, and not preventive care for them. The analyzed activities indicate the use of various activities, but it is not so frequent to achieve the intended effects.

Słowa kluczowe: edukacja zdrowotna, profilaktyka, choroba onkologiczna

Keywords: health education, prevention, oncological disease

Dane do kontaktu z autorem:

paulina-mencel@o2.pl
609675106

SEKCJA NAUK O ŻYWNOŚCI

Bartłomiej Bielawa, Karina Zywar

Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im Stanisława Pigionia w Krośnie

Instytut Politechniczny

Studenckie Koło Naukowe Ekonomistów

Opiekun: dr inż. Małgorzata Górka, mgr Elżbieta Brągiel

ANALIZA ZACHOWAŃ NABYWCÓW PRODUKTÓW EKOLOGICZNYCH

Wstęp

Rynek rolnictwa i żywności ekologicznej w Polsce ulega ciągłemu rozwojowi. Produkty ekologiczne cieszą się wśród konsumentów coraz większą popularnością (Kawa, Cyran 2015, Łuczka-Bakuła 2007, Granatstein i in. 2008, Zmarlicki 2010). Ten wzrost, wynikający z włączenia produktów ekologicznych do swojej oferty, jest szansą dla przetwórców oraz sprzedawców hurtowych i detalicznych (Pilarczyk i Nestorowicz 2010). Perspektywy rozwoju branży rolnictwa ekologicznego, a także produktów ekologicznych są co raz większe. Podmioty uczestniczące w takiej produkcji mogą zaspokajać swoje potrzeby, a także spełnić oczekiwania nabywców, utrzymując zyski działalności na stabilnym poziomie, tak aby umożliwiały im kontynuowanie działań inwestycyjnych. Aby minimalizować ryzyko działań marketingowych, a równocześnie podnosić zyski, należy uważnie śledzić zachowania oraz preferencje konsumenta (Pilarczyk i in. 2007; Jąder 2008; Kuboń i in. 2014; Olech i Kuboń 2015).

Rosnąca popularność produktów ekologicznych w dużym stopniu wynika ze zmiany preferencji i zachowań konsumentów, którzy coraz chętniej sięgają po tego rodzaju produkty. Rolnictwo ekologiczne jest odpowiedzią na zmieniające się potrzeby konsumentów, którzy są coraz bardziej świadomi tego, że nieodpowiednie odżywianie może być przyczyną wielu chorób, oraz że żywność powstała w warunkach naturalnych spełnia ich oczekiwania. Dlatego należy prowadzić działania zmierzające do zmiany nawyków żywieniowych od najmłodszych lat, zachęcając do konsumpcji produktów ekologicznych. Alternatywą dla żywności konwencjonalnej jest żywność ekologiczna, która

powinna zapewniać bezpieczeństwo zdrowotne z racji naturalnych cech, jakie charakteryzują te produkty. Kluczem do pożądaných decyzji zakupowych jest odpowiednia wiedza na temat cech żywności ekologicznej i korzyści, jakie niesie za sobą jej spożywanie. Brak odpowiedniej wiedzy w tym zakresie może wpływać na niewłaściwe decyzje nabywczę konsumentów. (Kawa i Cyran 2015).

Produkcja ekologiczna, ze względu na swoją specyfikę, wymaga szczególnego wsparcia wiedzą naukową, którą można przełożyć na działania praktyczne. Stąd konieczność prowadzenia różnorodnych badań i doświadczeń wspomagających rozwój tego sektora gospodarki. Należy zauważyć, że potrzeby oraz zachowania konsumentów są bardzo zróżnicowane i zależą od wielu czynników.

Po przystąpieniu Polski do Unii Europejskiej w 2004 roku, można zauważyć wzrost rozwoju produkcji żywności ekologicznej. Żywność ekologiczna postrzegana jest przez konsumentów jako bezpieczna i zdrowa. W Polsce zakup tej żywności jest jednak znacznie mniejszy w przeciwieństwie do innych krajów. Jednym z czynników ograniczających rozwój rynku żywności ekologicznej jest niska świadomość konsumentów i brak wiedzy o roli oraz znaczeniu żywności ekologicznej.

Pomimo niskiego poziomu świadomości polskich mieszkańców dotyczących działań proekologicznych w stosunku do innych państw, to chęć pogłębienia wiedzy dotyczącej wykonywania świadomych zakupów, zwiększające się zarobki obywateli oraz narzucanie przez mass media zdrowego stylu życia, powoduje wzrost popytu na żywność ekologiczną. Według danych z Głównego Inspektoratu Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych już ponad dwa miliony Polaków – to jest około 7% społeczeństwa regularnie kupuje i spożywa żywność ekologiczną, a 28% zaopatruje się w nią nieregularnie, jednocześnie deklarując, że chce kupować ją znacznie częściej (www.wodr.poznan.pl/baza-informacyjna/srodowisko/rolnictwo-ekologiczne/zasady-etykietowania-produktow-ekologicznych/item/7470-rynek-i-dostepnosc-zywnosci-ekologicznej-w-polsce, dostęp 26 maja 2020 r.).

Niestety liczba producentów ekologicznych spada, w grudniu 2017 roku ich liczba wynosiła 21 400, a w grudniu 2018 roku 20 549. Jest to spadek o 941 producentów, czyli o ponad 4% w skali roku – informacje zawarto w raporcie o stanie rolnictwa ekologicznego w Polsce w latach 2017–2018 (www.ijhars.gov.pl/pliki/A-pliki-z-glownego-katalogu/ethernet/2019/grudzien/SME/Raport%20ekologiczny_2017_2018_wersja_internet.pdf dostęp 26 maja 2020 r.).

Cel pracy

Celem pracy jest analiza zachowań nabywców produktów ekologicznych oraz identyfikacja czynników determinujących wybory konsumentów dotyczące zakupów takich produktów.

Materiały i metody

Materiał badawczy stanowił kwestionariusz ankiety na temat zachowań nabywców produktów ekologicznych. Ankieta składała się z 8 pytań i metryczki. Pytania były zarówno pojedynczego, jak i wielokrotnego wyboru. Badanie zostało wykonane za pośrednictwem formularza zamieszczonego na stronie internetowej w lipcu i sierpniu 2019 roku wśród mieszkańców Polski. W badaniu wzięło udział 160 osób zróżnicowanych pod względem płci, wieku oraz miejsca zamieszkania. Ankieta została przeprowadzona w sposób anonimowy.

W pracy wykorzystano różne metody badawcze:

- metodę dokumentacyjną w postaci kwestionariusza ankiety – do gromadzenia materiału badawczego,
- metodę studiów piśmiennictwa – do opracowania rozdziału dotyczącego zagadnień w świetle literatury.

Otrzymane dane zliczono, pogrupowano, a wyniki przedstawiono w formie opisowej, tabel i wykresów. Przy interpretacji wyników posłużono się metodą porównawczą i opisową. Wyniki badań zostały opracowane przy pomocy arkusza kalkulacyjnego Microsoft Office Excel.

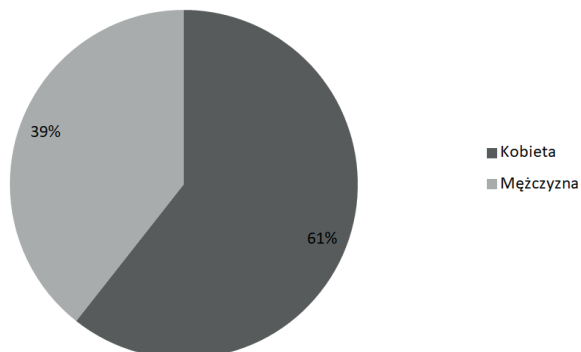
Charakterystyka badanej próby

Badanie ankietowe przeprowadzono zostało w lipcu i sierpniu 2019 roku. Osoby biorące udział w ankiecie były przedstawicielami społeczności zamieszkującej różne części kraju, zróżnicowani pod względem płci, wieku, wykształcenia, jak i liczby osób stanowiących gospodarstwo domowe. Grupę badawczą stanowiło 160 respondentów 39% mężczyzn i 61% kobiet (Wyk. 1).

Ankietowani zostali podzieleni na 6 grup wiekowych: poniżej 19 lat, 20–30 lat, 31–41 lat, 42–52 lat, 53–63 lat oraz powyżej 64 lat. Najbardziej liczną grupę stanowili respondenci w przedziale wiekowym 20–30 lat, natomiast najmniej liczną 53–63 lat oraz powyżej 64 lat, ponieważ z tych grup wiekowych nikt nie udzielał odpowiedzi (Wyk. 2).

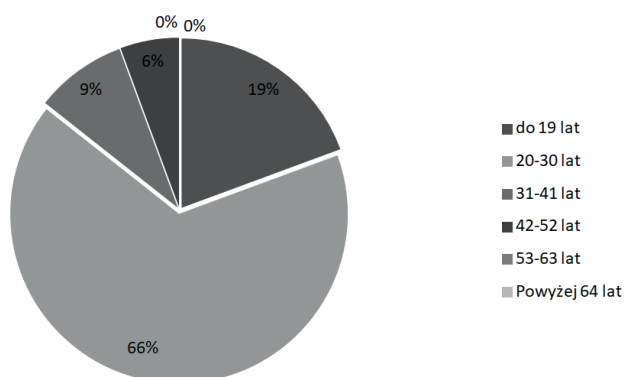
Ankietowani zostali zapytani o miejsce zamieszkania, 30% badanych okazało się mieszkańcami wsi, 26% pochodziło z miasta do 50 tys. mieszkańców, następnie 21% respondentów zamieszkuje miasto powyżej 500 tys. mieszkańców.

Wyk. 1. Płeć badanych osób.



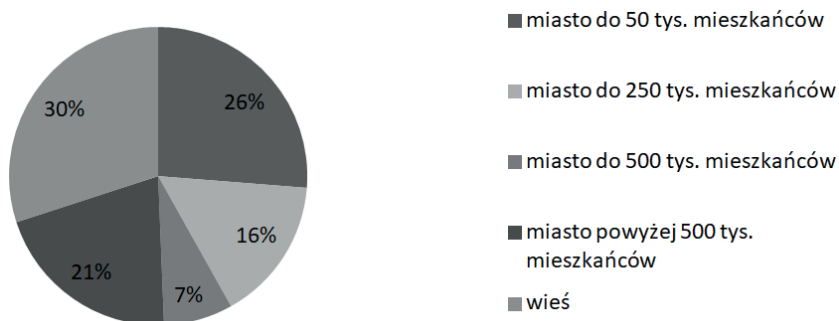
Źródło: Opracowanie własne

Wyk. 2. Wiek respondentów.



Źródło: Opracowanie własne

Wyk. 3. Miejsce zamieszkania badanych osób.



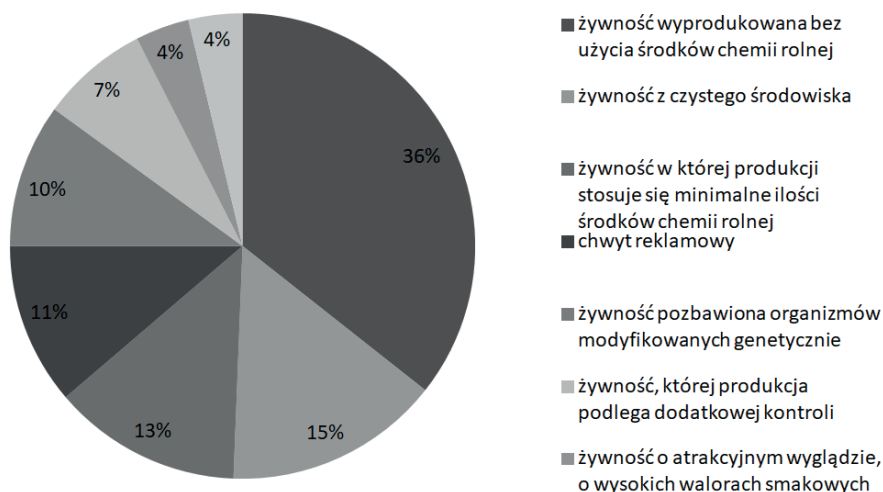
Źródło: Opracowanie własne

Najmniej pochodziło mieszkańców z miasta do 250 tys. (16%) i z miasta do 500 tys. mieszkańców (Wyk. 3).

Wyniki badań

Pierwszym zadaniem pytaniem było *Jak rozumie Pan/i pojęcie żywności ekologicznej?* Było to jedno z zasadniczych pytań, które świadczyło o wiedzy respondentów na temat żywności ekologicznej. Wyniki przedstawione na Wyk. 4 świadczą o tym, że najwięcej badanych osób (36%) odpowiedziało, że jest to żywność wyprodukowana bez użycia środków chemii rolnej. Mniejszy odsetek respondentów (15%) zdefiniowało żywność ekologiczną jako żywność z czystego środowiska, a 13% ankietowanych odpowiedziało, że jest to żywność, do której stosuje się minimalne ilości chemii rolnej (13%). Pozostałe odpowiedzi dotyczące żywności o atrakcyjnym wyglądzie i o wysokich walorach smakowych oraz o żywności bogatej w składniki odżywcze kształtowały się na takim samym poziomie (4%).

Wyk. 4. Rozumienie pojęcia żywności ekologicznej.



Źródło: Opracowanie własne

Kolejne pytanie dotyczyło znajomości loga rolnictwa ekologicznego. Prawidłową odpowiedź, tj. Rys. 1a zaznaczyło 41% ankietowanych.

Pytając o metody odróżniania żywności ekologicznej od „pozostałej”, uzyskano następujące informacje (Wyk. 5). Najwięcej, bo aż 33,8% badanych zwraca

Rys. 1a. Europejskie logo żywności ekologicznej.



Źródło: ecoandlife.pl/certyfikaty/eko-lisc/ (dostęp 26 maja 2020)

Rys. 1b. Znak potwierdzający zgodność wyrobu z wymaganiami rolnictwa ekologicznego.



Źródło: ecoandlife.pl/certyfikaty/eko-lisc/ (dostęp 26 maja 2020 r.)

Rys. 1c. Europejskie logo ekologicznych produktów (funkcjonujące do 31.06.2010 r.)



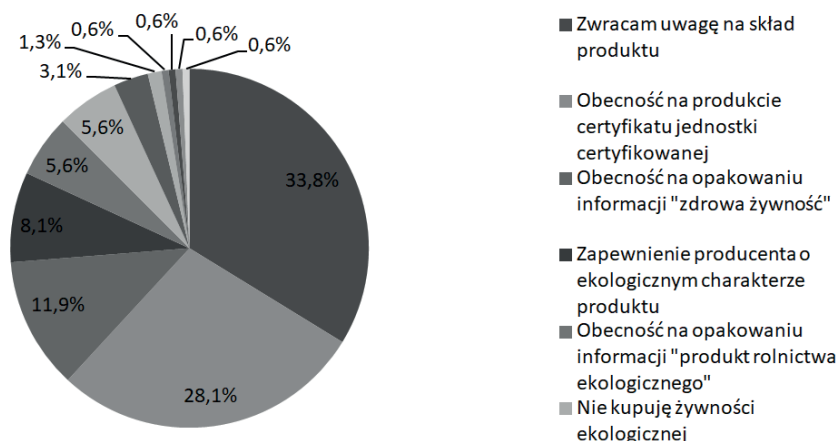
Źródło: www.krir.pl/ (dostęp 26 maja 2020 r.)

Rys. 1d. Produkt przyjazny środowisku



Źródło: www.environmentblog.net/eco-friendly-products/ (dostęp 26 maja 2020 r.)

Wyk. 5. Sposoby odróżniania żywność ekologiczną od pozostałej.



Źródło: Opracowanie własne

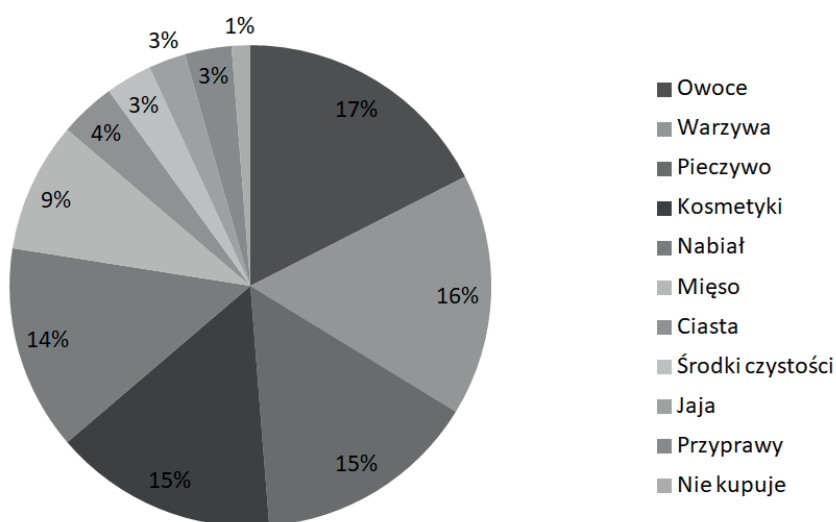
uwagę na skład produktu, następnie 28,1% ankietowanych szuka na opakowaniu certyfikatu jednostki certyfikowanej, a 11,9% sprawdza na opakowaniu informacji „zdrowa żywność”. Natomiast 0,6% ankietowanych odpowiedziało, że nie kupuje żywności ekologicznej.

Ankietowani na pytanie o najczęściej kupowane produkty ekologiczne odpowiedzieli, że są to owoce (17%) oraz warzywa (16%). Taka sama liczba ankietowanych wskazała pieczywo oraz kosmetyki (15%), oraz podobna liczba respondentów (14%) uznała nabiał za najczęściej kupowany produkt ekologiczny. Identyczna liczba respondentów (3%) wskazała środki czystości, jaja i przyprawy, a tylko 1% badanych stwierdzili, że wcale nie kupują żywności ekologicznej (Wyk. 6).

Następne pytanie dotyczyło częstotliwości zakupu żywności ekologicznej. Badania wykazały, że 29% ankietowanych kupuje ją kilka razy w miesiącu, 28% kupuje żywność ekologiczną kilka razy w tygodniu, 27% respondentów dokonuje takiego zakupu sporadycznie, a 15% regularnie – na co dzień. Żywności ekologicznej nie kupuje w ogóle jedynie 1% badanych (Wyk. 7).

Respondentów zapytano również o najczęstsze miejsce zakupu produktów ekologicznych (Wyk. 8). W tym pytaniu ankietowani mogli zaznaczyć więcej niż jedną odpowiedź. Najwięcej, bo aż 35,7% ankietowanych deklaruje, że najczęściej zaopatruje się w produkty ekologiczne w supermarketach. Lokalne targowiska to miejsce zakupu dla 15,7% ankietowanych, natomiast 12,8% badanych osób odpowiedziało, że zakupu produktów ekologicznych dokonują w centrach handlowych, a 11,1% ankietowanych wskazało sklep osiedlowy.

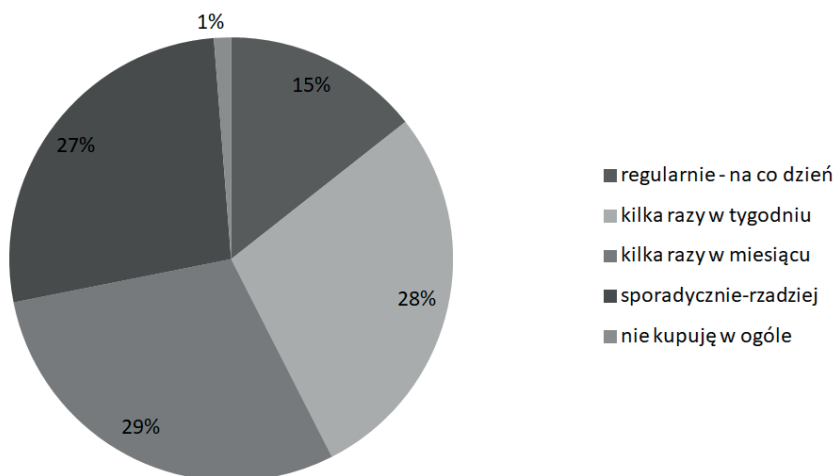
Wyk. 6. Najczęściej kupowane produkty ekologiczne.



Źródło: Opracowanie własne

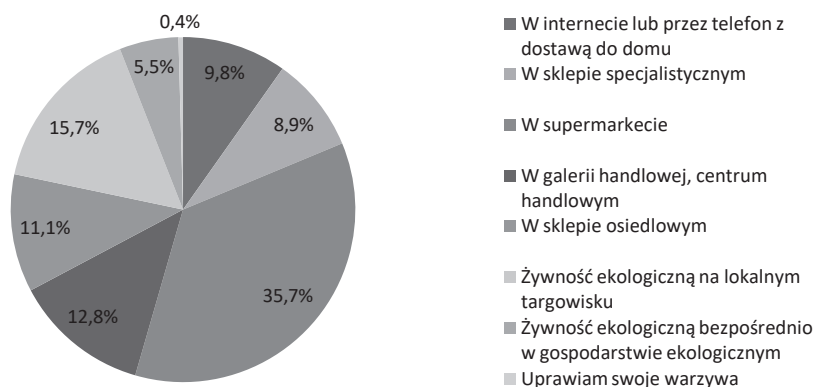
Podobna ilość badanych osób zadeklarowała, że dokonują zakupu w sklepach internetowych (9,8%) oraz specjalistycznych (8,9%). Bezpośrednio w gospodarstwie ekologicznym żywność kupuje 5,5% respondentów. Najmniejsza ilość badanych osób wskazała, że indywidualnie prowadzi uprawę ekologiczną (0,4%).

Wyk. 7. Częstotliwość zakupu żywności ekologicznej.



Źródło: Opracowanie własne

Wyk. 8. Najczęstsze miejsca zakupu produktów ekologicznych.

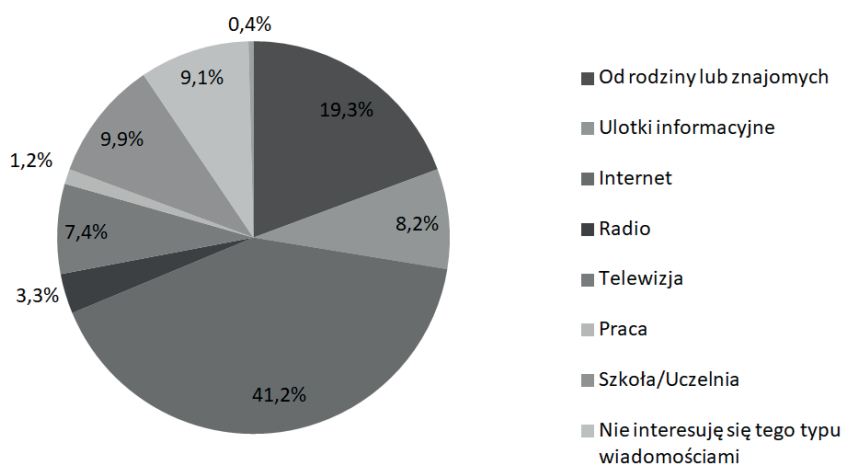


Źródło: Opracowanie własne

Następne pytanie w ankiecie dotyczyło źródła informacji odnośnie do żywności ekologicznej. Najwięcej respondentów (9,1%) odpowiedziało, że nie interesują się tego typu wiadomościami, 7,4% wskazało, że najlepszym źródłem informacji jest telewizja, 3,3% – radio, a 1,2% – praca. Doświadczenie stanowi źródło wiedzy na temat produktów ekologicznych jedynie dla 0,4% ankietowanych (Wyk. 9).

Motywy zakupu produktów ekologicznych dla 39,4% badanych jest to, że zostały wyprodukowane bez użycia chemii rolnej i przemysłowej. Następnie

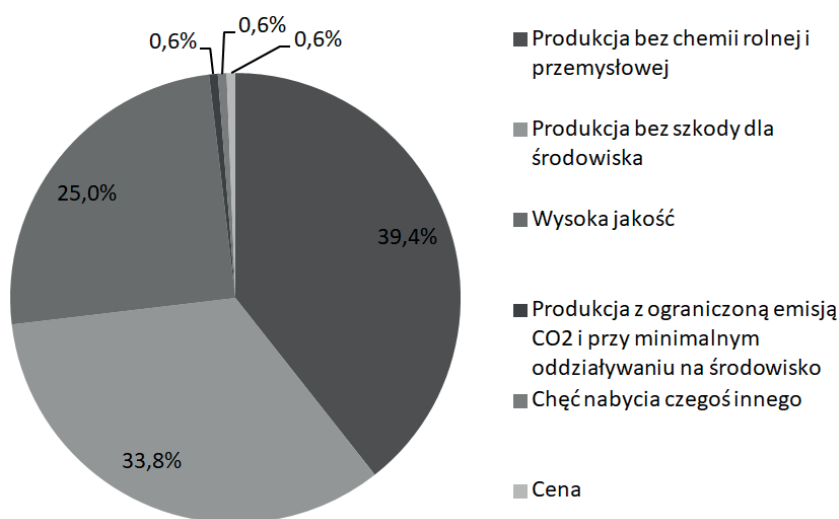
Wyk. 9. Źródło informacji na temat produktów ekologicznych.



Źródło: Opracowanie własne

33,8% badanych uważa za ważne to, że zostały wyprodukowane bez szkody dla środowiska oraz 25% ankietowanych motywuje zakupy ekologiczne wyższą jakością produktów. Taka sama liczba ankietowanych (0,6%) uważa, że istotne przy zakupie produktów ekologicznych jest to, że posiadają mniejsze ślady CO₂, a zarazem mniejsze szkody dla środowiska oraz że przy wyborze kierują się ciekawością (Wyk. 10).

Wyk. 10. Motyw zakupu produktów ekologicznych.



Źródło: Opracowanie własne

Dyskusja

W kontekście przedstawionych wyników badań własnych przeprowadzonych wśród 160 przebadanych osób kobiety stanowiły 61%, a resztę, czyli 39% – mężczyźni. W podobnych badaniach (Kułyka i Dubicki 2019) większość badanych również stanowiły kobiety (68%). Ponad połowa badanych to ludzie młodzi w przedziale wiekowym 20–30 lat, stanowili oni 66% respondentów. Również potwierdzają to wyniki badań Kułyka i Dubickiego (2019), gdzie młodzi ludzie stanowili 56% badanych. Badana grupa osób wybiera żywność ekologiczną, która jest wyprodukowana bez użycia środków chemii rolnej. Również badania Grzybowskiej-Brzezinskiej (2011) wskazują, że konsumenci bardzo często wybierają produkty ekologiczne, ponieważ wyprodukowane są bez szkody dla środowiska.

Wśród badanych aż 54 osoby (33,8%) zwracają uwagę na skład produktu, następnie 28,1% ankietowanych szuka na opakowaniu certyfikatu jednostki cer-

tyfikowanej, co jest jedynym pewnym potwierdzeniem ekologicznego produktu. Grębowiec (2018) w wynikach swoich badań, opisuje że 54% respondentów w celu odróżnienia produktu ekologicznego od konwencjonalnego najpierw czyta skład produktu lub sprawdza nazwę produktu.

Najczęściej nabywane przez przebadanych konsumentów produkty ekologiczne stanowiły owoce oraz warzywa. Najrzadziej nabywanymi produktami są środki czystości, jaja i przyprawy. Podobieństwo nabywcze konsumentów widoczne jest w badaniach przeprowadzonych przez Kułyka i Dubickiego (2019), które ukazują, że najczęściej kupowanymi produktami ekologicznymi są warzywa i owoce.

Analizując częstotliwość nabywania produktów ekologicznych, najczęściej odbywa się to kilka razy w miesiącu. W podobny sposób respondenci deklarowali w badaniach Grębowca (2018). Produkty ekologiczne również nabywali co najwyżej kilka razy w miesiącu. Uzyskane wyniki badań wskazują, że najczęstszym miejscem zakupu produktów ekologicznych dla 45% badanych są supermarkety lub hipermarkety, a bezpośrednio w gospodarstwie ekologicznym żywność kupuje 5,5% respondentów. Podobnie jak w badaniach Kułyka i Dubickiego (2019), supermarkety prowadzą prym co do sprzedaży produktów ekologicznych respondentom (53,6%). Wiedzę na temat produktów ekologicznych najwięcej respondentów (41,2%) uzyskuje z Internetu. Może to wynikać z ciągle postępującego procesu rozwoju nowoczesnych technologii wszechobecnie dostępnych. W badaniach Grębowca (2018) Internet stanowi podstawowe źródło wiedzy o produktach ekologicznych (83%), a ponad 77% stale czyta blogi o żywności ekologicznej i oficjalne strony producentów. W przeprowadzonych badaniach najczęściej wskazywanym motywem zakupu produktów ekologicznych było wyprodukowanie ich bez użycia chemii rolnej i przemysłowej. Badania Escher i Petrykowskiej (2016) wskazują, że konsumenci bardzo często wybierają produkty ekologiczne, ponieważ wyprodukowane są bez szkody dla środowiska.

Podsumowanie

Produkty ekologiczne obecne są na rynku od wielu lat, jednak w ostatnim czasie zdobywają coraz większą popularność. Ze względu na wiedzę o ekologii, jak i produkcji ekologicznej, konsumenci coraz częściej sięgają po te produkty.

Na podstawie przeprowadzonych badań można wywnioskować, że świadomość konsumentów na temat produktów ekologicznych wzrasta. Większość jednak rzadko kupuje takie produkty, głównie sytuacja ta spowodowana jest wyższą ceną (w porównaniu z żywnością uprawianą w sposób konwencjonalny)

ograniczającą zainteresowanie zakupem produktów ekologicznych. Z przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

Rezultaty badań wskazują, że produkty ekologiczne nie zajmują czołowych miejsc wśród zakupowych trendów Polaków. Najwięcej konsumentów kupuje produkty ekologiczne kilka razy w miesiącu, osoby które zaopatrują się w nią codziennie stanowią niewielki odsetek

Konsumenci kupują produkty ekologiczne głównie ze względów zdrowotnych i wysokiej jakości, najczęściej wybierając świeże owoce i warzywa, natomiast sporadycznie ekologiczne środki chemiczne czy też opakowania. Kupujący najchętniej dokonują zakupów tych produktów w supermarketach lub centrach handlowych.

Literatura:

- Escher I., Petrykowska J. 2016. Żywność ekologiczna w opinii młodych polskich konsumentów. Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, *Ekonomika Organizacja Gospodarki Żywnościowej*, 113: 33-44.
- Granatstein D., Kirby E., Willer H. 2008. *Current World. Status of Organic. Temperate Fruits*. Washington State University, FiBL/IFOAM, 4-15.
- Grębowiec M. 2018. Zachowania Nabywców na rynku produktów ekologicznych. Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. *Roczniki Naukowe Stowarzyszenia Rolnictwa i Agrobiznesu XX (2)*: 59-64.
- Grzybowska-Brzezińska M. 2011. Świadomość ekologiczna konsumentów a ich zachowania na rynku żywności. Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie. *Stud. & Proc. of Polish Assoc. for Know. Manag.*, 51: 242-251.
- Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych. 2013. Raport o stanie rolnictwa ekologicznego w Polsce w latach 2011–2012, Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych, Warszawa: 20 (<https://docplayer.pl/5886487-Raport-o-stanie-rolnictwa-ekologicznego-w-polsce-w-latach-2011-2012-inspekcja-jakosci-handlowej-artykulow-rolno-spozywczych.html> dostęp 26 maja 2020 r.)
- Inspekcja Jakości Handlowej Artykułów Rolno-Spożywczych. 2017. Raport o stanie rolnictwa ekologicznego w Polsce w latach 2015–2016. Warszawa: 10–38. (<https://www.teraz-srodowisko.pl/media/pdf/aktualnosc/3861-raport-o-stanie-rolnictwa-ekologicznego-w-polsce-w-latach-2015-2016.pdf> dostęp 26 maja 2020 r.)
- Jąder K. 2008. Znajomość preferencji konsumentów czynnikiem zwiększającym konkurencyjność produktów na rynku warzyw. *Rocz. Nauk. SERiA*, X(4): 145-148.

- Kawa M., Cyran P. 2015. Wiedza konsumentów jako determinanta decyzji zakupowych na rynku żywności ekologicznej. *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego Ekonomika i Organizacja Gospodarki Żywnościowej*, 112: 63-74.
- Kuboń M., Kwaśniewski D., Malaga-Toboła U., Tabor S. 2014. Model Solutions of Distribution Logistics with Regard to Organic Products, *Agric Eng.* 2(150): 77-90.
- Kułyk, P., Dubicki P. 2019. Problemy Rolnictwa Światowego. *Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie*, 19(1): 79-87.
- Łuczka-Bakuła W. 2007. Rynek żywności ekologicznej. PWE, Warszawa, s. 25.
- Olech E., Kuboń M. 2015. Motywy wyboru produktów ekologicznych przez konsumentów segmentu demograficznego z terenu małopolski. *Stow. Ekonom. roln. i agrob. Rocz. Nauk. tom XVII , zeszyt 1*: 164-169.
- Pilarczyk B., Mruk H., Szulce H. 2007. Marketing. Uwarunkowania i instrumenty, Wydawnictwo Akademii Ekonomicznej, Poznań, s. 24.
- Pilarczyk B., Nestorowicz R. 2010. Marketing ekologicznych produktów żywnościowych. Wolters Kluwer Polska, Warszawa, s. 32.
- Zmarlicki K. 2010. Preferencje studentów w zakresie zakupów owoców z produkcji ekologicznej. *Rocz. Nauk. SERiA, XII(4)*: 407-410.

ABSTRACT

ANALYSIS OF BEHAVIOR OF BUYERS OF ORGANIC PRODUCTS

The work deals with the development of the market of organic products, preferential purchased products and their awareness of organic food and non-food products.

Empirical research applied with the help of a questionnaire among organic products. The purpose of the work is to analyze the behavior of buyers of organic products and to identify the characteristics that determine consumer choices regarding the purchase of such products. This analysis was to illustrate mainly their preferences for buying organic products, as well as their understanding and explanation. It was found that they are one of the main factors limiting the development of the organic products market, i.e. low social rating and lack of knowledge about the role and products of organic food. Attitude and assessment about ecological behavior has a great impact on shaping markets for organic products and directing their development. Social education includes the creation of ecological opinion is a group for pro-ecological consumer behavior.

Słowa kluczowe: żywność ekologiczna, produkty ekologiczne, konsument

Keywords: organic food, organic products, consumers

Dane do kontaktu z autorem: Bartłomiej Bielawa,
e-mail: bartusb123@gmail.com, tel.: 534556592

Karolina Czyżun

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauk o Żywności

Naukowe Koło Mikrobiologii

Opiekun: dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska

ROLA BAKTERII *ENTEROCOCCUS* SPP. W PRODUKCJI MIĘS FERMENTOWANYCH

Charakterystyka drobnoustrojów należących do rodzaju *Enterococcus* spp.

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* są Gram-dodatnimi paciorkowcami, które powszechnie występują w przewodzie pokarmowym wszystkich zwierząt lądowych, w tym także ludzi, tolerują niekorzystne warunki środowiska. Zaliczane są do grupy bakterii określanych jako LAB (*LAB* – *lactic acid bacteria*), oznacza to, że w procesie fermentacji cukrów wytwarzają kwas mlekowy, na tym procesie opiera się ich metabolizm. Na początku XX wieku zostały one przypisane do serogrupy D paciorkowców β -hemolizujących. W preparatach mikroskopowych występują pojedynczo, parami lub w formie krótkich łańcuszków. Nie zaobserwowano u nich zjawiska wytwarzania otoczek. Nie posiadają rzęsek, poza nielicznymi wyjątkami. Są grupą drobnoustrojów katalazo-ujemnych (Różańska 2013).

Ich główną i bardzo znaczącą cechą jest wytrzymałość na działanie warunków środowiska. Jako nieliczne są w stanie rozwijać się w zakresie pH od 4,5 do 10,0 w temperaturach od 10 do 45°C, przy stężeniu NaCl 6,5% (Carrerr i in. 2010). Enterokoki hydrolizują eskulinę i tolerują wysokie (do 40%) stężenia żółci, stąd też powszechnie występują w jelicie człowieka oraz zwierząt. Obecność wymienionych cech pozwala na odróżnienie ich od innych grup mikroorganizmów, w tym streptokoków. Enterokoki są bakteriami zdolnymi przeżyć proces pasteryzacji, na skutek odporności na działanie wysokiej temperatury, tj. około 60°C przez 30 min., jednak optimum ich wzrostu mieści się w granicach 10–45°C (Ziarno 2006). Są one w stanie znieść ekstremalne warunki jednego

z parametrów środowiska, w jakim się znajdują pod warunkiem, że inne parametry zostaną zachowane w przedziale optimum. Ze względu na odporność na warunki stresowe paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* spp. są wszechobecne i spotkać je można w każdym środowisku. Izolowane są zarówno z gleby, żywności, kału czy też wód powierzchniowych, gdzie trafiają wraz ze ściekami, stąd też uważane są za bakterie wskaźnikowe, alarmujące o zanieczyszczeniu wód fekaliami (Byappanahalli i in. 2012). Ze środowiska bardzo często trafiają do żywności, a stamtąd do przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt. Według danych literaturowych w 1 g odchodów możemy znaleźć aż 10^8 CFU (ang. *Colony forming unit* – jednostka tworząca kolonię) (Różańska i in. 2013). Spośród znanych rodzajów enterokoków jedynie *Enterococcus faecalis* oraz *Enterococcus faecium* są liczbowo wykrywalne i powodują spotykane u ludzi infekcje. Szacuje się, że w 80% przypadków infekcji enterokokowych u ludzi wywołują wymienione gatunki.

Drobnoustroje z rodzaju *Enterococcus* spp. posiadają naturalną, jak i nabytą oporność na wiele antybiotyków. Oporność naturalna zazwyczaj kodowana jest chromosomalnie i najczęściej związana jest z tym, że dany drobnoustrój jest w stanie uniknąć szkodliwego działania antybiotyku poprzez zahamowanie oraz częściowe lub całkowite uniemożliwienie penetracji związku poprzez błony komórki bakteryjnej. W wyniku tego zjawiska antybiotyk nie jest w stanie dotrzeć do struktur docelowych komórki. Ten rodzaj oporności, ze względu na miejsce kodowania nie ulega przenoszeniu w obrębie gatunku oraz innych drobnoustrojów. Oporność nabyta oznacza, że bakteria w wyniku ewolucji oraz/lub mutacji materiału genetycznego wykształciła oporność na dany antybiotyk. Taki rodzaj oporności zazwyczaj kodowany jest na elementach mobilnych w genomie, oznacza to, że bakterie mogą zarówno nabywać takiej oporności od innych bakterii, ale także przenosić ją w obrębie gatunku czy rodzaju za pomocą horyzontalnego transferu genów. Enterokoki cechuje oporność na różne grupy antybiotyków. Posiadają one wrodzoną oporność na: linkozamidy, cefalosporyny wszystkich generacji, sulfametoksazol oraz na niewielkie stężenia aminoglikozydów. W niektórych badaniach wykazano oporność wrodzoną na takie antybiotyki jak makrolidy czy tetracykliny (Chajęcka-Wierzchowska i in. 2017). Istnieją także szczepy odporne na wankomycynę oznaczane jako VRE (ang. *vancomycin resistant enterococci*) (Vignaroli i in. 2011). Enterokoki są używane jako kultury starterowe lub jako kultury wspomagające do zaszczepienia kiszzonek, fermentowanych produktów mlecznych oraz jako probiotyki. W przemyśle spożywczym pełnią główną rolę w poprawie i rozwoju walorów smakowych serów, jako probiotyki mogą przyczyniać się do polepszenia równowagi mikrobiologicznej oraz są pomocne w leczeniu nieżyty jelit i żołądka

u ludzi i zwierząt. Dodatkowo enterokoki posiadają cechy użyteczne w biotechnologii żywności, takie jak produkcja bakteriocyn działających hamująco na bakterie z rodzaju *Listeria* (Giraffa 2002).

Produkcja mięs fermentowanych

Wiele lat temu ludzie nauczyli się stosować drobnoustroje obecne w środowisku do produkcji żywności fermentowanej. Pierwsze wzmianki o produkcji żywności fermentowanej wywodzą się z czasów starożytnych z rejonu Morza Śródziemnego, gdzie panują dogodne warunki klimatyczne (temperatura oraz odpowiednia wilgotność powietrza) (Neffe-Skocińska 2011). Po raz pierwszy LAB (*lactic acid bacteria* – bakterie fermentacji mlekowej) zostały użyte jako kultury starterowe w 1940 roku, co pozwoliło na skrócenie czasu dojrzewania mięs oraz regularne uzyskiwanie produktu o danych cechach sensorycznych. Cechy mikroorganizmów odpowiedzialnych za proces fermentacji żywności pozwalają uzyskać pożądane walory smakowe oraz zapachowe, a także posiadają właściwości konserwujące, a niekiedy także zdrowotne.

Proces produkcji może odbywać się w warunkach fermentacji kontrolowanej, gdzie do żywności dodawane są specjalnie wyselekcjonowane mieszanki drobnoustrojów prowadzące do otrzymania produktu o oczekiwanych cechach bądź podczas fermentacji spontanicznej, gdzie proces fermentacji oparty jest na mikrobiocie środowiskowej, która losowo dostaje się do surowca i zmienia jego właściwości. Drobnoustroje biorące udział w fermentacji żywności muszą, między innymi, posiadać zdolność rozkładania cukrów do kwasu mlekowego, co w produkcji mięs odgrywa bardzo ważną rolę, ponieważ obniża pH surowca oraz redukcji azotanów do azotynów, które następnie ulegają rozkładowi do tlenku azotu, co w następstwie zapewnia apetyczne czerwone zabarwienie mięs fermentowanych (Bamforth 2005).

Za kształtowanie smaku odpowiedzialne są mikroorganizmy mające zdolność do syntezy enzymów lipolitycznych oraz proteolitycznych, natomiast zdolność syntezy katalazy i peroksydazy odpowiada za stabilizację barwy. Kultury przemysłowe stosowane w przemyśle mięsnym zazwyczaj składają się z kultur mieszanych mających w składzie bakterie fermentacji mlekowej, a także drobnoustroje z rodzajów *Micrococcus* i *Staphylococcus*, czasem drożdże, promieniowce oraz pleśnie. W fermentacji wędlin surowych główną rolę odgrywają bakterie fermentacji mlekowej, gdyż produkują kwas organiczny z cukru zawartego w mięsie i/lub dodanego podczas procesu produkcji (Hać-Szymańczuk, Roman 2009). W niewielkich ilościach wytwarzane są także inne produkty przemiany materii takie jak kwas octowy czy etanol, które mogą

znacząco wpływać na cechy organoleptyczne gotowego produktu. Znacznie częściej stosowane są homofermentatywne LAB, wytwarzające tylko kwas mlekowy, który jest skutecznym środkiem hamującym rozwój niepożądanej mikrobioty.

Proces technologiczny powinien przebiegać bez zakłóceń, dlatego też wymagane jest, aby drobnoustroje stosowane do produkcji mięs fermentowanych były zdolne do rozwoju w produkcji, do którego zostały wprowadzone. Powinny korzystnie wpływać na cechy organoleptyczne produktu lub nie mieć na niego negatywnego wpływu. Pożądana jest umiarkowana aktywność do produkcji kwasów. Drobnoustroje powinny wykazywać działanie antagonistyczne względem bakterii powodujących zepsucie żywności, czy też wywołujących choroby i zatrucia konsumentów. Ich przeżywalność powinna być zachowana, a liczba żywych komórek powinna utrzymywać się na poziomie (10^5 – 10^7 jtk/g lub cm^3) w okresie końca daty przydatności do spożycia. Początkowa liczba żywych komórek drobnoustrojów w kulturze starterowej nie powinna być mniejsza niż 10^5 jtk/g produktu. Bakterie używane do produkcji mięs fermentowanych powinny charakteryzować się niską aktywnością i rozwojem w zakresie temperatur 0–15°C, w celu zapobiegania wzrostu kwasowości produktu podczas przechowywania, a także w celu podniesienia trwałości i utrzymania liczebności komórek na właściwym poziomie (Hugas i in. 2003).

Enterokoki w produkcji mięs fermentowanych

Enterokoki kolonizują surowce pochodzenia zwierzęcego i mogą się rozwijać, a nawet namnażać podczas fermentacji (Giraffa 2002). Enterokoki są w stanie zakwaszać produkt, tym samym pozytywnie wpływając na jego trwałość (Bystron 2004). Najlepiej namnażają się w produktach, w których żadne inne kultury starterowe ani wspomagające nie zostały dodane. Enterokoki zostały określone jako mikroorganizmy psujące przetworzone, gotowane mięsa ze względu na ich zdolność do przetrwania procesu pasteryzacji lub w wyniku kontaminacji podczas ostatnich etapów produkcji takich jak porcjowanie i pakowanie.

W mięsach fermentowanych mikrobiota dominująca składa się z kilku gatunków LAB, głównie należących do rodzajów *Lactobacillus* i *Enterococcus*, z czego głównie występuje *Enterococcus faecium*. Oba rodzaje bardzo często współdziałają podczas procesu fermentacji. W krajach śródziemnomorskich wiele tradycyjnych lokalnych produktów jest rozprowadzanych przez małe firmy, lokalnych rzeźników czy farmy. Podczas badań nad składem mikrobioty greckich kiełbas dojrzewających wykazano, że populacja paciorkowców

z rodzaju *Enterococcus* wzrastała miarowo i stabilnie, zwiększając populację z 2×4 na $5 \times 4 \log \text{ jtk/g}^{-1}$ podczas pierwszych pięciu dni fermentacji (Fontana i in. 2009). Przeprowadzono badania, w których zbadano 31 naturalnie fermentowanych kiełbas, kupionych w różnych supermarketach położonych na północny-wschód od Hiszpanii. Wykazano, że enterokoki stanowiły około 40% całkowitego składu gatunkowego bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z produktów (Martin i in. 2001). Inne badania wykazały, że liczba enterokoków zmieniała się podczas dojrzewania kiełbas o wysokim pH, w dwóch różnych zakładach produkcyjnych, o takim samym składzie oraz podczas takiej samej technologii produkcji. Partie, które wykazały najniższą liczbę enterokoków na początku charakteryzowały się zahamowaniem wzrostu w późniejszym etapie produkcji, natomiast partie o znacznie wyższej liczbie tych bakterii charakteryzowały się wzrostem liczebności w późniejszych etapach. Użycie kultur konkurencyjnych zawierających bakterie z rodzaju *Lactobacillus* spowodowało znaczne różnice i zmniejszenie liczebności enterokoków w porównaniu z kiełbasami fermentowanymi, które nie zostały zaszczerpione tymi drobnoustrojami (Bover-Cid i in. 2000). Badania wykazały, że jakość mikrobiologiczna surowego mięsa, a także higiena procesu produkcji może mieć kluczowe znaczenie w osiągnięciu pożądanego wzrostu enterokoków podczas procesu fermentacji.

Obecność i utrzymanie się bakterii z rodzaju *Enterococcus* w mięsach fermentowanych może zostać przypisana ich zdolności do rozwoju w szerokim spektrum temperaturowym oraz ich tolerancji na wysokie stężenia soli w środowisku. Zazwyczaj koegzystują z *Lactobacillus* spp., które stanowią dominującą populację drobnoustrojów podczas dojrzewania kiełbas. Enterokoki nie zakwaszają mocno mięs, dlatego też w kiełbasach zawierających wysoki procent cukrów do fermentacji mogą nie być tak konkurencyjne jak bakterie z rodzaju *Lactobacillus*, ponieważ ich wzrost jest utrudniony ze względu na panujące warunki. Znacznie lepsze warunki do ich rozwoju panują w kiełbasach produkowanych lokalnie, które charakteryzują się znacznie wyższym pH (< 5) farszu mięsnego. To głównie z takich kiełbas izolowane są szczepy bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Przypuszcza się, że te drobnoustroje przyczyniają się do osiągnięcia oczekiwanych walorów organoleptycznych produktów, ze względu na swoje zdolności glikolityczne, lipolityczne oraz proteolityczne. Wykazano, że enterokoki izolowane z produktów mleczarskich produkują związki lotne (Sarantinopoulos i in. 2001). W badaniach udowodniono, że mają zdolność do redukcji mioglobiny odpowiedzialnej za ciemną i mało apetyczną barwę mięs, co przyczynia się do utrzymania jasnej barwy mięs ulegających procesowi fermentacji (Ariharia i in. 1994).

Wytwarzanie bakteriocyn

Enterokoki produkują metabolity o charakterze białkowym lub peptydowym, zwane bakteriocynami, a dokładniej enterocynami. Charakteryzują się one szerokim spektrum działania. Są to związki bardzo silnie zróżnicowane pod względem biochemicznym. Zdolność wytwarzania tych związków może być niesiona zarówno przez DNA plazmidowe, jak i chromosomowe. Pełnione przez nie funkcje pozwalają zaklasyfikować je do związków o działaniu antimikrobiologicznym, na przykład poprzez zahamowanie wzrostu innych drobnoustrojów, w tym także chorobotwórczych takich jak *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* czy *Listeria monocytogenes* (Balla i in. 2000).

Drobnoustroj produkujący bakteriocyny jest nie naturalnie odporny. Enterocyny należą do klasy IId bakteriocyn, co oznacza, że nie potrzebują one bodźca sygnałowego do wydzielania, a także mają znacznie odmienną sekwencję peptydów w porównaniu z innymi klasami. Jako przykład podać można enterocynę wytwarzaną przez *E. faecium* L50 EntL50A i EntL50B. Według badań enterocyna AS-48 jest pomocna w kontroli wzrostu *Bacillus cereus*, a także *Listeria monocytogenes* w żywności (Róžańska i in. 2013). Bakteriocyny odgrywają ważną rolę w produkcji mięs fermentowanych, ponieważ pozwalają na kontrolowanie wzrostu patogenów. Enterokoki produkujące enterocyny o właściwościach hamujących bakterie z rodzaju *Listeria* zostały wyizolowane z kiełbas fermentowanych (Cintas i in. 1997). Z tego względu enterokoki mogą być używane w produkcji mięs jako organizmy zwiększające ochronę produktów mięsnych. Warto zwrócić uwagę na enterocynę A i B, które początkowo wyizolowane zostały ze szczepu *E. faecium* CTC492 oraz *E. faecium* T136 (Aymerich i in. 1996). Obie bakteriocyny działają w sposób synergistyczny, oznacza to, że jeśli drobnoustroj przeżyje po styczności z jedną z tych bakteriocyn, to pewne jest to, iż nie będzie on w stanie przeżyć ekspozycji na drugą z nich (Casaus i in. 1997). Bakteriocyny enterokokowe mogą być używane jako naturalne środki ochrony żywności fermentowanej, w tym mięs otrzymywanych na drodze procesu dojrzewania. Bakteriocyny, a zwłaszcza enterocyny, są bardzo obiecujące jako alternatywy dla tradycyjnych chemicznych środków konserwujących. W połączeniu ze szczególnymi parametrami fizycznymi i chemicznymi oraz procesami, można zwiększyć efektywność działania bakteriocyn. W badaniach wykazano, że enterocyna AS-48 wykazuje właściwości bakteriobójcze wobec *Escherichia coli*. Bakteriocynogenne enterokoki można zastosować do rozwiązania problemów zarówno higienicznych, jak i psucia się produktów mięsnych (Błaszczuk i Dąbrowska 2017).

Produkcja amin biogennych

Aminy biogenne (BA, ang. *biogenic amines*) produkowane są przez bakterie z rodzaju *Enterococcus*. Są to podstawowe związki organiczne, które pojawiają się w żywności oraz napojach alkoholowych, które powstały na skutek procesu fermentacji, do których zaliczyć możemy: ser, długo dojrzewające kiełbasy, wino czy piwo (Gwiazdowska i Trojanowska 2005). BA powstają na drodze dekarboksylacji odpowiednich aminokwasów przez enzymy specyficzne dla substratu, które są produkowane przez mikroorganizmy obecne w żywności. W mięsach, podczas procesu fermentacji panują odpowiednie warunki do produkcji BA, ponieważ dochodzi do proteolizy oraz zakwaszania produktu. W zależności od stężenia amin biogennych w produkcie spożywczym oraz tolerancji konsumenta, może dojść do powstania alergii, zatrucia, bólu głowy czy biegunki. Z pewnych raportów wynika, że wszystkie szczepy enterokoków wyizolowane z kiełbas fermentowanych pochodzenia wieprzowego były zdolne do produkcji BA. W przypadku, kiedy mamy do czynienia z wyselekcjonowaną szczepionką, przeznaczoną do produkcji żywności fermentowanej niepożądana jest zdolność do produkcji amin biogennych. Zdarzyć się może, że taką zdolność będą posiadały szczepy izolowane z produktów powstałych na drodze spontanicznej fermentacji z udziałem szczepów, które do produktu dostały się inną drogą niż celowe zaszczepianie (Bover-Cid i in. 2001).

Podsumowanie

Enterokoki są powszechnie występującymi w środowisku drobnoustrojami. Można je spotkać zarówno w glebie, wodzie, żywności pochodzenia zwierzęcego, jak i w przewodzie pokarmowym ludzi i zwierząt. Ze względu na ich naturalne występowanie są wskaźnikiem procesu higieny produkcji żywności czy też kałowego zanieczyszczenia wód. Ich metabolizm opiera się głównie na fermentacji cukrów z wytworzeniem kwasu mlekowego, co pomaga w utrwaleniu produktu spożywczego, dzięki czemu pełnią także pozytywną rolę w produkcji mięs fermentowanych. Biorą udział w zachowaniu czerwonej barwy świeżego mięsa, dzięki zdolności do rozkładu methemoglobiny, a także pozytywnie wpływają na aromat i smak mięs. Głównie stosowane są w produkcji mięs fermentowanych w krajach śródziemnomorskich i prowadzą fermentację spontaniczną. W dogodnych warunkach ich liczebność jest na poziomie bezpiecznym dla zdrowia konsumenta i pozwala na produkcję tradycyjnych mięs fermentowanych z zachowaniem odpowiednich cech organoleptycznych produktu.

Literatura:

- Ariharia K., Cassens R. G., Luchansky J. B. 1994. Metmyoglobin Reduction Activity of Enterococci. *Fleischwirtschaft*, 74: 1203-1204.
- Aymerich T., Holo H., Havarstein L. S., Hugas M., Garriga M., Nes I. F. 1996. Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin A from *Enterococcus Faecium*, a New Antilisterial Bacteriocin in the Pediocin Family of Bacteriocins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 1676-1682.
- Balla E., Dicks L. M. T., Du Toit M., van der Merwe M. J., Holzapfel W. H. 2000. Characterization and Cloning of the Genes Encoding Enterocin 1071A and Enterocin 1071B, Two Antimicrobial Peptides Produced by *Enterococcus Faecalis* BFE 1071. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66: 1298-1304.
- Bamforth C. W. 2005. *Food, Fermentation and Micro-organisms*. Blackwell Sciences Publishing, Oxford. 26: 160-168.
- Błaszczuk U., Dąbrowska K. 2017. Charakterystyka i potencjalne zastosowanie bakteriocyn cyklicznych. *Post Mikrobiol.*, 56(4): 451-464.
- Bover-Cid S., Hugas M., Izquierdo-Pulido M., Vidal-Carou M. C. 2000. Amino-acid Decarboxylase Activity of Bacteria Isolated from Fermented Pork Sausages. *Int. J. Food Microbiol.*, 6: 185-189.
- Byappanahalli M. N., Nevers M. B., Korajkic A., Staley Z. R., Harwood V. J. 2012. Enterococci in the Environment. *Microbiol. Mol. Biol. R.*, 76(4): 685-706.
- Bystron J., Molenda J. 2004. Rola bakterii kwasu mlekowego w utrwalaniu fermentowanych przetworów mięsnych. *Życie Weterynaryjne*, 79(12): 688-690.
- Carrerr Gomes B., Gombossy de Melo-Franco B. D., Pereira De Martinis E. C. 2010. Dualistic Aspects of *Enterococcus* spp. in Foods. [w:] *Current Research in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Microbiology Book Series. Formatex Research Center, 2: 1119-1125.
- Casaus P., Nilsen T., Cintas L. M., Nes I. F., Hernandez P. E., Holo H. 1997. Enterocin B, a New Bacteriocin from *Enterococcus Faecium* T136 which Can Act Synergistically with Enterocin A. *Microbiology*, 143: 2287-2294.
- Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Łaniewska-Trokenheim Ł. 2017. Oporność na antybiotyki bakterii z rodzaju *Enterococcus* występujących w żywności. *Kosmos*, 66(314): 67-79.
- Cintas L. M., Casaus P., Havarstein L. S., Hernandez P. E., Nes I. F. 1997. Biochemical and Genetic Characterization of Enterocin P, a Novel Sec-dependent Bacteriocin from *Enterococcus Faecium* P13 with a Broad Antimicrobial Spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4321-4330.
- Fontana C., Gazzola A., Cocconcelli P. S., Vignolo G. 2009. Population Structure and Safety Aspects of *Enterococcus*. *Appl.*, 49: 411-414.
- Giraffa G. 2002. Enterococci from Foods. *FEMS Microbiol. Rev.*, 744: 19.

- Gwiazdowska D., Trojanowska K. 2005. Bakteriocyyny – właściwości i aktywność przeciwdrobnoustrojowa. *Biotech.*, 68: 114-130.
- Hać-Szymańczuk E., Roman J. 2009. Charakterystyka drobnoustrojów wchodzących w skład kultur starterowych i ich wykorzystanie w przetwórstwie mięsa. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*, 2: 131-135.
- Hugas M., Garriga M., Aymerich M.T. 2003. Functionality of Enterococci in Meat Products. *Int J. Food Microbiol.*, 88(2–3): 223-233.
- Martin B., Garriga M., Hugas M., Aymerich T. 2005. Genetic Diversity and Safety Aspects of Enterococci from Slightly Fermented Sausages. *J. Appl. Microbiol.*, 98: 1177–1190.
- Neffe-Skocińska K., Gierjekiewicz M., Kołożyn-Krajewska D. 2011. Optymalizacja warunków procesu fermentacji polędwicy surowo dojrzewających z dodatkiem bakterii probiotycznych A. *Nauka. Technologia. Jakość*, 6(79): 36-46.
- Różańska H., Lewtak-Piłat A., Osek J. 2013. Enterokoki – bakterie o wielu obliczach. *Życie Weterynaryjne*, 88: 562–564.
- Sarantinopoulos P., Andrighetto C., Georgalaki M.D., Rea M. C., Lombardi A., Cogan T. M., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E. 2001. Biochemical Properties of Enterococci Relevant to Their Technological Performance. *Int. Dairy J.*, 11: 621-647.
- Vignaroli C., Zandri G., Aquilanti L., Pasquaroli S., Biavasco F. 2011. Multidrug-resistant Enterococci in Animal Meat and Faeces and Co-transfer of Resistance from *Enterococcus durans* to a Human *Enterococcus faecium*. *Curr. Microbiol.*, 62(5): 1438-1447.
- Ziaro M. 2006. Bakterie rodzaju *Enterococcus* w mleku i przetworach mleczarskich. *Med. Weter.*, 67: 145-148.

ABSTRACT

THE ROLE OF *ENTEROCOCCUS* SPP. IN FERMENTED MEAT PRODUCTION

Enterococci are a natural microbiota of digestive tract in humans and animals and they are easily found in natural environment. It is commonly found that enterococci are used as sanitary indicators when it comes to meat as a raw material because of their presence in genitourinary tract of animals that are slaughtered. They take part in producing fermented meat during the process of spontaneous fermentation. During the process raw meat are usually colonized by bacteria coming from the environment less by starter cultures. Because of the care about maintaining traditional organoleptic traits and natural course of

the fermentation the process is taking place via natural microbiota from the environment. Enterococci helps during fermentation by co-existing with other lactic acid bacteria. They have the ability to produce proteolytic, glycolytic and lipolytic enzymes that contribute to flavoring ripening sausages and keeping red color of the meat. They synthesize bacteriocins that prevent unwanted and/or pathogenic microbiota from developing in fermented meat. In a very natural way, they contribute to protecting meat during the process of fermentation.

Słowa kluczowe: *Enterococcus*, fermentacja, mięso

Dane do kontaktu z autorem:

Karolina Czyżun

e-mail: czyzun.k@wp.pl

tel.: 531-731-211

Szymon Dubiejko, Urszula Zarzecka

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauki o Żywności

Naukowe Koło Mikrobiologii

Opiekun: dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska

WYSTĘPOWANIE WYBRANYCH CZYNNIKÓW WIRULENCJI U PACIORKOWCÓW Z RODZAJU *ENTEROCOCCUS* IZOLOWANYCH Z ŻYWNOŚCI POCHODZENIA ROŚLINNEGO

Wstęp

Na przestrzeni ostatnich lat znacznej zmianie uległ sposób żywienia ludzi na całym świecie. Zjawisko to dotyczy szczególnie krajów wysokorozwiniętych w Europie oraz Ameryce Północnej, gdzie poszerzeniu uległa wiedza konsumentów na temat źródeł pozyskiwanej żywności oraz jej wartości odżywczej. Według badań 4% obywateli Stanów Zjednoczonych czasowo lub na stałe wyeliminowało ze swojej diety pokarmy pochodzenia zwierzęcego, a kolejne 10% znacznie zmniejszyło spożywanie produktów z tego źródła (Cramer i in. 2017). Również w Polsce zauważalne są zmiany. W ostatniej dekadzie 1,6% Polaków zdecydowało się na dietę całkowicie wegańską, kolejne 1,6% wyeliminowało ze swojej diety produkty mięsne, a spora część ograniczyła ich spożycie (Patrzalek 2015). Głównymi czynnikami prowadzącymi do rezygnacji z pokarmów odzwierzęcych są pobudki moralne i etyczne, wyznaczniki religijne oraz chęć poprawy stanu zdrowia. Pożądanymi przez konsumentów efektami zwiększenia w diecie udziału surowców pochodzenia roślinnego są: lepsze samopoczucie, spadek masy ciała, poprawa funkcjonowania układu trawiennego i zmniejszenie ryzyka występowania chorób takich jak cukrzyca, nadciśnienie oraz niektóre nowotwory (Pawlak i in. 2014; Jackson i in. 2016).

Z punktu widzenia jakości mikrobiologicznej żywności szczególnie newralgiczne są produkty niepoddawane obróbce termicznej. Dania takie są powszechnie występujące w dietach eliminacyjnych opierających się na unikaniu

produktów zwierzęcych – surowce roślinne nie zawsze są poddawane procesom termicznym przed spożyciem lub są one przetwarzane w niewielkim zakresie. Często wręcz unika się wysokich temperatur w trakcie przygotowywania posiłków, aby zapobiec stratom wartości odżywczej oraz utracie charakterystycznych cech strukturalnych i smakowych. Istnieją nawet specjalne odmiany diet wegańskich opierające się na spożywaniu jedynie produktów niepoddawanych obróbce termicznej, tzw. *raw food*. Konsumpcja dużych ilości takich warzyw i owoców niesie ze sobą ryzyko zatruc spowodowanych przez zasiedlające je mikroorganizmy (Vojdani 2009). Ich źródłem mogą być gleba, woda irygacyjna, nawozy organiczne czy dzikie zwierzęta, a także reinfekcja w punktach przetwarzania i dystrybucji żywności. Najbardziej narażone na skażenia mikrobiologiczne są produkty, których jadalne części mają bezpośredni kontakt z glebą na przykład warzywa korzeniowe (Szczech i Kowalska 2010). Od kilkunastu lat zauważalny jest wzrost zatruc pokarmowych spowodowanych spożyciem świeżych warzyw i niepasteryzowanych soków (Simonne 2006).

Bakterie z rodzaju *Enterococcus* to Gram-dodatnie, względnie beztlenowe paciorkowce. Są odporne na działanie żółci i wywołują hemolizę każdego typu. Choć drobnooustroje te naturalnie bytują w przewodzie pokarmowym zwierząt, w tym człowieka to mogą wywierać negatywny wpływ na organizm, ponieważ są patogenami oportunistycznymi. Ich obecność często stwierdza się w środowisku naturalnym, gdzie trafiają na skutek zanieczyszczenia fekalnego, oraz w żywności, na skutek niezachowania standardów higienicznych w trakcie jej produkcji. Dwa gatunki najczęściej występujące w środowisku to *E. faecalis* oraz *E. faecium* (Araújo i Ferreira 2013).

Ważną cechą paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* jest ich wirulencja. Czynnikiem warunkującymi zjadliwość mogą być składniki komórek bakteryjnych lub wytwarzane przez nie związki. Z powodu wzrostu ilości zakażeń enterokokowych (głównie w środowisku szpitalnym) wzmociono badania dotyczące występowania czynników wirulencji u tych drobnoustrojów. Wykazano także, że wirulentne szczepy *Enterococcus* można wyizolować nie tylko ze środowisk klinicznych, lecz także próbek środowiskowych oraz żywności, także tej gotowej do spożycia (Dolka i Szeleszczuk 2013). Najczęściej stwierdzanymi u enterokoków czynnikami wirulencji są: żelatynaza degradująca kolagen i lamininy odpowiedzialne za odporność na uszkodzenia komórek zwierzęcych oraz substancja agregująca nasilająca przyleganie enterokoków do komórek kanalików nerek oraz internalizację bakterii przez komórki nabłonka jelita. Równie często występują białka powierzchniowe ułatwiające przyleganie drobnoustrojów do nabłonka oraz uczestniczące w syntezie biofilmu bakteryjnego i cytolizyna indukująca uszkodzenie zasiedlanych tkanek (Chajęcka-Wierzchow-

ska i in. 2017). Co ważne, geny oporności na antybiotyki i czynniki wirulencji są często umieszczane na tych samych mobilnych elementach genetycznych. Stąd opisane czynniki wirulencji mogą być przenoszone przez wysoce skuteczne mechanizmy przenoszenia genów (Eaton i Gasson 2001).

Wskazane mechanizmy i czynniki sprawiają, że pomimo prób eliminacji tych mikroorganizmów z żywności nadal stanowią one wysokie zagrożenie dla zdrowia człowieka. Wprowadzenie do diety żywności niepoddawanej obróbce termicznej lub obrabianej w niewielkim stopniu łączy się z wprowadzeniem do przewodu pokarmowego zawartej w tych produktach mikrobioty. Łącząc ten fakt ze stosunkowo powszechną kontaminacją jej przez bakterie z rodziny *Enterococcus* sp. oraz złożone mechanizmy adaptacyjne tych bakterii można dojść do wniosku, że patogeniza enterokoków staje się problemem zagrażającym bezpieczeństwu konsumentów, szczególnie dotyczącym osoby z grup ryzyka.

Cel pracy

Celem tego badania było wykrywanie za pomocą metod molekularnych obecności genów *gelE*, *asa1*, *esp* i *cylA* kodujących czynniki wirulencji u szczepów z rodzaju *Enterococcus* wyizolowanych z żywności pochodzenia roślinnego.

Materiały i metody

Izolacja szczepów Enterococcus i wstępna identyfikacja

Szczepy wyizolowane zostały z 20 próbek żywności pochodzenia roślinnego zakupionych w sklepach wielkopowierzchniowych oraz placówkach gastronomicznych na terenie Olsztyna. Były to świeże warzywa i owoce oraz surówki i sałatki. Materiały po zakupie zostały niezwłocznie przetransportowane do laboratorium i poddane analizom.

Następnie próbki żywności (10 g) zhomogenizowano w 90 ml zbuforowanej wody peptonowej (Merck, Niemcy). Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 24 h, a następnie posiano izolacyjnie za pomocą ezy na podłoże Slanetz-Bartley (Merck, Niemcy). Inkubację prowadzono w temperaturze 37°C przez 24 h, po czym wybrano wszystkie kolonie o morfologii typowej dla *Enterococcus* i prowadzono dalsze izolacje do momentu uzyskania czystych kolonii. Wstępną identyfikację izolatów przeprowadzono za pomocą następujących testów: barwienie metodą Grama oraz test na wytwarzanie katalazy i oksydazy.

Identyfikacja szczepów

Szczepy identyfikowano z wykorzystaniem technologii MALDI-TOF za pomocą spektrometru mas Vitek MS (bioMérieux, Durham, NC). Uzyskane

widma porównywano z bazą danych Vitek MS SARAMIS wyłącznie do celów badawczych (Research Use Only – RUO). Do przeprowadzenia analizy szczepy namnożono na podłożu TSA (Tryptic Soy Agar) (Merck, Niemcy) i inkubowano w 37°C przez 24 h. Następnie na poszczególne pola płytki testowej za pomocą jednorazowej ezy naniesiono pojedyncze kolonie oraz 1 µl roztworu kwasu α-cyano-4-hydroksycynamonowego i całkowicie wysuszone w temperaturze pokojowej. Szczep referencyjny *Escherichia coli* ATCC 8739 zastosowano jako kontrolę pozytywną do walidacji metody. Wszystkie izolaty testowano w dwóch powtórzeniach. Identyfikacja została uznana za ostateczną, gdy podane prawdopodobieństwo było większe niż 90%.

Izolacja genomowego DNA

Analizowane szczepy *Enterococcus* namnożono na podłożu TSA (Merck, Niemcy) w temperaturze 37°C przez 24 h. Pierwszym etapem izolacji DNA było wstępne trawienie ściany komórkowej. W tym celu zawiesiny bakteryjne w buforze Tris-HCl (10 mM, pH 8,5) inkubowano z roztworem lizozymu w temperaturze 37°C przez 20 min. Właściwą izolację genomowego DNA przeprowadzono za pomocą zestawu Genomic Mini DNA (A&A Biotechnology, Polska), zgodnie z instrukcjami producenta. Otrzymane DNA zawieszono w 200 µl buforu Tris-HCl (10 mM, pH 8,5) i przechowywano w temperaturze –20°C do dalszej analizy.

Występowanie genetycznych determinant wirulencji

Obecność genów odpowiedzialnych za występowanie czynników wirulencji oznaczano u wszystkich badanych szczepów. Oznaczano geny kodujące obecność żelatynazy (*gelE*), białka powierzchniowego enterokoków (*esp*), substancji agregującej (*asa1*) oraz cytolizyny (*cylA*). Geny te amplifikowano z wykorzystaniem reakcji Multiplex PCR, do której użyto opublikowane spe-

Tab. 1. Primery wykorzystane w badaniu.

Gen	Sekwencja primera 5'-3'	Wielkość produktu (bp)	Źródło
<i>gelE</i>	F: TATGACAATGCTTTTTGGGAT R: AGATGCACCCGAAATAATATA	213	Shafeek i in., 2018
<i>asa1</i>	F: GCACGCTATTACGAACTATGA R: TAAGAAAGAACATCACCACGA	375	
<i>esp</i>	F: AGATTCATCTTTGATTCTTGG R: AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510	
<i>cylA</i>	F: ACTCGGGGATTGATAGGC R: GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688	

cyficzne startery i warunki reakcji (Shafeek i in., 2018). Informacje o primerach wykorzystanych w badaniu zestawiono w tabeli (Tab. 1).

Produkty reakcji PCR rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny o stężeniu 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich) i wizualizowano w systemie do dokumentacji żeli Gbox (Syngene).

Wyniki

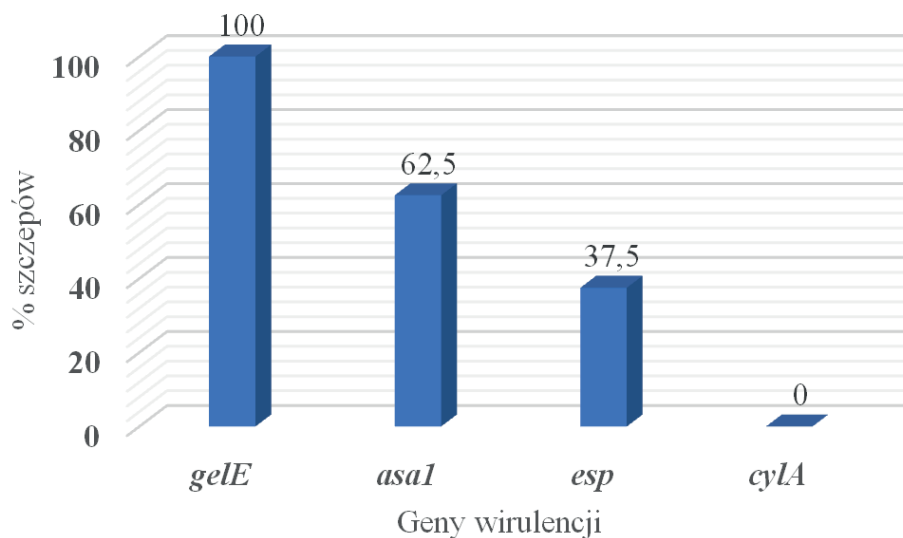
Występowanie Enterococcus w próbkach żywności oraz identyfikacja izolatów

Z 20 próbek żywności wyizolowano całkowitą liczbę 8 szczepów należących do rodzaju *Enterococcus*. Najwięcej szczepów ($n = 7$, 87,5%) wyizolowano z próbek świeżych warzyw i owoców. Z sałatek i surówek wyizolowano jeden szczep (13,5%). Zdecydowana większość izolatów (50%) została zidentyfikowana jako *E. faecium*, 37,5% szczepów należało do gatunku *E. casseliflavus* natomiast 13,5% szczepów zidentyfikowano jako *E. faecalis*.

Obecność czynników wirulencji

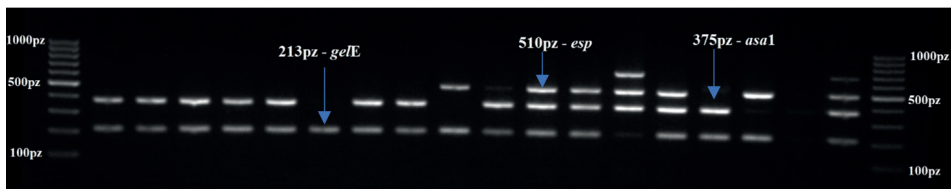
Spośród 4 analizowanych czynników wirulencji u badanych szczepów najczęściej stwierdzano obecność żelatynazy kodowanej przez gen *gelE*, który stwierdzono u wszystkich szczepów (100%). W przypadku 5 szczepów (62,5%)

Ryc. 1. Częstość występowania analizowanych genów wirulencji u badanych szczepów *Enterococcus*.



Źródło: Opracowanie własne

Ryc. 2. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR.



Źródło: Opracowanie własne

stwierdzono obecność genu *asa1* kodującego substancję agregującą, z kolei 3 szczepy posiadały gen *esp* odpowiedzialny za występowanie enterokokowego białka powierzchniowego. U żadnego z wyizolowanych szczepów nie stwierdzono obecności genu *cylA*, kodującego operon cytolizyny (Ryc. 1, Ryc. 2).

Dyskusja

Obecnie istnieje niewiele badań poruszających problem występowania oraz wirulencji paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* wyizolowanych z żywności pochodzenia roślinnego. Wynika to z tego, że drobnoustroje te najczęściej kojarzone są ze środowiskiem szpitalnym i próbkami środowiskowymi oraz żywnością pochodzenia zwierzęcego. W opracowaniach dotyczących produktów roślinnych autorzy sugerują jednak, że jest to środowisko, w którym obecność paciorkowców z rodzaju *Enterococcus* jest powszechna. Dominującym gatunkiem wśród wyizolowanych szczepów był *E. faecium*. Badania Trivedi i in. (2011) wykazały, że gatunkami najczęściej izolowanymi z warzyw i owoców były *E. faecalis*, *E. faecium*, a następnie *E. mundtii*. Z kolei Campos i in. (2013) podają, że większość wyizolowanych przez nich szczepów stanowił gatunek *E. casseliflavus*.

Ponieważ wielokrotnie wykazywano, że występowanie czynników wirulencji u bakterii z rodzaju *Enterococcus* może dotyczyć też szczepów izolowanych z żywności, wielu naukowców podjęło prace badawcze na ten temat. We wspomnianych badaniach, przeprowadzanych w ograniczonym zakresie, próbowano potwierdzić obecność czynników wirulencji w izolatach enterokoków z żywności pochodzenia roślinnego. Trivedi i in. (2011) w trakcie swoich badań wyizolowali z żywności 250 szczepów z rodzaju *Enterococcus*, z czego 75 zostało pozyskanych z surowców pochodzenia roślinnego. Największy udział w produktach roślinnych miał gatunek *E. faecalis* (52%), kolejnymi szczepami były: *E. faecium* (30%), *E. mundtii* (16%) oraz *E. casseliflavus* (1%). W żadnym ze szczepów nie stwierdzono genu *geIE* (0%). Obecność genu *asa1* została potwierdzona u 12% wyizolowanych drobnoustrojów, 8% szczepów posiada-

ło gen *esp* a 1% gen *cylA*. Z kolei Medeiros i in. (2014) w swoich badaniach uzyskali wyniki bardzo zbliżone do tych uzyskanych w niniejszym badaniu. Za pomocą techniki PCR stwierdzili obecność genów odpowiedzialnych za występowanie czynników wirulencji w następujących odsetkach: *gelE* – 78,2%; *asa1* – 18,2%; *cylA* – 7,2% oraz *esp* – 0%. Określono również zdolność wyizolowanych szczepów do tworzenia biofilmu, którą stwierdzono u 18,2% badanych drobnoustrojów. Gen *gelE* był najczęściej występującym czynnikiem wirulencji także w badaniach Abriouel i in. (2008). Gomes i in. (2008) izolowali szczepy *Enterococcus* z różnych źródeł, w tym warzyw i owoców. Określali także występowanie czynników wirulencji. Wszystkie szczepy pochodzące z warzyw były nosicielami genów *gelE*, *asa1* i *cylA* natomiast gen *esp* nie występował w żadnym z badanych szczepów.

Należy jednak zauważyć, że wszystkie wspomniane badania naukowe koncentrowały się głównie na izolatach należących do gatunków *E. faecalis* lub *E. faecium*. Powodem tego przypuszczalnie było to, że są one dominującymi gatunkami *Enterococcus* w środowisku szpitalnym. Pomimo rosnącego ryzyka zakażeń enterokokowych wywoływanych przez szczepy z innych gatunków (De Perio i in. 2006) niewiele jest dostępnych informacji na temat ich potencjalnej zjadliwości w odniesieniu do bezpieczeństwa żywności. Wspominani Gomes i in. (2008) w swoim badaniu oprócz *E. faecalis* i *E. faecium* wyizolowali z próbek żywności także szczepy zidentyfikowane jako *E. casseliflavus* i *E. gallinarum*, jednak obecność genów wirulencji oznaczali tylko u *E. faecalis* i *E. faecium*.

Sugeruje to konieczność zintensyfikowania oraz poszerzenia zakresu badań dotyczących występowania oraz określenia specyfiki szczepów z rodzaju *Enterococcus* występujących żywności pochodzenia roślinnego. Większą uwagę należy także skupić na gatunkach innych niż *E. faecalis* i *E. faecium*, zwłaszcza że podaje się, że w żywności pochodzenia roślinnego dominującym jest gatunek *E. casseliflavus*.

Wiedza na temat wirulencji szczepów *Enterococcus* izolowanych z żywności pochodzenia roślinnego wciąż pozostaje bardzo ograniczona. W badaniach przeprowadzonych w niniejszej pracy zarysowano ten problem. Otrzymane wyniki pozwalają sugerować, że spośród surowców pochodzenia roślinnego zarówno warzywa i owoce, jak i żywność przetworzona (surówki i sałatki) mogą stanowić istotne źródło wirulentnych szczepów *Enterococcus*.

Podsumowanie

Uzyskane wyniki pozwalają sugerować, że żywność pochodzenia roślinnego może być istotnym źródłem wirulentnych szczepów z rodzaju *Enterococcus*.

Ponieważ czynniki wirulencji często są przenoszone między mikroorganizmami za pośrednictwem ruchomych elementów genetycznych, należy stosować ściśle środki higieny w celu eliminowania takich drobnoustrojów z żywności, a tym samym zmniejszenia ryzyka przeniesienia ich na ludzi.

Literatura

- Abriouel H., Omar N. B., Molinos A. C., Lopez R. L., Grande M. J., Martínez-Viedma P., Ortega E., Martínez Cañamero M., Galvez A. 2008. Comparative Analysis of Genetic Diversity and Incidence of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among Enterococcal Populations from Raw Fruit and Vegetable Foods, Water and Soil, and Clinical Samples. *Int. J. Food Microbiol.*, 123: 38-49.
- Araújo T. F., Ferreira C. L. L. F. 2013. The Genus *Enterococcus* as Probiotic: Safety Concerns. *Braz. Arch. Biol. Tech.*, 56(3): 457-466.
- Campos J., Mourão J., Pestana N., Peixe L., Novais C., Antunes P. 2013. Microbiological Quality of Ready-to-eat Salads: An Underestimated Vehicle of Bacteria and Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes. *Int. J. Food Microbiol.*, 166(3): 464-470.
- Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Łaniewska-Trokenheim Ł. 2017. Virulence Factors of *Enterococcus* spp. Presented in Food. *LWT – Food Sci. Tech.*, 75: 670-676.
- Christensen E., Joho K., Matthews K. 2008. Streptogramin Resistance Patterns and Virulence Determinants in Vancomycin-susceptible Enterococci Isolated from Multi-component Deli Salads. *J. Appl. Microbiol.*, 104: 1260-1265.
- Dolka B., Szeleszczuk P. 2013. Diagnostyka bakteriologiczna gatunków *Enterococcus* spp. istotnych w patologii drobiu. *Życie Weterynaryjne*, (88)9: 763-768.
- Eaton T. J., Gasson M. J. 2001. Molecular Screening of *Enterococcus* Virulence Determinants and Potential for Genetic Exchange between Food and Medical Isolates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1628-1635.
- Gomes B. C., Esteves C. T., Palazzo I. C., Darini A. L. C., Felis G. E., Sechi L. A. 2008. Prevalence and Characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from Brazilian Foods. *Food Microbiol.*, 25: 668-675.
- Holger C., Christian S., Kessler M., Sundberg T., Leach J., Schumann D., Jon Adams J., Lauche R. 2017. Characteristics of Americans Choosing Vegetarian and Vegan Diets for Health Reasons. *J. Nutr. Educ. Behav.*, (49)7: 561-567.
- Jackson J., Williams R., McEvoy M., MacDonald-Wicks L. 2016. Is Higher Consumption of Animal Flesh Foods Associated with Better Iron Status among Adults in Developed Countries? A Systematic Review. *Nutrients*, (8)2: 89.

- Macovei L., Zurek L. 2007. Influx of Enterococci and Associated Antibiotic Resistance and Virulence Genes from Ready-To-Eat Food to the Human Digestive Tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, (21)73: 6740-6747.
- Medeiros A., Pereira R., Oliveira D., Martins P., d'Azevedo P., Van der Sand S., Frazzon J., Frazzon A. 2014. Molecular Detection of Virulence Factors among Food and Clinical *Enterococcus Faecalis* Strains in South Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, (1)45: 327-332.
- Patrzalek W. 2015. Zmiany nawyków żywieniowych w zachowaniach dekonsumpcyjnych. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Szczecińskiego: Problemy Zarządzania, Finansów i Marketingu* nr 38: 47-56.
- Pawlak R., Lester S., Babatunde T. 2014. The Prevalence of Cobalamin Deficiency among Vegetarians Assessed by Serum Vitamin B12: A Review of Literature. *Eur. J. Clin. Nutr.*, (68)7: 541-548.
- Simonne A. 2006. Principles and Practices of Food Safety for Vegetable Production in Florida, <https://journals.flvc.org/edis/article/view/116245> (dostęp: 17.02.2020 r.).
- Shafeek M., El-Malt L., Abdel Hameed K., El-Zamkan M. 2018. Some Virulence Genes of Pathogenic Enterococci Isolated from Raw Milk and Some Milk Products. *SVU-IJVS*, 1(1): 102-113.
- Strycharczyk M., Markuszewski L., Denys A. 2005. Zakażenia powodowane przez bakterie z rodzaju *Enterococcus sp.* na oddziałach urologii. *Urologia Polska*, (58)4: 257-260.
- Szzech M., Kowalska B. 2010. Mikroflora warzyw ekologicznych. *Nowości Warzywnicze*, 51: 65-72.
- Trivedi K., Cupakova S., Karpiskova R. 2011. Virulence Factors and Antibiotic Resistance in Enterococci Isolated from Food-stuffs. *Vet. Med.*, 56: 352-357.
- Vojdani A. 2009. Detection of IgE, IgG, IgA and IgM Antibodies against Raw and Processed Food Antigens. *Nutr. Metab. (Lond)* 6: 22-25.

ABSTRACT

OCCURRENCE OF SELECTED VIRULENCE FACTORS IN *ENTEROCOCCUS* ISOLATED FROM PLANT-DERIVED FOODS

The purpose of this study was to determine the presence of virulence factors: gelatinase, aggregation substance, enterococcal surface protein and cytolysin in *Enterococcus* strains isolated from food of plant origin, by analyzing the occurrence of genes encoding these virulence factors: *gelE*, *asa1*, *esp* and *cylA*.

There were 8 strains identified as *Enterococcus* which were isolated from 20 plant-derived (fruit, vegetables and salads) food samples. Gelatinase was found in all strains (100%), 62,5% had an aggregation agent and 37,5% had an enterococcal surface protein.

Obtained results suggest that food of plant origin may be an important source of virulent strains of the genus *Enterococcus*. Because virulence factors are often transmitted between microorganisms via mobile genetic elements, strict hygiene measures should be used to eliminate such microorganisms from food and thus reduce the risk of transmission to humans.

Słowa kluczowe: *Enterococcus*, czynniki wirulencji, żywność pochodzenia roślinnego

Keywords: *Enterococcus*, virulence factors, food of plant origin

Dane do kontaktu z autorem:

Szymon Dubiejko

E-mail: szymon.dubiejko@wp.pl

Joanna Gajewska, Patryk Wiśniewski

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Naukowe Koło Mikrobiologii

Opiekun: dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska

JAKOŚĆ MIKROBIOLOGICZNA NIEPASTERYZOWANYCH SOKÓW OWOCOWYCH I WARZYWNYCH

Wstęp

W ostatnich latach w Polsce zaobserwowano coraz większe zainteresowanie konsumentów składem, wartością odżywczą oraz pochodzeniem produktów spożywczych w tym również owoców i warzyw. Zarówno owoce, jak i warzywa stanowią bardzo dobre źródło błonnika, witamin, składników mineralnych, kwasów organicznych i innych substancji korzystnie wpływających na organizm człowieka (Hall i in. 2009). Stwierdzono również, że odpowiednie spożycie owoców i warzyw ma znaczenie w profilaktyce i leczeniu nowotworów, ze szczególnym uwzględnieniem tych, które zlokalizowane są w układzie pokarmowym. Soki owocowe mogą stanowić jedną z pięciu porcji (400 g) owoców i warzyw w ramach promocji ich spożywania 5 razy dziennie, co jest zalecane przez Światową Organizację Zdrowia (WHO) (Płocharski 2016). Według danych GUS spożycie soków owocowych i warzywnych w Polsce w 2019 roku wynosiło ponad 30 litrów na osobę na rok (GUS 2019). Zgodnie z Dyrektywą Rady 2001/112/WE z dnia 20 grudnia 2001 roku sok to produkt otrzymywany z jednego lub większej ilości gatunków zdrowych, dojrzałych owoców lub warzyw. Posiada on charakterystyczny smak i aromat typowy dla soku z danych surowców, z którego jest wytwarzany. Jest to produkt wykazujący zdolność do fermentacji, ale niesfermentowany. Do soku mogą być dodane: miazga, miąższ oraz aromaty pochodzące z owoców i warzyw, z których sok został wyprodukowany. W produkcji soków zabronione jest dodawanie barwników, konserwantów, jak również sztucznych aromatów.

Sok jest produktem bardzo zróżnicowanym w związku z czym, biorąc pod uwagę wiele kryteriów, soki można podzielić ze względu na:

- rodzaj surowca: soki owocowe, soki warzywne, soki owocowo-warzywne,
- rodzaj półproduktów: „soki świeże”, soki odtworzone z zagęszczonego przecieru,
- obróbkę termiczną: soki niepasteryzowane, soki pasteryzowane w niskiej temperaturze, soki pasteryzowane,
- wygląd i konsystencję: soki klarowne, soki naturalnie mętne, soki przecierowe.

Surowcami do produkcji soków świeżych mogą być warzywa między innymi marchew, seler, burak, pomidor oraz owoce, na przykład jabłka, gruszki, pomarańcze, mandarynki, grejpfruty, ananasy. Nieustannie wzbogacana oferta handlowa soków jednodniowych znajduje uznanie wśród konsumentów ceniących wysoką jakość oraz walory odżywcze tych produktów. Głównymi producentami soków jednodniowych w Polsce są firmy: Marwit, Ogrody Natury, Victoria Cymes, Viva Natura (Gientka i in. 2012). W tej grupie soków wyróżniają się soki bezpośrednio tłoczone warzywne i owocowe, zwane sokami NFC (ang. *Non From Concentrate*). Do grupy soków NFC zaliczają się tzw. soki „jednodniowe”. Soki niepasteryzowane nie są poddawane obróbce termicznej, enzymatycznej, filtrowaniu oraz klarowaniu (Zadernowski i in. 2003). Według deklaracji producenta przydatność soków do spożycia wynosi od 24 do 72 h w zależności od rodzaju wykorzystanego surowca. Warto zaznaczyć, że dla zapewnienia ich dobrej jakości zarówno sensorycznej, jak i mikrobiologicznej soki te powinny być przewożone i przechowywane z zachowaniem zasad łańcucha chłodniczego w temperaturze 2–6°C (Gientka i in. 2012). Brak jakiegokolwiek obróbki termicznej może mieć wpływ na bezpieczeństwo mikrobiologiczne tych produktów. Również wadliwa jakość surowców ma duże znaczenie dla zachowania jakości. Warto jednak zwrócić uwagę na to, że największym zagrożeniem dla pogorszenia jakości mikrobiologicznej tych soków są zachowania konsumenta polegające na przechowywaniu tych soków w nieodpowiedniej temperaturze, często w temperaturze otoczenia.

Soki niepasteryzowane zalicza się do żywności mało przetworzonej, ponieważ w trakcie ich produkcji wyeliminowane zostały zabiegi termiczne. Stąd stan mikrobiologiczny takich produktów uwarunkowany jest głównie jakością surowców, wody, technologii produkcji oraz temperatury przechowywania gotowego produktu. Pierwotnym źródłem zanieczyszczenia mikrobiologicznego soków są wadliwe surowce. Na etapie uprawy surowca owoce i warzywa są narażone na zanieczyszczenia mikroflorą pochodzenia glebowego lub z powietrza (Sokołowska 2012). Dane literaturowe donoszą, że źródłem drobnoustrojów patogennych wśród owoców i warzyw może być nawóz naturalny, który jest stosowany w gospodarstwach ekologicznych przy uprawie owoców i warzyw (Libudzisz i Kowal 2000).

Pomimo stosowanych systemów zapewnienia bezpieczeństwa żywności, na świecie wciąż odnotowywane są przypadki zatruc spowodowanych spożyciem soków, również niepasteryzowanych. Produkcja soków niepasteryzowanych jednodniowych pozwala na zachowanie większości cech smakowo-zapachowych oraz wartości odżywczej świeżego surowca, jednak jakość mikrobiologiczna gotowego produktu determinowana jest również przez przestrzeganie zasad GHP (ang. *Good Hygiene Practise*) (Nowicka i in. 2014). Działania te wymagają przechowywania i transportu soków niepasteryzowanych w warunkach chłodniczych. Zaniechanie tych wymagań stanowi potencjalne zagrożenie dla zdrowia konsumenta, ponieważ soki te same w sobie są źródłem niepożądanego mikroflory (Sokołowska i in. 2011). Ryzyko skażenia mikrobiologicznego produktów o niewielkim stopniu przetworzenia wiąże się z możliwością rozwoju licznych grup drobnoustrojów, także w warunkach przechowywania chłodniczego. Bakterie kwasu mlekowego oraz octowego, a także acidotolerancyjne grzyby, zarówno pleśnie, jak i drożdże stanowią często mikroflorę zakażającą owoce fermentujące (Kunicka 2004).

Kryteria mikrobiologiczne mają na celu zapewnienie w pewnym stopniu, że żywność jest bezpieczna i odpowiedniej jakości oraz że pozostanie taka do końca okresu przydatności do spożycia pod warunkiem, że będzie odpowiednio przetwarzana. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1441/2007 z 5 grudnia 2007 roku w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych obejmuje zapis konieczności spełnienia kryteriów bezpieczeństwa żywności, które w odniesieniu do soków owocowych i warzywnych, niepasteryzowanych (gotowych do spożycia) zakłada jedynie nieobecność *E. coli* oraz pałeczek *Salmonella* w 25 g produktu. Pełniejsze informacje o stanie mikrobiologicznym produktu można uzyskać na podstawie badań obejmujących między innymi określenie liczby bakterii mezofilnych tlenowych oraz grzybów (Nabrdalik, Świsłowski 2017).

Cel

Celem pracy jest ocena jakości mikrobiologicznej niepasteryzowanych soków owocowych i warzywnych zakupionych w supermarketach na terenie Olsztyna.

Materiały i metody

Materiał do badań stanowiło 10 próbek jednodniowych soków owocowych i warzywnych dostępnych w handlu detalicznym. W Tab. 1 zaprezentowano zestawienie soków poddanych analizom.

Tab. 1. Zestawienie badanych soków.

Lp.	Nazwa soku
1.	Świeży sok marchwiowo-selerowy CYMES
2.	Świeży sok jabłkowy
3.	Świeży sok pomarańczowy
4.	Sok grejpfrut
5.	Sok burak-malina
6.	Sok świeży mix tropikalny, bezpośrednio tłoczony SOLEVITA
7.	Sok z marchwi i bananów SOLEVITA
8.	Sok marchwiowy
9.	Sok jabłkowo-marchewkowy
10.	Sok tłoczony z jabłek 55% i gruszek 45%

Źródło: Opracowanie własne

Ocenie poddano jakość mikrobiologiczną soków bezpośrednio po otwarciu, w warunkach stymulowanych zachowanie konsumenta (po przechowywaniu w temperaturze pokojowej po otwarciu soków) oraz po 24-godzinnym przechowywaniu soków po otwarciu w warunkach chłodniczych, z wykorzystaniem standardowych metod płytkowych. W badanych próbach oznaczano ogólną liczbę drobnoustrojów mezofilnych tlenowych, liczbę bakterii z rodzaju *Enterobacteriaceae*, liczbę *Enterococcus* sp., liczbę *Staphylococcus* sp. oraz liczbę grzybów (drożdży i pleśni). Rodzaj użytego podłoża, metody wykonanych posiewów jak również warunki inkubacji dla badanych grup drobnoustrojów przedstawiono w Tab. 2.

Tab. 2. Metody oznaczania wybranych grup drobnoustrojów.

Grupa drobnoustrojów	Rodzaj podłoża	Metoda posiewu	Warunki inkubacji
Ogólna liczba drobnoustrojów	Agar odżywczy	posiew wgłębnny	30°C/48h
Liczba bakterii z rodzaju <i>Enterobacteriaceae</i>	VRBL agar	posiew powierzchniowy	37°C/24h
Liczba <i>Enterococcus</i> sp.	Slanetz'a-Bartleya	posiew powierzchniowy	37°C/48h
Liczba <i>Staphylococcus</i> sp	Baird-Parkera	posiew powierzchniowy	37°C/48h
Liczba grzybów (drożdże i pleśnie)	YGC-agar	posiew wgłębnny	25°C/5dni

Źródło: Opracowanie własne

Analizę statystyczną wykonano z zastosowaniem programu STATISTICA wersja 13.3 StatSoft® testem jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA).

Wyniki badań

W Tab. 3 przedstawiono uzyskane wyniki ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych tlenowych w badanych sokach.

Tab. 3. Wyniki oznaczenia ogólnej liczby drobnoustrojów w badanych sokach w jtk/cm³.

Numer soku	Bezpośrednio po otwarciu	Po 6 h w temperaturze pokojowej	Po 24 h przechowywaniu w lodówce
1.	$3,4 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$	$3,3 \times 10^3$
2.	$1,9 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$
3.	$1,9 \times 10^4$	$2,0 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$
4.	$1,9 \times 10^3$	$2,3 \times 10^5$	$2,1 \times 10^3$
5.	$1,3 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5$
6.	$5,5 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$	$5,6 \times 10^5$
7.	$1,4 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
8.	$1,3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^5$
9.	$5,3 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4$	$5,3 \times 10^4$
10.	$3,9 \times 10^2$	$4,3 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$

Źródło: Opracowanie własne na podstawie uzyskanych wyników badań

Poddane analizom soki owocowe i warzywne charakteryzowały się ogólną liczbą bakterii mezofilnych tlenowych na poziomie $3,9 \times 10^2 - 5,5 \times 10^5$ jtk/cm³ bezpośrednio po zakupie, po 6-godzinnym przechowywaniu soków po otwarciu wartość ta mieściła się w zakresie $4,3 \times 10^2 - 5,6 \times 10^5$ jtk/cm³ natomiast po dobowym chłodniczym przechowywaniu liczba tych mikroorganizmów osiągała wartości $4,0 \times 10^2 - 5,6 \times 10^5$ jtk/cm³.

W Tab. 4 zestawiono wyniki liczby bakterii *Staphylococcus* sp. Po przechowywanie soków w warunkach stymulowanych zachowanie konsumenta (w temperaturze otoczenia) zaobserwowano niewielki wzrost liczby bakterii tego rodzaju. Analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic między warunkami przechowywania a liczbą *Staphylococcus* sp. Liczba tych bakterii zarówno bezpośrednio po otwarciu, po przechowywaniu w temperaturze otoczenia, jak również po przechowywaniu w warunkach chłodniczych mieściła się w zakresie $1,3 \times 10^2 - 2,8 \times 10^2$ jtk/cm³.

Tab. 4. Wyniki oznaczenia liczby *Staphylococcus* sp w badanych sokach w jtk/cm³

Numer soku	Bezpośrednio po otwarciu	Po 6 h w temperaturze pokojowej	Po 24 h przechowywaniu w lodówce
1.	$1,3 \times 10^2$	$1,4 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$
2.	$1,5 \times 10^2$	$1,9 \times 10^2$	$1,5 \times 10^2$
3.	$2,3 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	$2,6 \times 10^2$
4.	$1,8 \times 10^2$	$1,8 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
5.	$1,4 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$
6.	$2,0 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	$2,1 \times 10^2$
7.	$1,7 \times 10^2$	$1,7 \times 10^2$	$1,6 \times 10^2$
8.	$1,2 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$
9.	$1,4 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$
10.	$2,2 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$

Źródło: Opracowanie własne na podstawie uzyskanych wyników badań

W badanych sokach dokonano również analizy liczby bakterii z rodzaju *Enterobacteriaceae*. Uzyskane wyniki wykazały, że najbardziej zanieczyszczonym sokiem bakteriami z rodzaju *Enterobacteriaceae* był sok nr 9, w skład którego wchodziła marchew i jabłko: $4,7 \times 10^3$ – $4,9 \times 10^3$ jtk/cm³ (Tab. 5).

Tab. 5. Wyniki oznaczenia liczby z rodzaju *Enterobacteriaceae* w badanych sokach w jtk/cm³

Numer soku	Bezpośrednio po otwarciu	Po 6 h w temperaturze pokojowej	Po 24 h przechowywaniu w lodówce
1.	$1,4 \times 10^3$	$1,6 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$
2.	$4,6 \times 10^5$	$5,1 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$
3.	$3,1 \times 10^2$	$3,9 \times 10^2$	$3,1 \times 10^2$
4.	$2,4 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$
5.	$3,0 \times 10^3$	$3,9 \times 10^3$	$3,0 \times 10^3$
6.	$2,2 \times 10^4$	$3,1 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$
7.	$1,8 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$
8.	$1,3 \times 10^4$	$1,9 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
9.	$4,7 \times 10^3$	$4,9 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$
10.	$2,5 \times 10^4$	$3,2 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$

Źródło: Opracowanie własne na podstawie uzyskanych wyników badań

Na podstawie analizy liczby bakterii z rodzaju *Enterococcus* stwierdzono, że liczba drobnoustrojów zaliczana do tej grupy była niewielka w badanych

sokach niezależnie od warunków przechowywania i mieściła się w przedziale $1 \times 10 - 3,6 \times 10^1$ jtk/cm³ (Tab. 6).

Tab. 6. Wyniki oznaczenia liczby *Enterococcus* sp. w badanych sokach.

Numer soku	Bezpośrednio po otwarciu	Po 6 h w temperaturze pokojowej	Po 24 h przechowywaniu w lodówce
1.	$1,2 \times 10$	$1,4 \times 10$	$1,2 \times 10$
2.	$2,1 \times 10$	$2,5 \times 10$	$2,1 \times 10$
3.	1×10	$1,5 \times 10$	1×10
4.	3×10	$3,6 \times 10$	3×10
5.	$2,2 \times 10$	$2,7 \times 10$	$2,2 \times 10$
6.	$2,8 \times 10$	$2,9 \times 10$	$2,8 \times 10$
7.	5,0	$1,5 \times 10$	8,0
8.	5×10	$6,1 \times 10$	$5,1 \times 10$
9.	$4,1 \times 10$	$4,8 \times 10$	$4,0 \times 10$
10.	$1,5 \times 10$	$1,9 \times 10$	$1,3 \times 10$

Źródło: Opracowanie własne na podstawie uzyskanych wyników badań

W badanych sokach niezależnie od warunków przechowywania nie stwierdzono obecności drożdży i pleśni.

Dyskusja

Wzrastająca świadomość konsumentów wpłynęła na rozwój rynku sokowiczego w Polsce. Przyczyną zainteresowania konsumentów sokami „jednodniowymi” są między innymi wzrost świadomości żywieniowej, popularność zdrowego stylu życia oraz szeroka oferta sieci

handlowych (Trojanowicz 2015). Warto jednak zaznaczyć, że produkty te nie są poddawane obróbce termicznej, jak również nie posiadają konserwantów, w związku z czym mogą być łatwo psute przez wiele grup mikroorganizmów. Wiele z tych mikroorganizmów, szczególnie tolerujące kwasowe środowisko bakterie i grzyby, mogą wykorzystywać owoce jako środowisko wzrostu, powodując ich zepsucie, odbarwienie produktów oraz powodują zmiany smakowo-zapachowe (Mashat 2006). W związku z powyższym, zalecenia producentów odnośnie do spożycia i warunków przechowywania tych produktów są bardzo ważne.

Analizowane w niniejszej pracy soki stanowiły naturalnie mętne, niepasteryzowane i niesłodzone napoje, zawierające w składzie drobne cząsteczki miększu tworzące naturalny osad. Charakteryzowały się one zróżnicowanymi warto-

ściami oceny jakości mikrobiologicznej. Biorąc pod uwagę soki zawierające w swoim składzie marchew, wykazano, że ogólna liczba bakterii mezofilnych dla tych produktów była najwyższa rzędu 10^3 – 10^5 jtk/cm³. Dla porównania, Gientka i in. (2012), analizując wyłącznie jednodniowe soki marchewkowe, zanotowali znacznie wyższą, na poziomie 10^5 – 10^7 jtk/cm³, ilość mikroorganizmów mezofilnych w zależności od producenta, natomiast w sokach marchewkowo-selerowych autorzy stwierdzili obecność $3,7 \times 10^5$ – $2,0 \times 10^6$ jtk/cm³ bakterii mezofilnych i brak bakterii psychrofilnych.

Na podstawie analizy statystycznej liczby bakterii z rodzaju *Staphylococcus* sp. w różnych warunkach przechowywania nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pod względem wzrostu liczby tych bakterii. Badania nie wykazały obecności *Staphylococcus aureus* w poddanych analizom sokach. Brak obecności tego patogenu w sokach niepasteryzowanych stwierdzili również Nabrdalik i Świsłowski (2017). Natomiast Bello Olorunjuwon i in. (2014) wykazali, że w świeżych sokach dostępnych w Nigerii, 14% drobnoustrojów w nich występujących stanowił gatunek *Staphylococcus aureus*. Obecność *S. aureus* w produktach gotowych do spożycia jest niepokojąca, w związku z czym nie zaleca się podawania tych produktów dzieciom i osobom z obniżoną odpornością ze względu na możliwość wystąpienia zaburzeń jelitowych.

Obecność bakterii z rodzaju *Enterococcus* sp. w produktach owocowo-warzywnych wynika z ich powszechnego występowania w środowisku, między innymi w wodzie, glebie, jak również na powierzchni roślin czy owadów. W analizowanych produktach największą liczebnością tej grupy bakterii charakteryzował się sok marchwiowy (nr 9). Dużo wyższe wyniki w porównaniu z niniejszymi badaniami podczas próby przechowalniczej soków marchwiowych zaobserwowali Gientka i in. (2012). Obecność enterokoków w produktach gotowych do spożycia świadczy o nieskutecznym eliminowaniu tych drobnoustrojów podczas procesu produkcyjnego. W przypadku poddanych w analizie soków ich liczba była niewielka, mimo to wskazuje na potrzebę poprawy jakości procesów produkcyjnych i/lub doboru surowców lepszej jakości.

Na powierzchni warzyw znajdują się głównie mikroorganizmy z rodziny *Enterobacteriaceae* lub rodzaju *Pseudomonas* (Lund 1992), a także do bakterii z rodzaju *Bacillus* i *Clostridium* (Libudzisz i in. 2008). Większość tych bakterii nie stanowi zagrożenia dla zdrowia ludzi, jednak szczególnie w obrębie rodziny *Enterobacteriaceae* występuje wiele gatunków chorobotwórczych takich jak *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Escherichia* O157:H7 (Libudzisz i in. 2008).

Ocenę zmian jakości mikrobiologicznej badanych soków przeprowadzono również oznaczając liczbę grzybów (drożdży oraz pleśni). W żadnym z badanych soków nie wykryto obecności tej grupy. Warto zaznaczyć, że dane

literaturowe donoszą o zróżnicowanym poziomie zanieczyszczenia grzybami świeżych soków owocowych i warzywnych. Pyryt i Wilkowska (2012) w swoich badaniach nad jakością świeżych soków jabłkowych i cytrusowych, podobnie jak w niniejszej pracy nie wykazali obecności drożdży oraz pleśni. Natomiast badania Sokołowskiej i in. (2011) wykazały liczbę drożdży na poziomie 10^3 – 10^5 jtk/cm³ oraz pleśni na poziomie 10^2 – 10^4 jtk/cm³ w niepasteryzowanych sokach warzywnych. Mimo że w badanych sokach nie stwierdzono obecności pleśni na uwagę zasługuje to, że pleśnie z rodzaju *Penicillium* w określonych warunkach mogą tworzyć mykotoksyny. Dlatego też podczas procesu produkcji soków niepasteryzowanych szczególną uwagę należy zwrócić na jakość surowca, jego mycie oraz wstępną obróbkę.

Podsumowanie

Soki niepasteryzowane stanowią rezerwuar wielu grup drobnoustrojów, których rozwój może powodować psucie się produktów finalnych, jak również zatrucia pokarmowe konsumentów. Źródłem zanieczyszczenia pierwotnego soków, oprócz wadliwej jakości surowca, może być także brak higieny w czasie procesu produkcji. Przyjmuje się, że tylko soki poddane wysokiej obróbce termicznej (pasteryzowane) są bezpieczne do spożycia przez wszystkie grupy społeczne: dzieci, młodzież i osoby dorosłe. Wyniki oznaczenia liczby pleśni i drożdży pozwalają wnioskować, że badane soki niepasteryzowane są bezpieczne dla konsumentów. Mimo to analiza wykazała wzrost ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych w trakcie przechowywania soków w temperaturze pokojowej. Wynika z tego, że konsument powinien dostosować się do zaleceń producenta dotyczących przechowywania produktu i spożyć go bezpośrednio po otwarciu.

Literatura:

- Gientka I., Chlebowska-Śmigiel A., Sawikowska K. 2012. Zmiany jakości mikrobiologicznej soków marchwiowych podczas próby przechowalniczej. *Bromatologia. Chemia*, XLV(3): 397-401.
- Hall J. N., Moore S., Harper S. B., Lynch J. W. 2009. Global Variability in Fruit and Vegetable Consumption. *Am. J. Prevent. Med.*, 36(5).
- Kunicka A. 2004. Zagrożenia mikrobiologiczne w produkcji soków owocowych (Microbiological hazards in the production of fruit juices). *Przemysł Spożywczy*, 10: 42-45.

- Libudzisz Z., Kowal K. 2000. Mikrobiologia techniczna. Owoce i warzywa. Tom I, s. 300-306.
- Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. 2008. Mikrobiologia techniczna. Mikroorganizmy w biotechnologii, ochronie środowiska i produkcji żywności. Wydawnictwo Naukowe PWN, tom 2, s. 235-288.
- Mashat B. 2006. Microbiological Quality of Fresh (Unpasteurized) Fruit Juices in Makkah, Saudi Arabia, Chilled Food Association (CFA). Guidance on the Practical Implementation of the EC Regulation on Microbiological Criteria for Foodstuffs, 1: 1-52.
- Nabrdalik M., Świsłowski P. 2017. Ocena mikrobiologiczna niepasteryzowanych soków owocowych i warzywnych, 11(2): 541–551.
- Nowicka P., Wojdyło A., Oszmiański J. 2014. Zagrożenia powstające w żywności minimalnie przetworzonej i skuteczne metody ich eliminacji. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość., 21(93): 5-18.
- Płocharski W. 2016. Owoce, warzywa i soki w zaleceniach żywieniowych – kontrowersje dotyczące spożycia. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 7-8: 16-21.
- Pyryt B., Wilkowska D. 2012. Ocena jakości wybranych soków pomarańczowych. Bromatol. Chem. Toksykol., 45(3): 248-253.
- Rozporządzenie Komisji (WE) nr 1441/2007 z 5 grudnia 2007 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych (Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs). Dz.U. L 322, 7.12.2007.
- Sokołowska B., Chotkiewicz M., Niezgoda J., Dekowska A. 2011. Ocena zanieczyszczenia mikrobiologicznego świeżych, niepasteryzowanych, wyciskanych soków owocowych i warzywnych dostępnych w handlu. Zesz. Probl. Post. Nauk. Roln., 569: 219- 228.
- Sokołowska B., Skąpska S., Fonberg-Broczek M., Niezgoda J., Rutkowska M., Chotkiewicz M., Dekowska A., Dobros N., Rzoska S. J. 2012. Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na naturalną mikroflorę i barwę soków z warzyw korzeniowych. Post. Nauki i Techn. Przemysłu Rolno-Spożywczego, 67(4): 5-15.
- Trojanowicz P. 2015. Dynamiczny rozwój rynków soków NFC w Polsce. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 7-8: 59-65.
- Zadernowski R., Budrewicz G., Borowska E. J., Kaszubski W. 2003. Sok z marchwi naturalnie mętny – kryteria doboru surowca oraz optymalizacji procesu technologicznego. Przemysł Fermentacyjny i Owocowo-Warzywny, 47(05): 15-16.

ABSTRACT**MICROBIOLOGICAL QUALITY OF UNPASTEURIZED FRUIT AND VEGETABLE JUICES**

The aim of this study was to evaluate the microbiological quality of selected “day” fruit and vegetable juices. The material for the study was 10 fruit and vegetable juices purchased in shops in Olsztyn. The microbiological quality of juices was evaluated immediately after opening, under conditions stimulated by consumer behaviour (after storage at room temperature after opening) and after 24-hour storage of juices after opening under refrigerated conditions. The total number of aerobic mesophilic microorganisms, the number of Enterobacteriaceae, the number of Enterococcus sp., the number of Staphylococcus sp. and the number of fungi (yeasts and moulds) were determined in the samples tested.

As a result of the analyses carried out, it was shown that failure to maintain the storage temperature recommended by the manufacturers increased the total number of microorganisms in the tested products. The cooling storage of juices did not affect the growth of microflora in the tested products. No yeasts or moulds were found in the tested juices regardless of storage conditions.

Słowa kluczowe: sok niepasteryzowany, jakość mikrobiologiczna

Keywords: unpasteurized juice, microbiological quality

Dane do kontaktu z autorem:

Joanna Gajewska

E-mail: joanna.gajewska@uwm.edu.pl

Tel.: 512 247 406

Piotr Jakuc

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauki o Żywności

Studenckie Koło Naukowe Technologów Przetwórstwa Surowców
Roślinnych

Opiekun: dr hab. inż. Małgorzata Tańska, prof. UWM

SUBSTANCJE SŁODZĄCE W DOSTĘPNYCH NA POLSKIM RYNKU PRODUKTACH CUKIERNICZYCH DLA DIABETYKÓW

Wstęp

Cukrzyca jest jedną z chorób cywilizacyjnych współczesnych czasów. Głównie dotyka ludzi wieku średniego oraz osób starszych. Najczęściej występującym typem cukrzycy jest cukrzyca typu II i tym samym stanowi ona 95% wszystkich przypadków (Molenda i Barud 2004). Cukrzyca stanowi duże zagrożenie dla społeczeństwa, choruje na nią 2–10% populacji ludzkiej (Kuźmiuk i in. 2018). WHO przewiduje, że do 2025 roku liczba zachorowań na cukrzycę w krajach rozwiniętych wzrośnie o 43% (Zozulińska 2006). Według obecnej klasyfikacji ustanowionej przez WHO wyróżnia się, oprócz cukrzycy typu II, cukrzycę typu I, inne określone typy cukrzycy oraz cukrzycę ciężarnych (Kurnatowska i Bieniek 2004). Cukrzyca typu I najczęściej diagnozowana jest u dzieci oraz młodzieży. Jest ona wywoływana niedoborem insuliny spowodowanym zniszczeniem lub uszkodzeniem komórek beta wysp Langerhansa trzustki. Zachorowanie na cukrzycę typu I może mieć podłoże genetyczne, autoimmunologiczne, bakteryjno-wirusowe lub toksyczne. Jest schorzeniem metabolicznym przewlekłym oraz nieuleczalnym i niewątpliwie wpływa na funkcjonowanie całego organizmu, a nieleczona powoduje zmiany takie jak nefropatie, neuropatie, retinopatie, kardiopatie, zmiany skórne oraz inne zmiany, które często są nieodwracalne (Sieniawska i in. 2016; Jankowiak i in. 2007). Cukrzyca typu II jest chorobą uwarunkowaną genetycznie, jednak duży wpływ na rozwój tej choroby mają czynniki środowiskowe. Sprzyjające warunki środowiskowe wraz

z występującymi warunkami genetycznymi u osób posiadających odpowiednią grupę genów sprawiają, że dochodzi do zmniejszenia wydzielania insuliny lub do zwiększenia insulinooporności (Moszczyński 2003). Na rozwój cukrzycy typu II mają wpływ również takie czynniki jak: starzenie się, otyłość, ciąża oraz mniejsza aktywność fizyczna. Cukrzyca tego typu występuje 10-krotnie częściej u starszych osób niż u młodych ludzi. Starzenie się ma wpływ na ujawnienie cukrzycy u osób genetycznie uwarunkowanych do tej choroby. Otyłość jest kolejnym czynnikiem zewnętrznym zwiększającym zachorowalność na cukrzycę typu II. Już przy 15% nadmiarze masy ciała ryzyko wystąpienia cukrzycy tego typu zwiększa się dwukrotnie, a przy 25% nadmiarze masy ciała ryzyko zwiększone jest ośmiokrotnie. Otyłość najczęściej jest następstwem niewystarczającej aktywności fizycznej, co ma wpływ na zwiększenie ryzyka zachorowania na cukrzycę typu II. Oprócz powyższych czynników, na ryzyko cukrzycy typu II ma wpływ liczba przebytych ciąż. Przyczyną są zaburzenia przemian węglowodanów, które wywołane są wytworzeniem hormonów działających diabetogennie (Karnafel 2007).

Oprócz odpowiedniej aktywności fizycznej, ważną rolę u osób chorych na cukrzycę odgrywa odpowiednia i zbilansowana dieta, która stanowi integralną część właściwego leczenia terapeutycznego. Według Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego ważne jest, aby utrzymać prawidłowe, lub bliskie normy stężenia glukozy w surowicy krwi. Odpowiednia i zbilansowana dieta powinna zawierać wszystkie składniki pokarmowe, które niezbędne są do odpowiedniego funkcjonowania organizmu. Taka dieta bogata w składniki pokarmowe pozwoli osiągnąć optymalne stężenie lipidów i lipoprotein w surowicy krwi, utrzymanie odpowiedniej wartości ciśnienia tętniczego oraz powala zapobiec rozwojowi miażdżycy i nefropatii cukrzycowej (Sieradzki 2011). We właściwej diecie osób chorych na cukrzycę, która rozumiana jest najczęściej jako ograniczenie łatwo przyswajalnych węglowodanów, ważne jest również, aby taka dieta była jak najbardziej zbliżona do sposobu żywienia człowieka zdrowego (Scaglioni i in. 2004). Dieta podczas cukrzycy typu II nie tylko utrzymuje dobrą kontrolę metaboliczną choroby, ale także utrzymuje lub redukuje masę ciała osoby chorej (Kunkel-Stoyanow i Walczak 1999).

Na poziom glukozy we krwi wpływają różne parametry związane ze sposobem odżywiania, takie jak: ilość, typ i właściwości spożywanego pokarmu. Zauważono, że niektóre powszechnie dostępne produkty zawierające ten sam typ i ilość węglowodanów różnie wpływają na poziom glukozy we krwi (odpowiedź glikemiczną). Różne odpowiedzi glikemiczne na pokarmy zawierające tę samą ilość węglowodanów zależą przede wszystkim od poziomu wchłaniania w jelicie cienkim. Głównym czynnikiem wpływającym na wchłanianie jest typ

węglowodanów. Inne czynniki, które mają wpływ na wchłanianie to gotowanie i obróbka żywności. Dieta powinna być ustalona indywidualnie w zależności od płci, wieku, wzrostu, masy ciała, aktywności fizycznej, a także typu choroby, przebiegu choroby oraz rodzaju leczenia (Gorecka i Szczepaniak 2003). Chorzy z cukrzycą muszą uważnie wybierać żywność, zwracać uwagę na jakość spożywanych węglowodanów, które powinny stanowić około 50% zapotrzebowania energetycznego. Zaleca się „dobre” węglowodany, czyli takie, które posiadają niski indeks glikemiczny (Kłupa 2007).

Indeks glikemiczny (IG) pozwala ocenić w jaki sposób produkty zawierające węglowodany wpływają na stężenie glukozy we krwi po 2 godzinach od spożycia posiłku (Adamska i in. 2010). Im wyższa wartość indeksu glikemicznego danego produktu, tym wyższe stężenie glukozy we krwi po jego spożyciu w odniesieniu do zmian obserwowanych po ekwiwalentnej ilości glukozy (Brand-Miller i in. 2003). Produkty, które wywołują niewielki i powolny wzrost stężenia glukozy we krwi, zalicza się do produktów o niskim indeksie glikemicznym ($IG < 55$), natomiast te, po których następuje szybkie trawienie i wchłanianie, a następnie szybki wzrost stężenia glukozy, klasyfikuje się jako produkty o wysokim indeksie glikemicznym ($IG > 70$) (Jenkins i in. 1981). Przy wyborze produktów żywnościowych osoba zmagająca się z cukrzycą powinna zwracać uwagę także na ładunek glikemiczny, który określa ilość węglowodanów zawartych w porcji żywności. Ładunek glikemiczny oblicza się mnożąc wartość indeksu glikemicznego przez ilość przyswajalnych węglowodanów i dzieli wynik przez 100. Produkty spożywane przez osobę chorą na cukrzycę nie powinny przekraczać ładunku glikemicznego 10. Parametry te mają ogromny wpływ na insulinemię poposiłkową oraz odpowiedź glikemiczną i stanowią podstawę w doborze odpowiednich produktów węglowodanowych (Adamska i in. 2010).

Cukier dodany do produktów spożywczych przyczynia się do rozwoju otyłości i cukrzycy. Ponadto zmniejsza on jakość zdrowotną diety, co wpływa niekorzystnie na stan zdrowia (Palou i in. 2009). Cukrem dodanym może być cukier biały, cukier brązowy, syrop kukurydziany, syrop fruktozowy, syrop klonowy, melasy, dekstrozy krystaliczne, miód itd. (Van Horn i in. 2010). Na rynku pojawia się coraz więcej substancji słodzących, które nie powodują wzrostu poziomu cukru we krwi człowieka. Dostępnych jest tym samym coraz więcej produktów cukierniczych, które nie zawierają w swoim składzie sacharozy. Zastosowanie alternatyw dla sacharozy pozwala na spożywanie produktów cukierniczych przez osoby, które unikają sacharozy oraz nadmiernych kalorii, na przykład ze względu na zmaganie się z cukrzycą. Wśród produktów dla diabetyków znalazły się takie produkty jak wafle, czekolady, batony, karmelki,

landrynki itd. (Czerwińska 2000). Do alternatyw sacharozy, oprócz naturalnych substancji słodzących, można zaliczyć sztuczne słodziki, takie jak acesulfam K czy aspartam. Ich wprowadzenie do produktu obniża wartość energetyczną i dodatkowo minimalizuje koszty produkcji. Dodatek takich sztucznych substancji wzbudza wiele kontrowersji (Lean 2004). Bezpieczniejsze okazują się słodziki naturalne, które stosowane są w umiarkowanych ilościach (Bugaj i in. 2013). Osoby chorujące na cukrzycę lub będące na diecie redukcyjnej są potencjalnymi nabywcami substancji słodzących, które ze względu na ekspansję nadwagi i otyłości stają się obecne w coraz większej liczbie produktów spożywczych. Prowadząc proces odchudzania pacjentów, należy zadać sobie pytanie, czy dla pacjenta dobrym rozwiązaniem będzie zalecanie zamienników cukru w celu zaspokojenia smaku słodkiego zgodnie z popularnym hasłem reklamowym „maksimum smaku, zero cukru” (Myszkowska-Ryciak i in. 2010). Na terenie Unii Europejskiej (UE), Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności i Zespołu ds. Dodatków do Żywności i Składników Pokarmowych dopuścił do stosowania 11 niskokalorycznych substancji słodzących: acesulfam K (E950), aspartam (E951), sól aspartam-acesulfam (E962), cyklamian (E952), neohesperydyna DC (E959), sacharyna (E954), sukraloza (E955), taumatyna (E957), neotam (E961), erytrol (E968), glikozydy stewiolowe (E960) (Olszanecka-Glinianowicz i Czupryniak 2013). Zgodnie z Rozporządzeniem UE nr 1333/2008 w sprawie dodatków do żywności konieczne jest umieszczanie informacji o występowaniu powyższych substancji (Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) NR 1129/2008 w sprawie dodatków do żywności z dnia 11 listopada grudnia 2011r.). Zostało ustalone dopuszczalne spożycie niskokalorycznych substancji słodzących, tak zwane ADI (Acceptable Daily Intake), czyli takiej ilości dodatku do żywności, którą można przyjmować przez całe życie bez negatywnych skutków dla zdrowia. Polskie Towarzystwo Badań nad Otyłością i Polskie Towarzystwo Diabetologiczne potwierdzają bezpieczeństwo stosowania niskokalorycznych substancji słodzących i rekomendują zastępowanie cukru słodzikami, zwłaszcza przez osoby z nadwagą, otyłością czy zaburzeniami gospodarki węglowodanowej (Olszanecka-Glinianowicz i Czupryniak 2013).

Cel pracy

Celem badań jest analiza dostępnych na rynku produktów cukierniczych przeznaczonych dla diabetyków pod względem kaloryczności i składu, w tym głównie zawartości i rodzaju cukrów.

Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły produkty cukiernicze przeznaczone dla diabetyków pochodzące ze sklepów internetowych ze zdrową żywnością. W pierwszym etapie przeanalizowano 275 produktów dla diabetyków, zwracając uwagę na rodzaj produktów, ich ilość na rynku oraz substancje słodzące w nich zawarte. Do dalszych badań wykorzystano 16 produktów cukierniczych takich jak: lizaki, ciasteczka czekoladowe, herbatniki orkiszowe, czekolada gorzka, czekolada biała, bezy, biszkopty w czekoladzie, cukierki, śliwki w czekoladzie, żelki, landrynki oraz krem czekoladowo-orzechowy. W tych produktach analizowano wartość energetyczną, zawartość węglowodanów i cukrów.

Wyniki badań i dyskusja

Analizując rynek produktów cukierniczych dla diabetyków stwierdzono, że spośród 275 produktów, największy udział stanowiły czekolady (32%). Duży udział stanowiły również batony (21%), ciastka (18%) i cukierki (15%). Pozostałe produkty, takie jak: żelki, lizaki, bezy i krem do smarowania występowały w mniejszej ilości (Tab. 1). W większości dostępnych produktów cukierniczych

Tab. 1. Ilość przeanalizowanych produktów cukierniczych z podziałem na rodzaj oraz użyte do ich wyprodukowania substancje słodzące.

Produkt cukierniczy	Ilość przeanalizowanych produktów	Substancja słodząca
Baton	57	Erytrytol, glikozydy stewiolowe, syrop kukurydziany
Czekolada	87	Maltitol, ksylitol, erytrytol, glikozydy stewiolowe
Cukierki (cukierki w polewie, landrynki, dropy itp.)	42	Maltitol, izomalt, sorbitol, maltodekstryna, ksylitol, erytrytol, karob
Krem do smarowania	4	Maltitol, glikozydy stewiolowe, tagatoza
Lizak	16	Izomalt, ksylitol, erytrytol, syrop kukurydziany, syrop klonowy
Żelki	15	Maltitol, taumatyna
Ciastka (wafle, ciastka kruszono, rurki, biszkopty, herbatniki itp.)	50	Maltitol, miód, cukier trzcinowy, sukraloza, syrop kukurydziany
Bezy	4	Ksylitol, izomalt

Źródło: Opracowanie własne

Tab. 2. Wybrane do analizy produkty cukiernicze wraz z ich gramaturą, użyte w nich substancje słodzące oraz wartość energetyczna oraz zawartość węglowodanów w 100 g produktu

Produkt cukierniczy	Substancja słodząca	Wartość energetyczna [kcal]/100 g	Węglowodany (w tym cukry) /100 g
Lizak smak wiśniowy bio 13 g	Syrop kukurydziany	364	90,1 (55,4)
Ciasteczka z 20% czekolady bez cukru 135 g	Maltitol	496	57 (2)
Herbatniki orkiszowe 2 gorzka czekolada bio 28 g	Cukier trzcinowy, miód, syrop kukurydziany	487	60 (32)
Czekolada bez cukru gorzka-mango 75 g	Maltitol	453	49 (2)
Lizak smak klonowy bio 13 g	Syrop kukurydziany, syrop klonowy	380	95 (72,7)
Czekolada biała bez cukru z jagodami goji 75 g	Maltitol	463	59 (10)
Bezy ksylitolki bez cukru 35 g	Ksylitol, izomalt	955,8	95,2 (0,1)
Biszkopty w belgijskiej czekoladzie bez cukru bezglutenowe 80 g	Maltitol	426	54 (0,2)
Cuksy z karobem 13 g	Ksylitol, karob	239	94,5 (2,6)
Czekolada gorzka 72% kakao bez dodatku cukru 75 g	Maltitol	557	26 (0,5)
Czekolada gorzka ze stewią bez cukru 100 g	Erytrytol, glikozyd stewiolowy	410	32,5 (0,5)
Śliwki w czekoladzie bez cukru 160 g	Erytrytol, glikozyd stewiolowy	806	52 (30)
Zdrowy lizak truskawkowy bez cukru 6 g	Ksylitol, glikozyd stewiolowy	233	95 (0,5)
Żelki o smaku cytryny i mandarynki bez dodatku cukru 90 g	Syrop maltitolowy, maltitol, glikozydy stewiolowe, taumatyna	183	86,33 (0,5)
Landrynki owocowe 0% cukru z ksylitolem 70 g	Ksylitol	211	93 (0)
Krem czekoladowo-orzechowy słodzony tagatozą bez glutenu 200 g	Tagatoza	565	50 (49)

Źródło: Opracowanie własne

jako substancje słodzące zastosowano erytrytol, maltitol, glikozydy stewiolowe i ksylitol. W wielu produktach występował także izomalt oraz syrop kukurydziany (inaczej glukozowo-fruktozowy). Słodkość w cukierkach nadawały dodatkowo takie substancje jak maltodekstryna (powszechnie stosowana jako zagęstnik), karob (stosowany jako zagęstnik, ale również substytut kakao) i sorbitol (dodatek utrzymujący wilgoć). W kremach do smarowania pieczywa występował monocukier tagatoza. Do posłodzenia niektórych produktów z rodzaju ciastek i lizaków producenci zastosowali również miód, cukier trzcinyowy i syrop klonowy. W niektórych ciastkach był obecny również sztuczny słodzik, sukraloza. Z kolei w żelkach za słodkość odpowiedzialne było tzw. słodkie białko, taumatyna.

Większość z wymienionych w Tab. 2 produktów cukierniczych posiada bezpieczne dla diabetyków substancje słodzące ze względu na ich niski indeks glikemiczny. Niski indeks glikemiczny posiadają glikozydy stewiolowe, taumatyna, erytrytol, izomalt, tagatoza, ksylitol, maltitol oraz karob. Średni indeks glikemiczny posiada miód oraz syrop klonowy. Wysoki indeks glikemiczny posiada syrop kukurydziany oraz cukier trzcinyowy (Tab. 3).

Pomimo tego, że wszystkie analizowane produkty cukiernicze są oznaczone jako produkty przeznaczone dla diabetyków, to niektóre z nich posiadają substancje, które mogą stanowić niebezpieczeństwo podniesienia glukozy we krwi u osoby chorej na cukrzycę. Do bezpiecznych dla diabetyków produktów

Tab. 3. Substancje słodzące występujące w analizowanych produktach cukierniczych i ich indeks glikemiczny.

Substancja słodząca	Indeks glikemiczny
Glikozydy stewiolowe	0
Taumatyna	0
Erytrytol	0
Izomalt	2
Tagatoza	7
Ksylitol	8
Maltitol	36
Karob	40
Miód	58
Syrop klonowy	65
Syrop kukurydziany	75
Cukier trzcinyowy	87

Źródło: Opracowanie własne

cukierniczych można zaliczyć: „Cuksy z karobem”, „Czekoladę gorzką 72% kakao bez dodatku cukru”, „Czekoladę gorzką ze stewią”, „Zdrowego lizaka truskawkowego bez cukru”, „Żelki o smaku cytrynowym i mandarynowym bez dodatku cukru”, „Landrynki owocowe 0% cukru z ksylitolem”, „Krem czekoladowo-orzechowy słodzony tagatozą bez glutenu”, „Ciasteczka z 20% czekolady bez cukru”, „Czekoladę bez cukru gorzką-mango”, „Czekoladę białą bez cukru z jagodami goji”, „Bezy ksylitolki bez cukru” oraz „Biszkopty w belgijskiej czekoladzie bez cukru”. Niebezpiecznie mogą podnieść glukozę we krwi u osoby chorej na cukrzycę produkty takie jak: „Lizak smak wiśniowy bio”, ze względu na obecność w swoim składzie syropu kukurydzianego, „Lizak smak klonowy bio”, ze względu na zawartość syropu kukurydzianego oraz dodatkowo syropu klonowego. Kolejnym produktem, którego nie powinny spożywać osoby z cukrzycą są „Herbatniki orkiszowe – gorzka czekolada bio”, ze względu na zawartość cukru trzcinowego, miodu oraz syropu kukurydzianego.

Wartości energetyczne oraz zawartości cukrów, na które również powinni zwracać uwagę diabetycy, można uznać w większości przypadków za bezpieczne, biorąc pod uwagę gramatury produktów. Wyjątek stanowią, wymienione wcześniej: „Lizak smak wiśniowy bio”, „Lizak smak klonowy bio”, „Herbatniki orkiszowe – gorzka czekolada bio” oraz „Krem czekoladowo-orzechowy słodzony tagatozą”, zawierające od 32 do 72,7 g cukrów w 100 g produktu. Znaczącą ilość cukrów zawierają również „Śliwki w czekoladzie bez cukru”, 30 g w 100 g produktu. Pomimo że producent nie dodał cukru, to warto pamiętać, że suszone owoce zawierają więcej cukrów niż owoce świeże.

Podsumowanie

Opisane w pracy produkty cukiernicze oraz zawarte w nich substancje słodzące, to tylko wybrane przykłady z grupy produktów przeznaczonych teoretycznie dla diabetyków. Słodziki są coraz częściej używane przez producentów w przemyśle spożywczym w produktach typu „light” lub w produktach dla diabetyków. Ze względu na to, że substancje słodzące posiadają poziom słodkości taki sam lub zbliżony do tradycyjnego cukru, sięganie po produkty cukiernicze staje się coraz częstsze, gdyż smak słodki jest smakiem najchętniej wybieranym. Takie przyzwyczajenie, a nawet uzależnienie może być powodem tego, że osoby chore na cukrzycę będą coraz rzadziej zwracać uwagę na zawartość cukru w produktach cukierniczych. Jak wykazano w powyższych badaniach, zakwalifikowanie produktu jako produktu dla diabetyków nie gwarantuje niskiego poziomu cukrów. Osoby chore na cukrzycę powinny zwracać szczególną uwagę zarówno na skład wybieranych produktów, jak i na zawartość cukrów w tych

produktach. Nie wszystkie analizowane produkty cukiernicze wskazywane jako produkty dla diabetyków są bezpieczne dla osób zmagających się z cukrzycą ze względu na obecność w ich składzie substancji słodzących posiadających wysoki indeks glikemiczny.

Literatura

- Adamska E., Bonalska B., Górską M., Hamerlińska A., Janeczko-Sosnowska E., Wrona D. 2010. Żywnienie chorych na cukrzycę. Poradnik dla członków Zespołu opieki diabetologicznej. [w:] Indeks i Ładunek Glikemiczny Diety w Leczeniu Cukrzycy. Biblioteka Diabetologii Na Co Dzień, Warszawa, 19-26.
- Brand-Miller J., Hayne S., Petocz P., Colagiuri S. 2003. Low-Glycemic Index Diets In The Management Of Diabetes. A Meta-Analysis Of Randomized Controlled Trials. *Diabet. Care*, 26: 226-2267.
- Bugaj B., Leszczyńska T., Pysz M., Kopec A., Pacholarz J., Pysz-Izdebska K. 2013. Charakterystyka i prozdrowotne właściwości Stevia Rebaudiana Bertoni. *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 3(88): 27-38.
- Czerwińska D. 2000 Żywność niskokaloryczna w walce z chorobami. *Top Agrar Polska*, 12: 74.
- Gorecka D., Szczepaniak, B. 2003. Postawy diabetyków wobec produktów bezcukrowych. *Przemysł Spożywczy*, 12(57): 41-43.
- Haldar S., Egli L., De Castro C. A., Tay S. L., Koh M. X. N., Darimont C., Mace K., Henry C. J. 2020. High or Low Glycemic Index (GI) Meals at Dinner Results in Greater Postprandial Glycemia Compared with Breakfast: A Randomized Controlled Trial. *BMJ Open Diabetes Research and Care*, 8(1): 1-10.
- Jankowiak B., Krystoń-Serafin M., Krajewska-Kułak E., Popławska E. 2007. Powi-
kłania cukrzycy jako choroby przewlekłej. *Nowiny Lekarskie*, 76(6): 482-484.
- Karnafel W. 2007. *Cukrzyca Typu 2*. Wydawnictwo Czelej, Lublin.
- Kłupa T. 2007. Dieta cukrzycowa jako element profilaktyki sercowo-naczyniowej. *Polskie Forum Profilaktyki Chorób Układu Krążenia (Pfp)*. 1, 6, 7.
- Kunkel-Stoyanow M., Walczak A. 1999. Żywnienie w cukrzycy. *Nowa Klinika*, 6(7): 708-711.
- Kurnatowska A., Bieniek E. 2004. Zmiany w jamie ustnej u chorych na cukrzycę insulinozależną. *Dent. Med. Probl.*, 41(1): 113-118.
- Kuźmiuk A., Marczuk-Kolada G., Łuczaj-Cepowicz E., Obidzińska M., Chorzewska E., Wasilczuk U., Kierkło A., Szajda S. D. 2018. Znaczenie opieki stomatologicznej w utrzymaniu zdrowia jamy ustnej u dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1. *Medycyna Pracy*, 69(1): 37-44.

- Lean M. 2004. Aspartame And Its Effects On Health. *B. M. J.*, 329(7469): 755-756.
- Molenda E., Barud W. 2004. Dobór rodzaju i intensywności wysiłku fizycznego dla osób z cukrzycą typu 2. *Medycyna Sportowa*, 20(1): 43-47.
- Moszczyński P. 2003. Cukrzyca – przyczyny, podział, objawy. *Lider*, 4: 19-22.
- Myszkowska-Ryciak J., Harton A., Gajewska D., Bawa S. 2010. Środki słodzące w profilaktyce i leczeniu otyłości. *Kosmos – Problemy Nauk Biologicznych*, 59: 365-374.
- Olszanecka-Glinianowicz M., Czupryniak L. 2013. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Badań Nad Otyłością i Polskiego Towarzystwa Diabetologicznego w sprawie stosowania niskokalorycznych substancji słodzących. *Praktyka Lekarska*, 83: 5-7.
- Palou A., Bonet M. L., Picó C. 2009. On The Role And Fate Of Sugars In Human Nutrition And Health. *Introduction. Obesity Rev.*, 10(1): 1-8.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (We) Nr 1129/2008 W Sprawie Dodatków Do Żywności Z Dnia 11 Listopada Grudnia 2011.
- Scaglioni S., Stival G., Giovannini M. 2004. Dietary Glycemic Load, Overall Glycemic Index, And Serum Insulin Concentrations Healthy Schoolchildren. *Am. J. Clin. Nutr.*, 79: 339.
- Sieniawska J., Rębowicz K., Osiak W., Beń-Skowronek I. 2016. Cukrzyca podwójna: współistnienie cukrzycy typu 1 i typu 2. *Endokrynologia Pediatria*, 15(3): 49-54.
- Sieradzki J. 2011. Zalecenia kliniczne dotyczące postępowania u chorych na cukrzyce. *Diabetologia Praktyczna*, 12(A): 8-9.
- Van Horn L., Johnson R. K., Flickinger B. D., Vafiadis D. K., Yin-Piazza S. 2010. Translation And Implementation Of Added Sugars Consumption Recommendations: A Conference Report From The American Heart Association. *Added Sugars Conference. Circulation*, 122: 2470-2490.
- Zozulińska D. 2006. Historia naturalna i leczenie cukrzycy typu 2. *Przewodnik Lekarza*, 3: 30-39.

ABSTRACT

SWEETENERS IN DIABETIC CONFECTIONERY PRODUCTS AVAILABLE ON THE POLISH MARKET

The aim of the study was to analyze nutritional values of selected diabetic confectionery products available in online stores. In addition, their potential impact on the health of people with diabetes was assessed. 275 confectionery products were used for the analysis, of which 16 were selected, which were described in the work. Not all sweeteners that are

used to make diabetic confectionery products are safe. Tagatose, xylitol, stevia, erythritol, maltitol, honey, thaumatin, carob, isomalt, corn syrup, maple syrup, cane sugar, sorbitol and sucralose are the most common sweeteners in these products. It has been noted that products classified as products for potential diabetics are not always safe for their health. Consumers should pay attention to the composition and the sweeteners used to prevent an increase in blood glucose.

Słowa kluczowe: produkty cukiernicze, diabetyzm, substancje słodzące

Keywords: confectionery products, diabetes, sugar substitute

Dane do kontaktu z autorem:

Piotr Jakuć

E-mail: piotrekjakuc@gmail.com

Bogumił Kochański, Kamil Kruszewski

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauki o Żywności

Studenckie Koło Naukowe Technologów Mleczarstwa

Opiekun: prof. Bogusław Staniewski

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI LAKTOZY W SERACH DOJRZEWAJĄCYCH Z INFORMACJĄ NA ETYKIECIE „BEZ LAKTOZY” I BEZ TAKIEJ INFORMACJI

Wstęp

Laktoza jest jednym z trzech głównych składników mleka ssaków i jednocześnie jedynym zawartym w mleku cukrem. Jest to dwucukier składający się z D-glukozy i D-galaktozy (Fidler i in. 2009). W przemyśle spożywczym laktoza jest wykorzystywana między innymi w produkcji preparatów dla niemowląt czy też jako składnik cukierków, sosów, mrożonych deserów i wielu innych rodzajów produktów. Koncentracja laktozy w mleku kobiecym jest najwyższa spośród ssaków i wynosi około 7,2 mg/100 ml, natomiast w mleku krowim wynosi ona średnio 4,7 mg/100 ml. Laktoza jest syntezowana wyłącznie przez komórki gruczołów ssaków w okresie laktacji. Synteza tego składnika rozpoczyna się w późnym okresie ciąży w obecności określonych hormonów oraz białka alfa-laktoalbuminy. W okresie niemowlęcym laktoza stanowi większość węglowodanów w diecie. Laktoza, podobnie jak inne węglowodany, poprawia wchłanianie wapnia w układzie trawiennym, a także zwiększa korzystną produkcję kwasu mlekowego w jelicie, hamując w ten sposób rozwój niepożądanych mikroorganizmów oraz poprawiając perystaltykę jelit. Rola tego składnika pokarmowego staje się mniej istotna w późniejszym okresie rozwoju, gdy dziecko spożywa coraz to mniej mleka i produktów mleczarskich. Mleko jest uniwersalnym pożywieniem dla nowo narodzonych ssaków, jednak niektóre ludzkie niemowlęta nie są w stanie go strawić, ze względu na brak wystarczających ilości laktazy (Kretchmer 1972; Yang, Silva 1995; Vandenplas 2015).

Laktaza to enzym, który przeprowadza rozkład laktozy spożytej wraz z mlekiem czy też produktami mleczarskimi. Jest to specyficzna β -galaktozydaza jelitowa działająca wyłącznie na laktozę, przede wszystkim w jelicie czczym. Laktaza rozkłada disacharyd laktozę na dwa monosacharydy składowe: glukozę i galaktozę. Część uwolnionej glukozy może być wykorzystywana w sposób bezpośredni w jelicie, natomiast reszta wraz galaktozą trafia do krwioobiegu i oba cukry są metabolizowane przez wątrobę. Według badaczy nie istnieją jakościowe biochemiczne czy te fizyczne różnice w laktazie wyizolowanej z jelit niemowlaków, osób dorosłych tolerujących laktozę oraz osób dorosłych z nietolerancją laktozy. Różnica wydaje się jedynie ilościowa – w jelicie osoby cierpiącej na nietolerancję laktozy znajduje się zbyt mała ilość laktazy. Enzymu tego brakuje dorosłym osobnikom wszystkich gatunków zwierząt, oprócz człowieka (Kretchmer 1972; Swagerty i in. 2002).

W populacjach, w których pije się mleko, osoby dorosłe mają wyższy poziom laktazy, co może być powiązane z naturalną selekcją. Do populacji, w których liczba osób tolerujących laktozę przewyższa liczbę osób z nietolerancją tego składnika należy większość grup etnicznych z północnej Europy oraz białej Ameryki. W ujęciu ogólnym, poziom laktazy spada od wartości maksymalnej przy urodzeniu do mniej niż 10% tej wartości przed odstawieniem od piersi. Spadek poziomu laktazy u ssaków występuje nawet wtedy, gdy okres odstawienia od piersi jest przedłużany. Niedobór laktazy, która jest niezbędna do trawienia laktozy występuje nawet u 15% osób pochodzenia północnoeuropejskiego, do 80% czarnoskórych i Latynosów oraz do 100% amerykańskich Indian i Azjatów (Swagerty i in. 2002).

Nietolerancja laktozy jest zaburzeniem trawienia wynikającym z niedoboru laktazy bądź też całkowitego jej niewytwarzania. U osób z nietolerancją laktozy cukier ten nie ulega strawieniu w jelicie cienkim. Część niestrawionej laktozy jest wchłaniana do krwi i ostatecznie wydalana wraz z moczem. Pozostała część niestrawionego dwucukru przechodzi natomiast do jelita grubego. W tym odcinku układu pokarmowego laktoza ulega fermentacji beztlenowej z jednoczesnym wytworzeniem znacznej ilości gazów. Prowadzi to do występowania dolegliwości takich jak: bóle brzucha, wzdęcia, nudności oraz biegunka (Dec 2011).

Możliwe jest wyróżnienie trzech podstawowych rodzajów nietolerancji: wrodzona (występująca rzadko, poważna choroba), pierwotna (występuje najczęściej i jest związana z hipolaktazją typu dorosłego, w tym stanie fizjologicznym predyspozycje są dziedziczne) oraz wtórna (jest odwracalna i ustaje wraz z regeneracją błony śluzowej jelita). Nietolerancję laktozy wykrywa się zarówno z wykorzystaniem metod bezpośrednich, jak i pośrednich. Metodą pośrednią jest pomiar aktywności laktazy w próbce z biopsji jelita czczego. Metody

pośrednie obejmują wodorowy test oddechowy, dietę eliminacyjną, badanie pH stolca oraz analizę molekularną polimorfizmu genu laktazy. Najpowszechniejszą metodą jest jednak wodorowy test oddechowy, za jego stosowaniem przemawia wysoka czułość i swoistość, a także łatwość przeprowadzenia (Fidler i in. 2009).

Wodorowy test oddechowy jest wykonywany po spożyciu od 25 do 50 g laktozy. Opiera się on na zasadzie, że obecność tego węglowodanu w okrężnicy wiąże się z płucnym wydalaniem wodoru i innych gazów. Wzrost stężenia wodoru w oddechu powyżej 20 ppm ponad wartość bazową po spożyciu laktozy wskazuje na hipolaktazję, czyli niedobór aktywności laktazy. Wodorowy test oddechowy daje wynik pozytywny u 90% pacjentów z wadliwym wchłanianiem laktozy. Fałszywe wyniki ujemne występują w przypadku braku flory bakteryjnej, stosowaniem antybiotyków doustnych lub lewatywy okrężnicy. Oprócz tego, czynniki takie jak: sen, ćwiczenia fizyczne, stosowanie aspiryny czy też palenie papierosów mogą zwiększać wydzielanie wodoru w oddechu, niemające związku ze spożyciem laktozy (Swagerty i in. 2002).

Na uwadze należy mieć to, że lekkie zaburzenia wchłaniania laktozy nie powodują konieczności całkowitej rezygnacji z produktów zawierających ten składnik. Produkty mleczne nie powinny być eliminowane z diety, ponieważ stanowią cenne źródło kluczowych składników odżywczych takich jak: wapń, fosfor, ryboflawina oraz witaminy A i D (Swagerty i in. 2002).

Badania przeprowadzone przez Hertzlera i Savaiano (1996) pokazują, że codzienne spożywanie laktozy powoduje adaptacje metaboliczne przez mikroflorę okrężnicy. To dostosowanie może potencjalnie załagodzić wzdęcia i biegunkę oraz pozwolić na to, aby osoby cierpiące na nietolerancję laktozy tolerowały ten składnik w dużych dawkach, przy jego regularnym spożywaniu. Mimo że większość terapii nietolerancji laktozy koncentruje się na poprawie trawienia laktozy w górnym odcinku przewodu pokarmowego, dostosowanie mikroflory okrężnicy może okazać się prostszym i tańszym rozwiązaniem dla osób, które chcą regularnie spożywać stosunkowo duże ilości laktozy (Hertzler, Savaiano 1996). W badaniach prowadzonych przez Jiang i in. (1996) wykazano poprawę trawienia laktozy u ludzi dzięki spożyciu niesfermentowanego mleka zawierającego *Bifidobacterium longum*. Bifidobakterie mają znaczny potencjał do stosowania w produktach zaprojektowanych w celu poprawy trawienia laktozy.

Wśród konsumentów produktów mleczarskich można zauważyć wciąż rosnący trend na spożywanie produktów niezawierających laktozy. Wydaje się, że produkty takie spożywają nie tylko osoby cierpiące na wtórną bądź pierwotną nietolerancję laktozy, ale często również osoby przypisujące różne, odczuwane dolegliwości (w tym ból brzucha, biegunkę i wzdęcia) temu składnikowi mleka na podstawie własnych obserwacji, ze względu na panujący trend. Badania

przeprowadzone w USA na grupie 30 osób deklarujących posiadanie silnej nietolerancji laktozy (deklarowały one występowanie objawów przy spożyciu mleka nawet w ilości stosowanej jako dodatek do kawy lub płatków śniadaniowych) wykazały, że 9 z nich nie miało żadnego problemu z tolerancją laktozy, a pozostałe 21 osób tolerowało 240 ml mleka zawierającego laktozę na dzień przy braku bądź minimalnych objawach nietolerancji (Suarez i in. 1995). Producenci wyrobów mleczarskich jako odpowiedź na zapotrzebowanie konsumentów wprowadzili na rynek szeroki asortyment produktów bez laktozy. Są one często promowane jako prozdrowotne i wpisujące się w trend „eko”.

Produkty bez laktozy mogą być otrzymywane poprzez enzymatyczny rozkład laktozy w mleku z wykorzystaniem β -galaktozydazy (w formie wolnej w roztworze bądź immobilizowanej) oraz ogrzewaniu mleka przy niskim pH (Gekas, Lopez-Leiva 1985). Na rynku dostępne są ponadto preparaty laktazy w formie tabletek bądź płynu, które można samodzielnie dodać do gotowego produktu mleczarskiego w celu hydrolizy zawartej w nim laktozy (Suarez i in. 1995).

Do produktów oznaczonych jako „bez laktozy” dostępnych obecnie na rynku należą między innymi: mleko, jogurty, maślanki, masło, twarogi, a także sery dojrzewające. Produkcja sera jest zasadniczo procesem odwodnienia, w którym tłuszcz i kazeina mleka są skoncentrowane 6- do 10-krotnie, w zależności od rodzaju produktu końcowego (Fox 1989). Do produkcji sera wykorzystuje się specjalnie dobrane kultury starterowe oraz podpuszczkę, co pozwala na przeprowadzenie koagulacji surowca. Podczas koagulacji mleko rozdzielane jest na dwie frakcje: skrzep i serwatkę. Do skrzepu przechodzi kazeina, tłuszcz oraz niewielka część laktozy, natomiast serwatka zawiera białka serwatkowe oraz większość laktozy (około 98%). Dojrzwianie sera jest bardzo złożonym procesem biochemicznym, który obejmuje przede wszystkim glikolizę, proteolizę oraz lipolizę. Zmiany te odpowiadają za charakterystyczny smak i teksturę każdej odmiany sera i są katalizowane między innymi przez bakterie kultury starterowej i wytwarzane przez nie enzymy, podpuszczkę resztkową oraz rodzime enzymy mleka. Skrzep tuż po produkcji może zawierać od 0,7% do 1,5% laktozy. W przypadku serów dojrzewających, wspomniana pozostałość laktozy w całości ulega fermentacji (głównie do kwasu mlekowego) podczas dojrzwiania w czasie co najwyżej kilku tygodni (Fox i in. 1996).

Cel

Celem niniejszej pracy jest oznaczenie i porównanie zawartości laktozy w serach dojrzewających z informacją na etykiecie „bez laktozy” i bez takiej informacji.

Materiały i metody

Analizowano sery typu holenderskiego oraz szwajcarskiego „z laktozą” i „bez laktozy”. Badano równolegle sery danego typu oznaczone informacją „bez laktozy” oraz bez takiej informacji pochodzące od tego samego producenta. Analizie poddano 6 serów, w tym 3 oznaczone informacją „bez laktozy” oraz 3 bez takiej informacji. Każdy ser badano dwukrotnie.

Przygotowanie próby

Naważano 5 g sera, dodawano 25 ml 0,05 M H_2SO_4 . Całość mieszano za pomocą wytrząsarki Vortex przez 30 s. Następnie inkubowano 50°C / 15 min., po inkubacji ponownie mieszano za pomocą wytrząsarki Vortex przez 15 s. Ze środkowej warstwy pobierano do ependorfów 1,5 ml – wirowano 13.000 obrotów/min. w temperaturze pokojowej przez 10 min. Całość przepuszczano przez filtr RC 0,2 μm , 25 mm, Filter blue i przenoszono do fiolek chromatograficznych.

Analiza chromatograficzna

Chromatograf cieczowy HPLC Agilent Technologies 1200 Series, kolumna chromatograficzna Agilent Technologies Hi-Plex H, numer części: PL1170-6830, wymiary kolumny – 7,7 x 300 mm, rozmiar cząstek – 8 μm , natężenie przepływu – 1 ml/min, tryb separacji – wymiana jonowa, detektor 385 ELSD – gaz azot o czystości 6.0, objętość wtrysku – 5 μl , temperatura kolumny: lewa – 50°C, prawa – 50°C, faza mobilna – woda HPLC odgazowana w myjce ultradźwiękowej. Kalibrację przeprowadzono w zakresie 0,02% do 0,1% laktozy (od 1 ng do 5 ng laktozy). Współczynnik korelacji wynosił 0,99773.

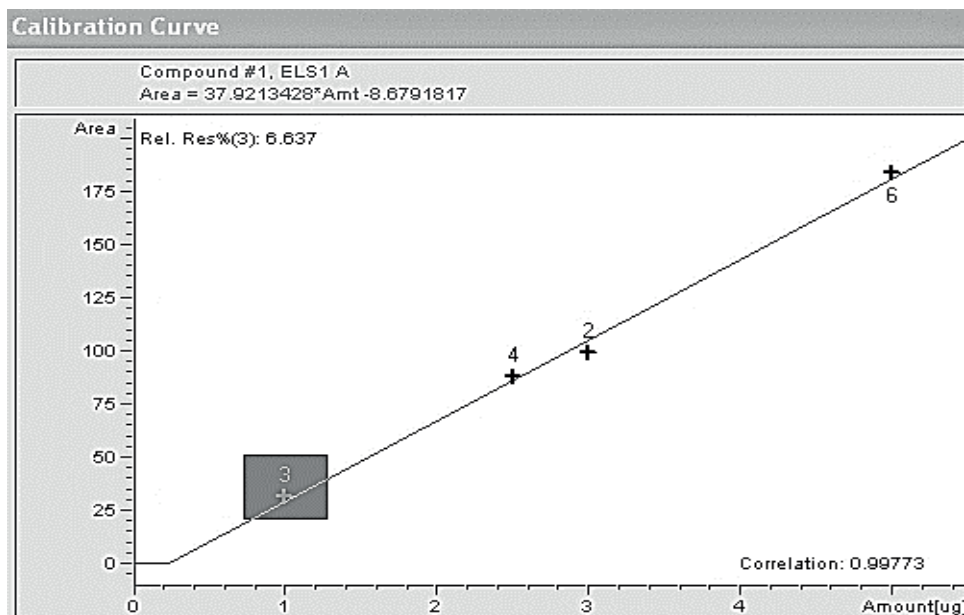
Wyniki badań

Tab. 1. Kalibracja chromatografu.

Czas retencji [min]	Numer próbki	Zawartość laktozy [ug]	Procentowa zawartość laktozy [%]
5,490	3	1,000	0,02
	4	2,500	0,05
	2	3,000	0,06
	6	5,000	0,1

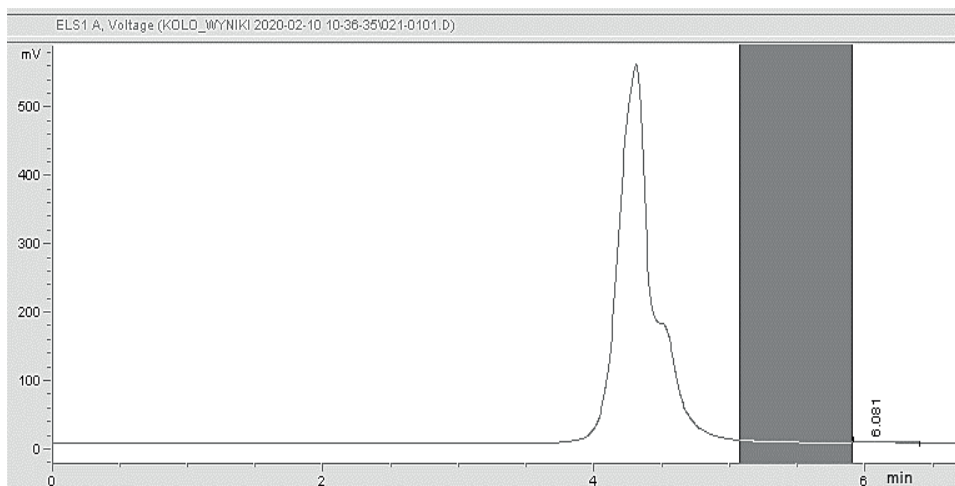
Źródło: Opracowanie własne

Rys. 1. Krzywa kalibracji chromatografu.



Źródło: Opracowanie własne

Rys. 2. Przykładowy chromatogram próbki wraz z czasem retencji laktozy.



Źródło: Opracowanie własne

Tab. 2. Wyniki badań oznaczenia laktozy.

Numer próbki	Nazwa handlowa sera	Oznaczona zawartość laktozy [%]
1	Ser Gouda bez laktozy	< 0,02
2	Ser Gouda	< 0,02
3	Ser Sokół bez laktozy	< 0,02
4	Ser Sokół	< 0,02
5	Ser Edam bez laktozy	< 0,02
6	Ser Edam	< 0,02

Źródło: Opracowanie własne

Dyskusja

Uzyskane wyniki badań wskazują, że laktoza w analizowanych serach dojrzewających była nieobecna. We wszystkich badanych serach jej poziom był poniżej progu wykrywalności (0,02%). Jest to efektem skomplikowanego procesu dojrzewania sera, podczas którego następują zmiany o charakterze biochemicznym i mikrobiologicznym. Zmiany te warunkują odpowiedni smak, teksturę oraz cechy reologiczne pożądane w danym typie sera. Do zmian biochemicznych zachodzących w początkowym etapie dojrzewania sera należy metabolizm pozostałej w nim laktozy. Ze względu na to, że ser jest fermentowanym produktem mleczarskim, kluczowym aspektem jego wytwarzania jest metabolizm laktozy do kwasu mlekowego przez wybrane kultury bakterii kwasu mlekowego (LAB) znane jako startery. Szybkość i stopień zakwaszenia wpływają na początkową teksturę skrzepu poprzez kontrolowanie szybkości jego demineralizacji. Początkowo, fermentację laktozy przeprowadzają bakterie kultur starterowych, jednak po zahamowaniu ich aktywności rolę tę przejmują nie-starterowe bakterie kwasu mlekowego (NSLAB), doprowadzając do całkowitego rozkładu tego składnika. W skrzepie tuż po produkcji sera pozostają niewielkie ilości laktozy (na przykład dla sera Cheddar jest to od 0,8 do 1%). Całkowita fermentacja wspomnianych pozostałości laktozy w serach jest niezmiernie istotna, ze względu na to, że zapobiega to rozwojowi niepożądanego mikroflory wtórnej (McSweeney 2004). Brak obecności laktozy w serach dojrzewających jest jednym z nieodzownych determinantów zachowania wysokiego poziomu jakości i bezpieczeństwa tego produktu. Sery dojrzewające mogą zatem być spożywane bez obaw zarówno przez osoby tolerujące laktozę, jak i jednostki z nietolerancją tego składnika pokarmowego.

Warto także nadmienić, że problem związany z nietolerancją laktozy w społeczeństwie jest często wyolbrzymiany, a sama laktoza traktowana jest bez-

podstawnie jako wysoce niepożądany składnik produktów żywnościowych. Wśród konsumentów zauważalna jest tendencja do amplifikacji negatywnego oddziaływania składników żywności, z którymi inni mają problemy, na przykład laktoza, tłuszcz. Badania przeprowadzone przez Suareza i in. (1995) wykazały, że powszechne wśród konsumentów jest zjawisko przypisywania dolegliwości układu pokarmowego działaniu laktozy przez osoby niemające rzeczywistego problemu z jej tolerancją. Badania te wskazały ponadto, że osoby przebadane pod kątem nietolerancji laktozy z wynikiem pozytywnym, niekoniecznie powinny obawiać się przyjęcia laktozy w ilości zawartej w szklance mleka w ciągu dnia. Zjawisko to wyjaśniać może to, że pozytywny wynik standardowego testu na tolerancję laktozy polegający na przyjęciu 50 g laktozy w roztworze wodnym (ilość laktozy zawarta w 1 litrze mleka) nie jest wiarygodnym predyktorem zdolności osoby do spożywania umiarkowanych ilości mleka i przetworów mlecznych bez objawów. Ilość laktozy przyjmowana zazwyczaj w jednym posiłku jest bowiem znacznie niższa (Scrimshaw i Murray 1988). Niewykluczone, że sama obecność mleka w diecie wystarcza do stymulacji aktywności laktazy u danej osoby, co może być spowodowane poprzez aktywację genów kodujących syntezę tego enzymu (Kretchmer 1972).

Źródłem niewłaściwej oceny laktozy jako składnika żywności przez konsumentów może być niska świadomość dotycząca walorów i właściwości mleka oraz produktów mleczarskich. Pomimo tego, rosnący trend na produkty bez laktozy jest chętnie wykorzystywany przez producentów wyrobów mleczarskich oferujących coraz to nowsze produkty oznaczone etykietą „bez laktozy”.

Podsumowanie

Badane sery dojrzewające nie zawierały laktozy ze względu na charakterystykę procesu produkcyjnego tych wyrobów. Wydzielanie przez producentów kategorii serów dojrzewających z informacją „bez laktozy” na etykiecie wydaje się więc nieuczciwym wobec konsumentów zabiegiem marketingowym. Celowo jest zatem podniesienie świadomości konsumentów dotyczącej zawartości laktozy w produktach mleczarskich. Istotna wydaje się również edukacja konsumentów na temat nietolerancji laktozy, jej przyczyn i objawów, w taki sposób, aby osoby niecierpiące na tę przypadłość nie obawiały się spożywania produktów mleczarskich. Działanie to może być realizowane poprzez odpowiednie kampanie informacyjne w mediach społecznościowych, telewizji czy też czasopismach popularno-naukowych.

Literatura

- Dec B. 2011. Technologia produkcji nisko- i bezlaktozowych produktów mleczarskich. *Przegląd Mleczarski*, 05: 8–14.
- Fidler E., Lisowska A., Walkowiak J. 2009. Nietolerancja laktozy – klasyfikacja i diagnostyka. *Pediatrics Polska*, 84(6): 562–566.
- Fox P. F. 1989. Proteolysis during Cheese Manufacture and Ripening. *J. Dairy Sci.*, 72(6): 1379-1400.
- Fox P. F., Wallace J.M., Morgan S., Lynch C. M., Niland E.J., Tobin J. 1996. Acceleration of Cheese Ripening. *Antonie van Leeuwenhoek*, 70: 271-297.
- Gekas V., Lopez-Leiva M. 1985. Hydrolysis of Lactose: A Literature Review. *Process Biochem.*, 20(1): 2-12.
- Hartzler S. R., Savaiano D. A. 1996. Colonic Adaptation to Daily Lactose Feeding in Lactose Maldigesters Reduces Lactose Intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 232-236.
- Jiang T., Mustapha A., Savaiano D. A. 1996. Improvement of Lactose Digestion in Humans by Ingestion of Unfermented Milk Containing Bifidobacterium Longum. *J. Dairy Sci.*, 79: 750-757.
- Kretchmer N. 1972. Lactose and Lactase. *Sci. Am.*, 227(4): 71-78.
- McSweeney P. L. H. 2004. Biochemistry of Cheese Ripening. *Int. J. Dairy Technol.*, 57(2–3): 127-144.
- Scrimshaw N. S., Murray E. B. 1988. The Acceptability of Milk and Milk Products in Populations with a High Prevalence of Lactose Intolerance. *Am. J. Clin. Nutr.*, 48(4): 1142-1159.
- Suarez F. L., Savaiano D. A., Levitt M. D. 1995. A Comparison of Symptoms after the Consumption of Milk or Lactose-hydrolyzed Milk by People with Self-reported Severe Lactose Intolerance. *New Eng. J. Med.*, 333: 1-4.
- Swagerty D., Walling A., Klein R. 2002. Lactose Intolerance. *Am. Fam. Physician*, 65(9): 1845-1851.
- Vandenplas Y. 2015. Lactose Intolerance. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.*, 24(1): S9-S13.
- Yang S. T., Silva E. M. 1995. Novel Products and New Technologies for Use of a Familiar Carbohydrate. *Milk Lactose. J. Dairy Sci.*, 78: 2541-2562.

ABSTRACT**DETERMINATION OF LACTOSE CONTENT IN RIPENING CHEESES WITH THE INFORMATION “LACTOSE FREE” ON THE LABEL AND WITHOUT THAT INFORMATION**

The aim of this study was to determine and compare the lactose content in ripening cheeses with the information “lactose free” on the label and without such information. Lactose content was determined with the use of high-performance liquid chromatography (HPLC). HPLC Agilent Technologies 1200 Series liquid chromatograph and PL Hi-Plex H, 300 x 7.7 mm Agilent Technologies chromatographic column were used in the research. Calibration was carried out in the range of 0.02% to 0,1% lactose (from 1 ng to 5 ng lactose). Six ripening cheeses were tested, including three cheeses with the “lactose free” label and three cheeses without such information.

Based on the conducted experimental studies, no differences were found in the content of lactose in cheese with the “lactose free” label and without such information. In all tested cheeses lactose content was below the detection limit (0.02%). Marking ripening cheeses with the information “lactose free” seems to be a marketing ploy used by producers.

Słowa kluczowe: zawartość laktozy, sery dojrzewające, chromatografia

Keywords: lactose content, ripening cheeses, chromatography

Dane do kontaktu z autorami:

Kamil Kruszewski

E-mail: kamil.kruszewski95@gmail.com

Tel.: 500 248 516

Bogumił Kochoński

E-mail: bogokochan5@wp.pl

Tel.: 783863289

Aleksandra Małachwiej, Urszula Zarzecka, Arkadiusz Zakrzewski
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Nauki o Żywności
Naukowe Koło Mikrobiologii
Opiekun: dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska

ANTYBIOTYKOOPORNOŚĆ BAKTERII Z RODZINY *ENTEROBACTERIACEAE* IZOLOWANYCH Z RYB I KREWETEK DOSTĘPNYCH W HANDLU DETALICZNYM

Wstęp

Drobnoustroje z rodziny *Enterobacteriaceae* należą do rzędu *Enterobacteriales* i klasy gammaproteobacteria (Brenner 2015). Są one liczną grupą Gram-ujemnych, względnie beztlenowych bakterii, mającą wiele wspólnych cech genetycznych, morfologicznych oraz fizjologicznych (Jarzab i in. 2011). Z uwagi na miejsce bytowania, nazywane są pałeczkami jelitowymi – zasiedlają bowiem przewód pokarmowy człowieka i zwierząt (Capita i in. 2019). Enterobakterie, w obrębie rodzajów, posiadają też wiele różnic, przede wszystkim biochemicznych i metabolicznych. Na drodze zanieczyszczenia fekaliami, bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae*, szeroko się rozprzestrzeniają i trafiają do większości środowisk. Są obecne w ściekach, glebie – gdzie trafiają na drodze nawożenia gnojowicą, skąd dalej przenoszą się na uprawy roślinne (Skowron i in. 2015). Jako że główny rezerwuuar stanowi przewód pokarmowy ludzi i zwierząt – narażona na kolonizację tymi bakteriami jest również żywność pochodzenia zwierzęcego (Guan i Holley 2003).

Z reguły jest to grupa drobnoustrojów niegroźnych dla zdrowia i życia ludzi, stanowiąca ich naturalną mikrobiotę. Część bakterii należących do omawianej rodziny jest oportunistyczna, a więc groźna dla ludzi z obniżonym poziomem odporności, w podeszłym wieku czy obarczonych innymi chorobami (Schmithausen i in. 2019). Do enterobakterii należą również mikroorganizmy patogene, odpowiedzialne przede wszystkim za zakażenia układu pokarmowego

i biegunki, takie jak *Salmonella* sp., *Yersinia* sp. czy *Shigella* sp. (Fernandez i in. 2018). Do zakażeń najczęściej dochodzi drogą pokarmową, przez spożycie zakażonej żywności lub wody, co najczęściej ma miejsce w krajach o niskim poziomie higieny (Kasperkiewicz i in. 2015). Bakterie należące do rodziny *Enterobacteriaceae* mogą być również przyczyną zakażeń układu moczowego (np. *Escherichia coli*), zapalenia płuc (np. *Klebsiella pneumoniae*), a w skrajnych przypadkach – śmiertelnie niebezpiecznej sepsy (Turnidge i in. 2014).

Dzięki Alexandrowi Flemingowi, od XX wieku, świat zaczął radzić sobie z zakażeniami bakteryjnymi za pomocą antybiotyków. Środki te mają działanie bakteriostatyczne i bakteriobójcze (Spizek i in. 2016). W chwili obecnej mamy wiele klas antybiotyków, o różnej strukturze chemicznej i rozmaitych mechanizmach działania, np. uszkodzających materiał genetyczny czy błony komórkowe drobnoustrojów. Niewątpliwie dobrodziejstwo, jakie płynie z możliwości stosowania antybiotyków, rozwinęło się również w złym kierunku. Zaczęto je stosować nie tylko w przypadku zwalczania aktywnego zakażenia, ale także prewencyjnie lub jako stymulatorów wzrostu zwierząt hodowlanych i roślin. Drobnoustroje, przez ciągły kontakt z substancjami przeciwbakteryjnymi, wykształciły szereg mechanizmów pozwalających im przeżyć w środowisku stresowym. Doprowadziło to do zjawiska zwanego antybiotykoopornością, czyli sytuacją, w której zastosowany antybiotyk, w określonej dawce, jest niekuteczny (Truszczyński i Pejsak 2010).

Antybiotykooporność została podzielona na dwa typy. Naturalna – która jest charakterystyczna gatunkowo – wynika najczęściej z chromosomalnie determinowanych cech, np. uniemożliwiających dotarcie substancji aktywnej do wnętrza komórki bakteryjnej. Przykładem oporności naturalnej jest brak wrażliwości *Escherichia coli* na penicylinę. Najczęściej jednak oporność naturalna nie jest zjawiskiem niebezpiecznym. Po pierwsze, dotyczy z reguły niższych stężeń danego środka przeciwdrobnoustrojowego (Blair i in. 2015). Po drugie, z uwagi na to, że jest to cecha stała i powszechna dla całego gatunku, po identyfikacji czynnika etiologicznego zakażenia, eliminuje się antybiotyki nieskuteczne z puli dostępnych leków. Innym rodzajem oporności, bardziej niebezpiecznym, jest oporność nabyta. Występuje ona tylko wśród części szczepów danego gatunku. Może nastąpić w wyniku nasilenia ekspresji genów chromosomalnych, warunkujących oporność naturalną. Wówczas, nawet wysokie stężenia terapeutycznych okazują się nieskuteczne. Oprócz tego, antybiotykooporność mogą determinować geny znajdujące się na ruchomych elementach genetycznych, takich jak plazmidy czy transpozony. Geny takie mogą być przekazywane pomiędzy różnymi szczepami, a nawet gatunkami drobnoustrojów na drodze horyzontalnego transferu (Godziszewska i in. 2016). Za środowisko o największej kumulacji genów oporności na antybiotyki uważa się ścieki. Ze względu na wysokie zagęszczenie

drobnoustrojami, zarówno patogennymi, jak i niechorobtwórczymi, rzeczywiście dochodzi tam do wspomnianych wyżej procesów wymiany elementów genetycznych (Chee-Sanfors i in. 2009). Ostatnie doniesienia wskazują również żywność jako wektor umożliwiający rozprzestrzenianie się antybiotykooporności. Przede wszystkim przez żywność pochodzenia zwierzęcego. Antybiotykoterapia prewencyjna i stosowana w celu regulacji wzrostu, doprowadziła do nabywania oporności przez bakterie niepatogenne, nieujęte w monitoringu higieny procesu i bezpieczeństwa żywności. Drobnoustroje takie, w momencie spożycia, mogą przekazywać geny oporności mikrobiocie człowieka (Binek i in. 2019).

Drobnoustroje wytworzyły kilka mechanizmów oporności, pozwalających im na przeżycie w obecności antybiotyku. Pierwszą strategią jest zmiana przepuszczalności błony komórkowej. Występuje u bakterii Gram (–) i polega na zminimalizowaniu licznych poryn, będących „kanałami”, przez które cząsteczki antybiotyku mogą przedostać się do wnętrza komórki bakteryjnej (Nikonorow i in. 2013). Innym modelem walki z antybiotykiem, jest wytworzenie pomp aktywnie usuwających substancje bójez lub toksyczne, tzw. *pomp efflux* (Wasańnik i in. 2009). Kolejnym, a zarazem najistotniejszym mechanizmem oporności, zwłaszcza wśród bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, jest wytwarzanie enzymów hydrolizujących antybiotyki. W ostatnim czasie największą uwagę zwraca się na beta-laktamazy, zwłaszcza typu ESBL (*Extended Spectrum Beta Lactamases*) i karbapenemazy. Są one odpowiedzialne za oporność drobnoustrojów na antybiotyki najnowszej generacji, o szerokim spektrum działania, powodujących realne zagrożenie wyczerpania możliwości terapeutycznych współczesnej medycyny (Zasowski i in. 2015).

Ze względu na szerzący się problem antybiotykooporności i to, że w najbliższym czasie może dojść do sytuacji braku skutecznej terapii w stosunku do groźnych dla zdrowia i życia ludzi patogenów, zarówno polskie, jak i światowe instytucje nawołują do racjonalnej polityki antybiotykowej. Naukowcy z całego świata zastanawiają się, w jaki sposób można ograniczyć procesy przekazywania genów oporności między drobnoustrojami. Inni z kolei pracują nad nowymi sposobami walki z bakteriami, np. za pomocą wymierzonych w nie wirusów, czyli bakteriofagów, oraz toksyn fagowych (Kościńska i Sitkiewicz 2017). Najważniejsza jednak wydaje się strategia „ochrony” antybiotyków, przez celowane leczenie i nienadużywanie oraz właściwe dawkowanie tych jakże ważnych we współczesnym świecie środków (Bengtsson i Greco 2014).

Cel

Celem pracy jest określenie oporności szczepów bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, wyizolowanych z surowych ryb i krewetek, dostępnych w handlu

detalicznym, na antybiotyki o największym znaczeniu klinicznym w stosunku do tej grupy mikroorganizmów.

Materiały i metody

Badaniom poddano 36 szczepów bakterii należących do rodziny *Enterobacteriaceae*, wyizolowanych ze świeżych ryb i krewetek, pochodzących z kolekcji szczepów Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie (Tab. 1).

Tab. 1. Źródła izolacji i gatunki badanych szczepów.

Źródło izolacji	Gatunek	Liczba szczepów
Krewetki	<i>Enterobacter cloacae</i>	1
	<i>Serratia fonticola</i>	4
Pstrąg	<i>Buttiauxella agrestis</i>	1
	<i>Hafnia alvei</i>	3
	<i>Lelliottia amnigena</i>	1
	<i>Pantoea agglomerans</i>	1
	<i>Serratia fonticola</i>	4
	<i>Serratia liquefaciens</i>	3
	<i>Serratia quinivorans</i>	1
Łosoś	<i>Hafnia alvei</i>	6
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	1
	<i>Serratia fonticola</i>	2
	<i>Serratia liquefaciens</i>	7
	<i>Serratia quinivorans</i>	1
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1

Źródło: Opracowanie własne

Przechowywane w Microbankach™ szczepy zostały rozmrożone w bulionie z glukozą. W jałowym płynie fizjologicznym sporządzono zawiesiny o gęstości 0,5 stopnia w skali McFarlanda. Z tak przygotowanego materiału, jałowymi wymazówkami, wykonano posiewy murawowe na podłoże Muellera-Hintona (Merck, Niemcy). Następnie nałożono krążki z odpowiednimi antybiotykami (Oxoid). Informacje o zastosowanych antybiotykach i ich stężeniach zamieszczono w Tab. 2. Płytki inkubowano 24 h w temperaturze 37°C, a następnie zmierzono średnice stref zahamowania wzrostu za pomocą suwmiarki. Na podstawie wytycznych Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2019) określono poziom oporności bakterii na zastosowane antybiotyki.

Tab. 2. Zastosowane antybiotyki.

Antybiotyk	Skrót	Dawka [μ g]
Ampicylina	AMP	10
Sulbaktam/Ampicylina	SAM	10/10
Cefepim	FEP	30
Ciprofloksacyna	CIP	5
Gentamycyna	CN	10
Tobramycyna	TOB	30
Tetracyklina	TE	30
Fosfomycyna	FOT	200
Nitrofurantoina	F	200
Aztreonam	ATM	30
Meropenem	MEM	10
Trimetoprim/Sulfametoksazol	SXT	1,25/23,75

Źródło: Opracowanie własne

Wyniki badań

Na podstawie pomiarów średnic zahamowania wzrostu bakterii stwierdzono, że ponad połowa szczepów – 55,56%, jest oporna na jeden analizowany antybiotyk. Oporność na co najmniej dwa zastosowane środki stwierdzono w przypadku 19,4% badanych szczepów. Oporność w stopniu średnim wykazało 22,2% analizowanych drobnoustrojów. Wrażliwy na wszystkie analizowane antybiotyki okazał się tylko jeden szczep – 2,8%. Stopień antybiotykooporności badanych izolatów przedstawiono na Rys. 1.

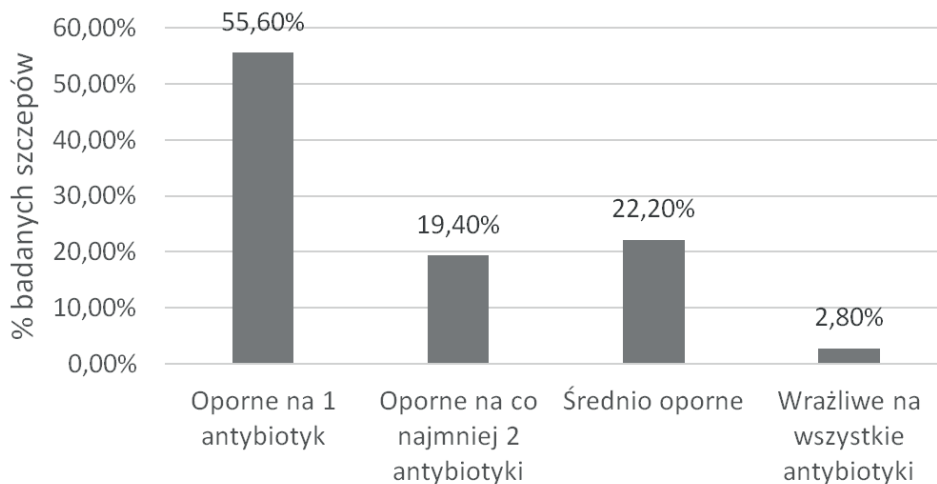
Tab. 3. Liczba szczepów opornych i średnio opornych na zastosowane antybiotyki.

Antybiotyk	Szczepy oporne		Szczepy średnio oporne	
	liczba	odsetek [%]	liczba	odsetek [%]
Ampicylina	25	69,44	4	11,11
Sulbaktam/Ampicylina	2	5,56	7	19,44
Aztreonam	4	11,11	5	13,89
Meropenem	3	8,33	11	30,56
Cefepim	2	5,56	9	25
Fosfomycyna	2	5,56	6	16,67
Ciprofloksacyna	0	0	2	5,56

Źródło: Opracowanie własne

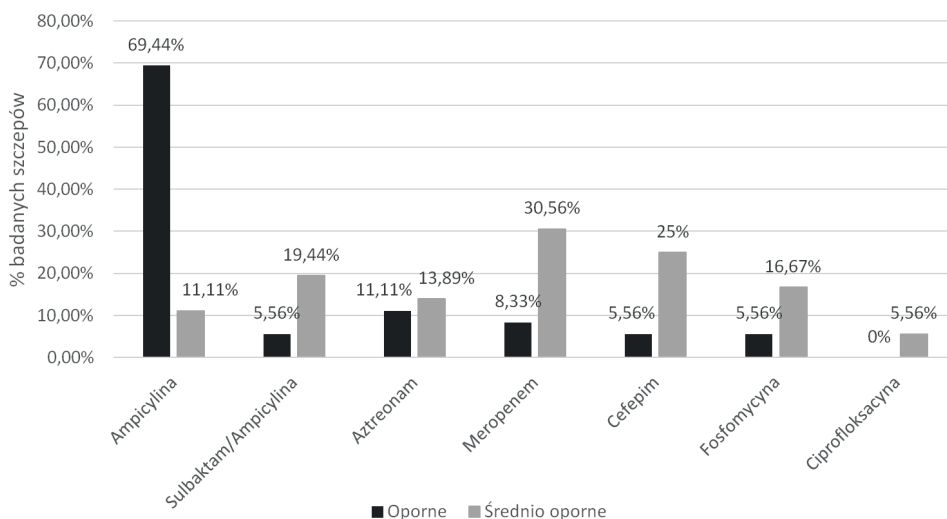
Najwięcej szczepów wykazało oporność na antybiotyki należące do grupy β -laktamów (ampicylina oraz ampicylina z sulbaktamem). Z kolei pełną wrażliwość stwierdzono w przypadku tobramycyny, tetracykliny, nitrofurantoiny oraz trimetoprimu z sulfametoksazolem. Szczegółowe wyniki zostały przedstawione w Tab. 3 oraz na Rys. 2.

Rys. 1. Podział szczepów ze względu na stopień antybiotykooporności.



Źródło: Opracowanie własne

Rys. 2. Procentowy rozkład oporności badanych szczepów.



Źródło: Opracowanie własne

Dyskusja

Z uwagi na problem szerzącej się lekooporności, w niniejszej pracy, wyizolowane z ryb i krewetek szczepy bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, zostały przeanalizowane pod kątem skuteczności antybiotyków najczęściej stosowanych dla tej grupy drobnoustrojów.

Stwierdzono, że ponad połowa badanych szczepów – 55,6% – była oporna na jeden antybiotyk, a 19,4% wykazuje wielolekooporność. W przypadku 22,2% analizowanych szczepów stwierdzono średni stopień oporności na przynajmniej jeden antybiotyk, a tylko 2,8% szczepów wykazał pełną wrażliwość w stosunku do zastosowanych terapeutyków. Analizowane szczepy wykazały największą oporność na ampicylinę (69,44% izolatów).

W badaniach Almeidy i wsp., wyizolowane z ryb i krewetek szczepy z rodziny *Enterobacteriaceae* również wykazały wysoki stopień oporności na ampicylinę – opisano to w przypadku 50,5% szczepów. Równie znaczący odsetek szczepów okazał się oporny na cefalotin (52,4%) i cefoksitin (48,5%). Do analiz wykorzystano również aztreonam, wobec którego niewrażliwych było 2,9% szczepów (Almeida i in. 2017).

Badania prowadzone przez zespół Al-Kharousi dotyczyły antybiotykooporności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* izolowanych ze świeżych owoców i warzyw. Tylko 10% szczepów okazało się wrażliwych na zastosowane antybiotyki. Najbardziej skuteczne okazały się aztreonam, cefotaksym i ceftazydim. Na przynajmniej jeden zastosowany antybiotyk, oporność wykazało 74% szczepów, z kolei jako wielolekooporne zakwalifikowano 16% izolatów. W cytowanych badaniach również największa oporność wystąpiła w stosunku do ampicyliny (66% badanych szczepów) (Al-Kharousi i in. 2019).

W pracy pod kierunkiem Łaniewskiej-Trokenheim opisano oporność na antybiotyki szczepów pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* pochodzących z warzyw. Po raz kolejny potwierdzono wysoką oporność w stosunku do ampicyliny – w tym wypadku dotyczyła 81,9% badanych szczepów. Mniejszy odsetek izolatów był oporny na neomycynę, streptomycynę, rifampicynę, chloramfenikol, koilistynę i nitrofurantoinę. Wyizolowane szczepy okazały się wrażliwe na gentamycynę, kanamycynę, kwas nalidyksowy i wankomycynę (Łaniewska-Trokenheim i in. 2006).

W badaniach Almeidy i wsp. zaobserwowano oporność na kolistynę u szczepów *Enterobacter cloacae* wyizolowanych z ryb (w przypadku 21,4% izolatów) i krewetek (u 66,7% szczepów) (Almeida i in. 2018).

Zespół kierowany przez Capita badał szczepy *Escherichia coli* wyizolowane z mięsa gołębi. Wszystkie szczepy okazały się być odporne na przynajmniej dwa antybiotyki. Jak w pozostałych badaniach – największa oporność została

wykazana w stosunku do ampicyliny (100% analizowanych szczepów). Wysoki odsetek antybiotykooporności drobnoustroje wykazały również w stosunku do ceftazydymu (94,59%), streptomycyny (83,78%) i tetracykliny (51,35%) (Capita i in. 2019).

Wiele badań zwracało uwagę na różnice w oporności na antybiotyki między produktami pochodzenia zwierzęcego a roślinnego. Mogą one m.in. z tego, że powszechnie stosowane są dodatki antybiotykowe w paszach dla zwierząt hodowlanych (Szewczyk i in. 2019). Z kolei drobnoustroje bytujące na roślinach, mogą nabywać oporności na drodze horyzontalnego transferu genów przez kontakt z mikrobiotą ściekową, docierającą do wód gruntowych (Wang i in. 2014). Wyżej cytowane badania, nie wskazują jednak na znaczne różnice, a powtarzają wzorzec wysokiej oporności na ampicylinę.

Podsumowanie

W toku prowadzonych badań stwierdzono, że zdecydowana większość analizowanych szczepów bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, wyizolowanych z ryb i krewetek dostępnych w handlu detalicznym, była oporna na przynajmniej jeden antybiotyk. Zarówno w Polsce, jak i na świecie, coraz popularniejsze jest spożywanie potraw z ryb i owoców morza w formie surowej, bez uprzedniej obróbki termicznej, np. w postaci sushi czy tataru. Stanowi to realne niebezpieczeństwo przekazywania genów oporności przez występujące w żywności, niepatogenne drobnoustroje, na szczepy chorobotwórcze, w stosunku do których możliwości leczenia mogą stawać się coraz bardziej ograniczone. Dlatego tak istotne jest ustanowienie przepisów regulujących stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych w działalności akwakultury. Niezbędny wydaje się również monitoring higieny żywności, nie tylko pod względem obecności patogenów, ale też mikroorganizmów lekoopornych.

Literatura

- Albuquerque de Almeida M. V., Mendes Cangussu I., Siqueira de Carvalho A. L., Linhares Ponte Brito I., Albuquerque Costa R. 2017. Drug Resistance, AmpC- β -lactamase and Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* Isolated from Fish and Shrimps. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 59: e70.
- Albuquerque de Almeida M. V., Linhares Ponte Brito I., Siqueira de Carvalho A. L., Albuquerque Costa R. 2018. In Vitro Resistance of *Enterobacter Cloaceae* Isolated from Fresh Seafood to Colistin. *Rev. Soc. bras. Med. Trop.*, 51: 674-675.

- Al-Kharousi Z. S., Guizani N., Al-sadi A. M., Al-Bulushi I. M. 2019. Antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae Isolated from Fresh Fruits and Vegetables and Characterization of Their AmpC β -lactamases. *J. Food Prot.*, 82: 1857-1863.
- Bengtsson B., Greco C. 2014. Antibiotic Resistance – Consequences for Animal hHealth, Welfare, and Food Production. *Ups. J. Med. Sci.*, 119: 96-102.
- Binek M., Kizerwetter-Świda M., Rzewuska M., Chrobak-Chmiel D., Sałama-szyńska-Guz A. 2019. Antibiotic Resistance of Bacteria a Growing Threat for Animals and Public Health. *Post. Mikrob.*, 58: 259-270.
- Blair J., Webber M., Baylay A., Ogbolu D., Piddock L. 2015. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 13: 42-51.
- Brenner D. J. 2015 *Bergey's Manual of Systematics of Archea and Bacteria: The Proteobacteria*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, ss. 1106.
- Chee-Sanfords J., Mackie R., Koike S., Krapac I., Lin Y., Yannarell A., Maxwell S., Aminov R. 2009. Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes Following Land Application of Manure Waste. *J. Environ. Qual.*, 38: 1086-1108.
- Capita R., Cordero J., Molina-Gonzalez D., Igrejas G., Poeta P., Alonso-Calleja C. 2019. Phylogenetic Diversity, Antimicrobial Susceptibility and Virulence Characteristics of *Escherichia coli* Isolates from Pigeon Meat. *Antibiotics*, 8: 259.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne PA, s. 32-41.
- Fernandez J., Guerra B., Rosario Rodicio M. 2018. Resistant to Carbapenems in Non-Typhoidal *Salmonella enterica* Serovars from Humans, Animals and Food. *Vet. Sci.*, 40: 1-13.
- Godziszewska J., Guzek D., Głąbski K., Wierzbicka A. 2016. Mobilna antybiotykooporność – o rozprzestrzenianiu się genów determinujących oporność bakterii poprzez produkty spożywcze. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 70: 803-810.
- Guan T., Holley R. 2003. Pathogen Survival in Swine Manure Environments and Transmission of Human Enteric Illness – A Review. *J. Environ. Qual.*, 32: 383-392.
- Jarząb A., Górska-Fraćzek S., Rybka J., Witkowska D. 2011. Zakażenia pałeczkami jelitowymi – diagnostyka, oporność na antybiotyki i profilaktyka. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 65: 55-72.
- Kasperkiewicz K., Noszczyńska M., Piszczek A. 2015. ECA – Wspólny antygen powierzchniowy pałeczek rodziny *Enterobacteriaceae*. *Post. Mikrobiol.*, 52: 165-174.
- Kozińska A., Sitkiewicz I. 2017. „Nowe” i „stare” antybiotyki – mechanizmy działania i strategie poszukiwania leków przeciwbakteryjnych. *Kosmos*, 66: 109-124.
- Łaniewska-Trokenheim Ł., Sobota M., Warmińska-Radyko I. 2006. Antibiotic Resistance of Bacteria of the Family *Enterobacteriaceae* Isolated from Vegetables – Short Report. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 56: 427-431.

- Nikonorow E., Baraniak A., Gniadkowski M. 2013. Oporność bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* na antybiotyki β -laktamowe wynikająca z wytwarzania β -laktamaz. *Post. Mikrobiol.*, 52: 261-271.
- Rzewuska M. 2009. Antybiotykooporność Gram-ujemnych pałeczek wytwarzających beta-laktamazy. *Życie Weterynaryjne*, 84: 199-205.
- Schmithausen R., Sib E., Exner M., Hack S., Rosing C., Ciorba P., Bierbaum G., Salvin M., Bloomfield S., Kaase M., Jacobshagen A., Gemein S., Gebel J., Engelhart S., Exner D. 2019. The washing Machine as a Reservoir for Transmission of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase (CTX-M-15)-producing *Klebsiella oxytoca* ST201 to Newborns. *Appl. Environ. Microbiol.*, 85: 1-11.
- Skowron K., Bauza-Kaszewska J., Kaczmarek., Budzyńska A., Gospodarek E. 2015. Mikrobiologiczne aspekty gospodarki gnojowicą. *Post. Mikrobiol.*, 54: 235-249.
- Spizek J., Sigler K., Rezanka T., Demain A. 2016. Biogenesis of Antibiotics-viewing its History and Glimpses of the Future. *Folia Microbiol.*, 61: 347-358.
- Szewczyk M., Czuba Z., Wiczkowski A., Hajdrowska B. 2019. Antybiotykooporność izolowanych z żywności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. *Med Weter.*, DOI: [dx.doi.org/10.21521/mw.6243](https://doi.org/10.21521/mw.6243).
- Truszczyński M. Pejsak Z. 2010. Antybiotykooporność bakterii zoonotycznych występujących u zwierząt i w żywności. *Życie Weterynaryjne*, 85: 891-894.
- Turnidge J., Gottlieb T., Mitchell D., Coombs G., Daly D., Bell J. 2014. *Enterobacteriaceae* Sepsis Outcome Programme Annual report, 2013. *Commun. Dis. Intell.*, 38: 327-333.
- Wang N., Yang X., Jiao S., Zhang J, Ye B., Gao S. 2014. Sulfonamide-Resistant Bacteria and Their Resistance Genes in Soils Fertilized with Manures from Jiangsu Province, Southeastern China. *PLoS One*, 9: e112626.
- Wasążnik A., Grinholc M., Bielawski K. 2009. Czynne usuwanie leku z komórki jako jeden z mechanizmów oporności bakterii na środki przeciwdrobnoustrojowe i metody jego zwalczania. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 63: 123-133.
- Zasowski E. J., Rybak J. M., Rybak M. J. 2015. The β -lactams Strike Back: Ceftazidime-Avibactam. *Pharmacotherapy*, 35: 755-770.

ABSTRACT**ANTIBIOTIC RESISTANCE OF BACTERIA FROM THE FAMILY
ENTEROBACTERIACEAE ISOLATED FROM FISH AND SHRIMPS
AVAILABLE ON THE RETAIL MARKET**

Bacteria belonging to the family *Enterobacteriaceae* inhabiting the digestive tract of animals and humans. The aim of the paper was to determine the resistance of bacterial strains from the family *Enterobacteriaceae*, isolated from raw fish and shrimps available on the retail market, for antibiotics.

The tests were conducted using the disk diffusion method in accordance with the CLSI guidelines. More than half of the analyzed strains showed resistance to one antibiotic and 19.4% of the strains showed resistance to at least two analyzed antibiotics. For 22.2% of strains, the average level of resistance was observed. Only 2.8% of the strains occurred to be sensitive to all antibiotics used.

This study confirmed the need to include food monitoring for antibiotic-resistant microorganisms, as they may affect its further spread, also among opportunistic or pathogenic bacteria.

Słowa kluczowe: antybiotykooporność, *Enterobacteriaceae*, ryby, owoce morza

Keywords: antibiotic resistance, *Enterobacteriaceae*, fish, seafood

Dane do kontaktu z autorem:

Aleksandra Małachwiej

olamalachwiej@wp.pl; tel. 502 183 876

Klaudia Martynow

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauki o Żywności

Studenckie Koło Naukowe Technologów Przetwórstwa Surowców
Roślinnych

Opiekun: dr hab. inż. Małgorzata Tańska, prof. UWM

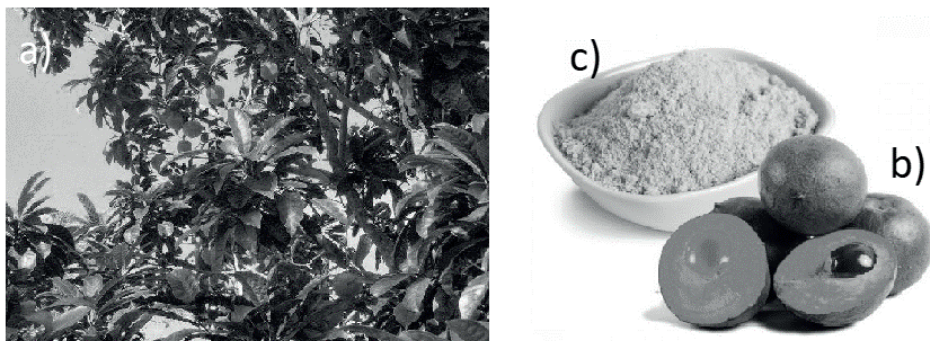
WŁAŚCIWOŚCI ZDROWOTNE LUCUMY I JEJ WPLYW NA CECHY FIZYKOCHEMICZNE CIASTEK

Wstęp

W ostatnim czasie zanotowano wzrost spożycia przekąsek w ciągu dnia. Zjawisko to powszechnie uważa się za jedną z przyczyn otyłości (de Graaf 2006). Producenci takich przekąsek starają się zastępować cukier substancjami, które dobrze smakują i posiadają niską wartość energetyczną lub jej nie posiadają (Koszowska i in. 2014). Jednym z takich zamienników cukru może być lucuma, która nadaje charakterystyczny słodki smak potrawom (Glorio i in. 2008). Lucuma zwana jest także owocem jajecznym, jest owocem drzewa pochodzącego z wyżyn zachodniego Peru, Chile oraz południowego Ekwadoru (Rys. 1a). Lucuma nie jest uprawiana poza regionem endemicznym, z wyjątkiem kilku plantacji w Kostaryce. Owoce lucumy (Rys. 1b) charakteryzują się jajowatym kształtem są żółte w okresie dojrzałości, z suchym żółtym miąższem (Raskin i in. 2011).

Owoce lucumy są spożywane głównie w Peru i Chile, choć znane są również w kilku innych krajach, głównie w postaci przetworzonej jako przekąski, dodatek do jogurtów czy produktów piekarniczych oraz jako dodatki do ciasteczek. W Peru i Chile lody o smaku „lucuma” są bardzo popularne, pokonując nawet tradycyjne smaki wanilii i czekolady. Jest to spowodowane wspaniałym słodkim smakiem i aromatem opisywanym jako „Karmelowy, klonopodobny z odrobiną dyniowego smaku” (Inga i in. 2019; Fuentealba i in. 2016; Yahia i Guttierrez-Orozco 2011). Owoce lucumy przetwarzane są najczęściej do postaci proszku

Rys. 1. Fotografia drzewa (a) oraz owocu lucuma świeżego (b) i sproszkowanego (c).



Źródło: https://organiccrops.net/img/news/170601/lucuma_tree.jpg, https://lh3.googleusercontent.com/proxy/EhAHS1MNLbErSk0aU77qKVwaOQJOn29DfIyT1hmYdlvITtynadccUOBnJorD-Lnhje8J8ID00ZL_6j_mzs7xITTSPcrTwtiGmYITW5MaOdzayH8U-6934EGBni1bwcNG3a3fdMw

(Rys. 1c), który jest wykorzystywany do przygotowywania lodów, słodczy, ciastek itp. Około 1% produkcji owoców lucumy jest przeznaczony na rynek międzynarodowy, które dystrybuowane są głównie jako proszek (Gamboa i in. 2014). Świeże owoce lucumy można przechowywać tylko do 14 dni po zbiorze, najlepiej w temperaturze 13–18°C, ponieważ niskie temperatury przechowywania (poniżej 7°C) wywierają niekorzystny wpływ na właściwości owoców

Tab. 1. Skład chemiczny lucumy na 100 g owocu.

Składnik	Zawartość
Woda	62%
Wartość energetyczna	143,8 kcal
Białko	2,3 g
Węglowodany	33,2 g
Tłuszcze	0,2 g
Błonnik	1,1 g
Wapń	16 mg
Fosfor	26 mg
Żelazo	0,4 mg
Tiamina	0,01 mg
Ryboflawina	0,14 mg
Niacyna	1,96 mg
Witamina C	5,4 mg

Źródło: Yahia i Guttierrez-Orozco (2011).

(Fuentealba i in. 2016). Dotychczas opublikowano niewiele badań na temat charakterystyki składników bioaktywnych obecnych w lucumie. Wyjątkiem są prace, w których przedstawiono zawartość składników odżywczych owoców (Raskin i in. 2011). W Tab. 1 przedstawiono wyniki badań Yahia i Guttierrez-Orozco (2011), z których wynika, że owoc lucumy charakteryzuje się niską zawartością wody w porównaniu z popularnymi owocami jak na przykład arbuz czy truskawki. Owoce te cechuje wysoka wartość odżywcza, jest on dobrym źródłem węglowodanów, witamin i składników mineralnych. Ponadto jest również źródłem białka, błonnika pokarmowego oraz minerałów: wapnia, fosforu i żelaza.

Cukry występujące w owocu lucumy to głównie glukoza, fruktoza, sacharoza i inozytol w następujących ilościach, odpowiednio 8,4; 4,7; 1,7 i 0,06 g na 100 g owocu (Yahia i Guttierrez-Orozco 2011).

Nasiona owocu lucumy są niejadalne, jednakże bogate w wielonienasycone kwasy tłuszczowe o właściwościach doceniony przez przemysł kosmetyczny ze względu na zdolność do regeneracji skóry (Fuentealba i in. 2016; Rojo i in. 2010).

Na podstawie danych zamieszczonych w Tab. 1 można stwierdzić, że owoc lucumy jest również dobrym źródłem niektórych witamin z grupy B jak tiamina, ryboflawina i niacyna, które są ważnym składnikiem w diecie człowieka. Jak wskazują badania Rosenberg i Miller (1992) niedobór witamin z grupy B przyczynia się między innymi do nadmiernej irytacji, a nawet mogą prowadzić do rozwoju zmian depresyjnych. Owoce lucumy jest również dobrym źródłem witaminy C, która jest jedną z najbardziej znanych oraz popularnych witamin. Witamina ta bierze udział w wielu bardzo ważnych przemianach oraz reakcjach, stymulując różne procesy biochemiczne w organizmie człowieka. Dzięki właściwościom przeciwutleniającym witamina C pełni rolę ochronną w chorobach naczyń krwionośnych oraz serca (Janda i in. 2015; Zhang i in. 2014).

Wyniki badań Ma (2004) potwierdzają, że zdolność przeciwutleniająca ekstraktów z owoców lucumy jest wysoka, co wynika z obecności katechiny i epikatechiny. Pinto i in. (2009) wykazali, że wodne ekstrakty z owocu lucumy mają znacznie wyższe stężenie związków fenolowych (11,4 mg/g suchej masy próbki) w porównaniu z innymi owocami peruwiańskimi, a ponadto działają hamująco na α -glukozydazę, opóźniając tym samym wchłanianie glukozy (Yahia i Guttierrez-Orozco 2011). Dzięki tej właściwości owoc lucumy może mieć ogromny potencjał farmaceutyczny, ponieważ jednym ze skutecznych sposobów leczenia cukrzycy jest zmniejszenie hiperglikemii poposiłkowej poprzez hamowanie α -glukozydazy, enzymu hydrolizującego węglowodany, a tym samym opóźnienie wchłaniania glukozy. W ostatnich latach poszukuje się

nowych i skutecznych inhibitorów α -glukozydazy (AGI) ze źródeł naturalnych jako alternatywy dla syntetycznego AGI ze względu na jego skutki uboczne, między innymi niepożądane reakcje ze strony przewodu pokarmowego jak: ból, biegunki, wzdęcia oraz inne zaburzenia jelitowe (Czapska-Pietrzak i in. 2019; Bukhari i in. 2017). Pinto i in. (2009) zwrócili uwagę również na to, że stopień dojrzałości owocu lucumy znacząco wpływa na zawartość różnych, pierwotnych i wtórnych metabolitów, a także na właściwości przeciwutleniające i przeciwhiperlikemiczne.

Cel pracy

Celem pracy jest ocena potencjalnych aspektów zdrowotnych owocu lucumy na podstawie danych literaturowych oraz zbadanie wpływ dodatku handlowego proszku z tego owocu na cechy organoleptyczne ciastek kruchych.

Materiały i metody

Materiał badań stanowiły kruche ciastka przygotowane w warunkach laboratoryjnych. Przygotowano dwa warianty ciastek kruchych z lucumą. Wariant A stanowiły ciastka, w których 5% i 10% mąki zastąpiono sproszkowanym owocem lucumy, natomiast w wariantcie B – proszkiem z lucumy zastąpiono 10, 20, 30, 50 oraz 100% cukru przewidzianego w recepturze. Dodatkowo przygotowano ciastka kruche bez dodatku lucumy, które stanowiły próbkę kontrolną. Surowcami wykorzystanymi do produkcji ciastek kruchych była mąka pszenna typ 450, żółtka jaj, masło, cukier puder oraz sproszkowana lucuma (BIO PLANET – seria SUPERFOODS). Wszystkie surowce zakupiono w lokalnych sklepach na terenie Olsztyna. Podstawowa receptura na ciastka kruche zawierała 120 g mąki pszennej, 80 g masła, 40 g cukru oraz 20 g żółtka jaj. Przygotowanie ciasta kruchego polegało na połączeniu wszystkich składników w jednolitą masę, a następnie ciasto rozwałkowano na grubość około 3 mm i wykrawano ciastka foremką w kształcie koła o średnicy 70 mm. Wypiek ciastek prowadzono w piekarniku elektrycznym, w temperaturze 180°C przez 8–10 min., w zależności od ilości dodanej lucumy (przy większej ilości lucumy czas wypieku skrócono). Po wypieku ciastka przechowywano w temperaturze pokojowej przez 24 h.

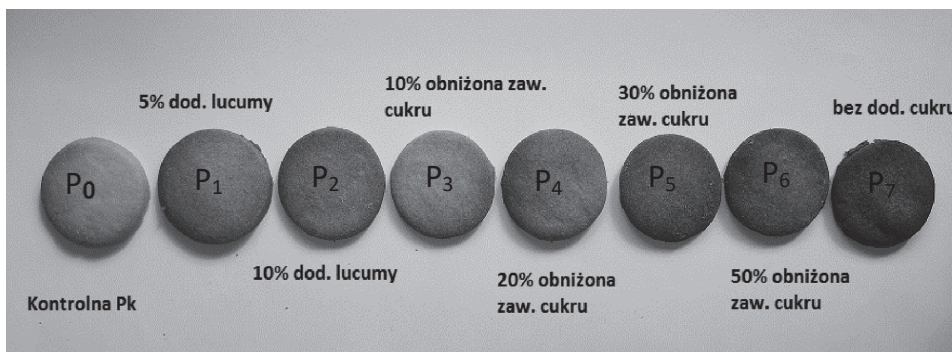
Ocenę organoleptyczną ciastek przeprowadził 18-osobowy zespół, składający się z losowo wybranych osób w wieku 23–56 lat, w tym 3 mężczyzn i 15 kobiet. Były to osoby, które deklarowały spożywanie wyrobów ciastkarskich co najmniej raz w tygodniu. Każda z osób indywidualnie oceniała próbki ciastek.

Wszystkie próbki były zakodowane, aby oceniający w trakcie badania nie mieli dostępu do wiedzy na temat zawartości lucumy w poszczególnych próbkach. Każdy z oceniających pomiędzy poszczególnymi próbkami przepłukiwał usta wodą, aby cechy poprzedniej próbki nie wpływały na wyniki oceny próbki kolejnej. Każdy z oceniających opisowo ocenił smak, zapach, barwę oraz kruchość otrzymanych wyrobów. Otrzymane oceny opisowe poddano wnikliwej analizie, na podstawie której opracowano tabelę, wskazując na najczęściej pojawiające się oceny smaku, zapachu, barwy i konsystencji. Na podstawie badań oceniono również, czy sproszkowana lucuma może być wykorzystywana jako zamiennik cukru czy tylko jako dodatek wzbogacający ciastka w składniki odżywcze i bioaktywne.

Wyniki badań i dyskusja

Na Rys. 2 przedstawiono wygląd ciastek kruchych przygotowanych do badań, natomiast wyniki oceny organoleptycznej zestawiono w Tab. 2.

Rys. 2. Ciastka z dodatkiem sproszkowanego owocu lucumy.



Źródło: Opracowanie własne

Na podstawie uzyskanych wyników badań stwierdzono, że już 5% dodatek lucumy nadaje ciastkom lekko karmelowy posmak, charakterystyczny dla owocu lucumy. Próbki z większym dodatkiem, 10% zostały ocenione jako zbyt słodkie, co oznacza, że zwiększając dodatek lucumy, warto zmniejszyć zawartość cukru w produkcji. W ciastkach, w których zawartość cukru obniżono o 10% (P_3) odnotowano lekko wyczuwalny dodatek lucumy, jednak próbka ta okazała się za mało słodka. W próbce P_4 (20% zamiana cukru lucumą) odnotowano zwiększenie wyczuwalności dodatku sproszkowanej lucumy, jednak smak nadal nie był

Tab. 2. Ocena organoleptyczna badanych ciastek.

CECHA	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃	P ₄	P ₅	P ₆	P ₇
SMIAK	Odpowiedni, maślany, bez obcych posmaków	Odpowiedni, maślany, bez obcych posmaków	Maślany, wyczuwalny karmelowy posmak, intensywnie słodki	Mało słodki, wyczuwalny dodatek lucumy	Wyczuwalny karmelowy posmak	Słodki, wyczuwalny karmelowy posmak	Bardzo słodki	Nieodpowiedni, niewystarczająco słodki
ZAPACH	Słodki, maślany, niewyczuwalny obcy zapach	Słodki, maślany, niewyczuwalny obcy zapach	Słodki, maślany, niewyczuwalny obcy zapach	Maślany, przyjemny	Słodki, karmelowy	Słodki, karmelowy	Słodki, karmelowy	Brak maślanego zapachu, nieodpowiedni
BARWA	Kremowa	Jasnobrązowa	Brązowa	Jasnobrązowa	Brązowa	Ciemnobrązowa	Ciemnobrązowa	Ciemnobrązowa,
KONSYSTENCJA	Krucha, jednolita	Krucha, jednolita	Krucha, jednolita	Krucha, jednolita	Bardzo krucha	Bardzo krucha	Sucha, zbyt krucha, nieodpowiednia	Sucha, zbyt krucha, nieodpowiednia

Źródło: Opracowanie własne

wystarczająco słodki. Zwiększenie dodatku lucumy w ciastkach i zmniejszenie zawartości cukru o 30% (P₅) zwiększyło słodycz i nadało ciastkom wyjątkowego karmelowo-dyniowego posmaku, charakterystycznego dla lucumy. Ciastka, w których zawartość cukru zmniejszono o 50% (P₆) oceniono jako bardzo słodkie. Natomiast smak ciastek, w których cukier całkowicie zastąpiono lucumą oceniono jako nieodpowiedni i niewystarczająco słodki.

W przypadku zapachu stwierdzono, że zastąpienie w ciastkach kruchych mąki lucumą w ilości 5% i 10% nie zmieniło ich zapachu. Okazał się on podobny do zapachu próbki kontrolnej, w której nie zastosowano dodatku lucumy. Dopiero 20% obniżenie cukru spowodowało, że charakterystyczny zapach lucumy był wyczuwalny. Natomiast ciastka, w których cukier zastąpiono lucumą w 100% zapach oceniono jako nieodpowiedni. Jednocześnie nie stwierdzono w tych ciastkach maślanego zapachu, charakterystycznego dla ciastek kruchych.

Oceniając barwę badanych ciastek zauważono, że im większy dodatek lucumy zastosowano, tym barwa ciastek była ciemniejsza. Zdjęcie przedstawione na Rys. 2 potwierdza, że już mały, 5%, dodatek sproszkowanej lucumy znacznie zmienił barwę ciastek. Zamiana 10% mąki sproszkowaną lucumą spowodowało zmianę barwy ciastek z kremowej (P_0) na brązową. Oznacza to, że sproszkowaną lucumę można wykorzystać w celu nadania ciemniejszej barwy produktom. W przypadku ciastek, w których 10% cukru zastąpiono dodatkiem lucumy zauważono mniej intensywne wybarwienie powierzchni niż w przypadku ciastek, w których 10% mąki zastąpiono lucumą. Można stwierdzić, że aby nadać ciastkom pożądaną barwę należy odpowiednio dobrać ilość cukru, mąki oraz lucumy. Ciastka z 30% obniżeniem ilości cukru (P_5) pod względem barwy skwalifikowano jako ciemnobrązowe, co może mieć różne odzwierciedlenie w ocenie konsumentów, zarówno pozytywne, jak i negatywne, w zależności od preferencji. Ciastka, w których zawartość cukru obniżono o 50% (P_6) oraz ciastka, w których cukier całkowicie zastąpiono lucumą (P_7) oceniono pod względem barwy jako ciemnobrązowe, co w ocenie konsumentów może oznaczać ciastka przypalone. Można zatem uznać, że taka barwa jest nieodpowiednia.

Analiza wyników wykazała, że różnice w konsystencji ciastek zauważalne są dopiero przy większym obniżeniu zawartości cukru w produkcji. Konsystencję ciastek P_1 , P_2 , P_3 oceniono jako kruchą oraz jednolitą, porównywalną z próbką kontrolną (P_0). Zamiana większej ilości cukru (50% i 100%) lucumą spowodowała wyraźne zwiększenie kruchości ciastek. Ciastka te oceniono jako suche oraz zbyt kruche.

Podsumowując badania można stwierdzić, że dodatek lucumy ma duży wpływ na cechy organoleptyczne ciastek, zwłaszcza na ich barwę i konsystencję. Podobne zależności odnotowali Quispe i Leydin (2017), którzy w swoich badaniach oceniali wpływ dodatku pulpy lucumy (10%, 20%, 30%) na cechy sensoryczne muffinek oraz ich ogólną akceptowalność. W badaniach tych wykazano znaczący wpływ dodatku lucumy na barwę oraz jędrność produktów. Warto podkreślić, że jedną z najważniejszych cech wyrobów z ciasta kruchego jest kruchość. Wyroby te nie mogą się rozsypywać oraz charakteryzować się wysoką twardością. Składnikiem ciasta kruchego, który w największym stopniu kształtuje kruchość jest tłuszcz. Składnik ten nadaje również plastyczność ciastu i odpowiednio łączy wszystkie składniki (King 2002). Przeprowadzone w niniejszej pracy badania wykazały, że większy dodatek sproszkowanej lucumy skutkuje pogorszeniem tekstury ciastek, stają się one bardzo kruche i suche. Dlatego w takim przypadku należałoby zmodyfikować tradycyjną recepturę. Aby poprawić teksturę ciastek prawdopodobnie należałoby zwiększyć zawartość tłuszczu w produkcji.

Na podstawie uzyskanych wyników, można również stwierdzić, że wykorzystanie sproszkowanej lucumy jako alternatywy dla cukru zwykłego jest możliwe, jednak należy odpowiednio skomponować recepturę. Za najlepsze spośród badanych ciastek uznano te, w których cukier zastąpiono lucumą w ilości 20% oraz 30%. Ciastka te odznaczały się odpowiednią słodkością oraz karmelowym posmakiem, charakterystycznym dla lucumy. Barwa tych ciastek była ciemniejsza niż w przypadku próbki kontrolnej, co oznacza, że lucuma to również idealny produkt mogący stanowić alternatywę dla polepszaczy barwy takich jak karmel, który najczęściej wykorzystywany jest w przemyśle spożywczym w celu nadawania brązowej barwy wyrobom piekarskim, napojom oraz serom czy jogurtom. Ponadto karmel jest szeroko wykorzystywany w przemyśle kosmetycznym oraz cukiernictwie (Mitka i Nowak 2005).

Biorąc pod uwagę to, że konsumenci są coraz bardziej świadomi znaczenia zdrowego odżywiania (Jones i Jew 2007), i z tego względu ograniczają dodatek cukru do posiłków oraz sięga po produkty o obniżonej zawartości cukru, warto poszukiwać naturalnych zamienników cukru. Jak powszechnie wiadomo cukier jest odpowiedzialny za wiele zaburzeń zdrowia, takich jak choroby serca, otyłość oraz cukrzyca. Zastosowanie lucumy jako zamiennika cukru w produktach może wprowadzać dodatkowe korzyści, takie jak wzbogacenie w składniki prozdrowotne. Według badań Guerrero-Castillo i in. (2019) oraz Jeszki i in. (2010) owoc lucumy jest dobrym źródłem związków fenolowych, które nie tylko biorą udział w kształtowaniu barwy produktów, ale także wykazują silne właściwości przeciwutleniające.

Podsumowanie

Lucuma wykazuje działanie hamujące α -glukozydazę, dzięki czemu może być składnikiem produktów ciastkarskich dedykowanym osobom z cukrzycą.

Owoc lucumy jest źródłem witaminy C, minerałów, β -karotenu, fenoli i nianyny.

Zastąpienie 5% oraz 10% mąki pszennej sproszkowaną lucumą poprawia barwę ciastek kruchych, nadając im złotobrazowy (karmelowy) odcień, dzięki czemu produkt może być bardziej pożądanym przez konsumentów.

Zastąpienie 30% cukru sproszkowaną lucumą zwiększa odczucie słodczy i nadaje ciastkom kruchym wyjątkowego karmelowo-dyniowego posmaku, charakterystycznego dla lucumy.

Zastosowanie większego udziału sproszkowanej lucumy w recepturze na ciastka kruche (zastąpienie > 30% masy cukru) wpływa niekorzystnie na cechy organoleptyczne ciastek.

Literatura

- Bukhari D. A. M., Siddiqui M. J., Shamsudin S. H., Rahman M. M., So'ad S. Z. M. 2017. A-glucosidase Inhibitory Activity of Selected Malaysian Plants. *J. Pharm. Bioal. Sci.*, 9(3): 164.
- Childs N. M. 1997. Functional Foods and the Food Industry: Consumer, Economic and Product Development Issues. *J. Diet. Suppl.*, 2: 73-82.
- Czapska-Pietrzak I., Studzińska-Sroka E., Bylka W. 2019. Ocena działania przeciwcukrzycowego ekstraktów otrzymanych z wybranych surowców roślinnych. *Post Fitoter.*, 20(3): 167-174.
- de Graaf C. 2006. Effects of Snacks on Energy Intake: An Evolutionary Perspective. *Appetite*, 47(1): 18-23.
- Fuentealba C., Gálvez L., Cobos A., Olaeta J. A., Defilippi B. G., Chirinos R., Pedreschi R. 2016. Characterization of Main Primary and Secondary Metabolites and In Vitro Antioxidant and Antihyperglycemic Properties in the Mesocarp of Three Biotypes of *Pouteria Lucuma*. *Food Chem.*, 190: 403-411.
- Gamboa D., Ibáñez D., Meléndez M., Paredes E., Siche R. 2014. Secado de *lúcuma* (*Pouteria obovata*) empleando la técnica de Ventana Refractante™. *Sci. Agropecu.*, 5(2): 103-108.
- Guerrero-Castillo P., Reyes S., Robles J., Simirgiotis M. J., Sepulveda B., Fernandez-Burgos R., Areche C. 2019. Biological Activity and Chemical Characterization of *Pouteria Lucuma* Seeds: A Possible Use of an Agricultural Waste. *Waste Manag.*, 88: 319-327.
- Inga M., García J. M., Aguilar-Galvez A., Campos D., Osorio C. 2019. Chemical Characterization of Odour-active Volatile Compounds During *Lucuma* (*Pouteria Lucuma*) Fruit Ripening. *Cyta-J Food*, 17(1): 494-500.
- Janda K., Kasprzak M., Wolska J. 2015. Witamina C – budowa, właściwości, funkcje i występowanie. *Pomeranian J. Life Sci.*, 61(4): 419-425.
- Jeszka M., Flaczyk E., Kobus-Cisowska J., Dziedzic K. 2010. Związki fenolowe – charakterystyka i znaczenie w technologii żywności. *Nauka Przyr. Technol.*, 4(2): 19.
- Jones P. J., Jew S. 2007. Functional Food Development: Concept to Reality. *Trends Food Sci Technol.*, 18: 387-390.
- King D. 2002. Bakery Fats Uncovered. *Food Ingrid. Anal. Internat*, 12, 16.
- Koszowska A., Dittfeld A., Nowak J., Brończyk-Puzoń A., Gwizdek K., Bucior J., Zubelewicz-Szkodzińska B. 2014. Cukier – czy warto go zastąpić substancjami słodzącymi. *Nowa Med.*, 1: 36-41.
- Ma J. 2004. Polyphenolic Antioxidants from Sapotaceae Fruits. Thesis, The City University of New York, New York, 98.

- Malinowska E., Wiśniewska M., Szymańska-Brałkowska M. 2014. Ocena sensoryczna jakości produktów żywnościowych. Zakład Zarządzania Jakością i Środowiskiem Wydział Zarządzania Uniwersytet Gdański, Sopot, 2-9.
- Mitka K., Nowak K., 2005. Karmel [E 150] – najstarszy barwnik spożywczy [2]. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2 (49): 32-34.
- Pinto M. D. S., Ranilla L. G., Apostolidis E., Lajolo F. M., Genovese M. I., Shetty K. 2009. Evaluation of Antihyperglycemia and Antihypertension Potential of Native Peruvian Fruits Using In Vitro Models. *J. Med. Food*, 12(2): 278-291.
- Quispe A., Leydin C. 2017. Efecto de la adición de pulpa de lucuma (*Pouteria obovata*) variedad seda sobre el color sensorial, color y firmeza instrumental y aceptabilidad general en muffins. Universidad Privada Antenor Orrego, Peru.
- Raskin I., Schmidt B., Villano C., Castillo L. E. R. 2011. Preparation and Use of *Pouteria Lucuma* Extract. U.S. Patent Application No. 13/129, 077.
- Rojo L. E., Villano C. M., Joseph G., Schmidt B., Shulaev V., Shuman J. L., Raskin I. 2010. Original Contribution: Wound-healing Properties of Nut Oil from *Pouteria Lucuma*. *J. Cosmet. Dermatol.*, 9(3): 185-195.
- Rosenberg I. H., Miller J. W. 1992. Nutritional Factors in Physical and Cognitive Functions of Elderly People. *Am J Clin Nutr.*, 55(6): 1237-1243.
- Silva Pinto M., Ranilla L., Apostolidis E., Lajolo F., Genovese M., Shetty K. 2009. Evaluation of Antihyperglycemia and Antihypertension Potential of Native Peruvian Fruits Using In Vitro Models, *J Med Food*, 12(2): 278-291.
- Yahia E. M., Guttierrez-Orozco F. 2011. *Lucuma (Pouteria Lucuma (Ruiz and Pav.) Kuntze)*. In *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits*. Woodhead Publishing, s. 443-450.
- Zhang P. Y., Xu X., Li X. C. 2014. Cardiovascular Diseases: Oxidative Damage and Antioxidant Protection. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.*, 18(20): 3091-3096.

ABSTRACT

LUCUMA'S HEALTH PROPERTIES AND ITS IMPACT ON THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF COOKIES

The aim of the study was to assess the health aspects of lucuma and to examine its effect on the organoleptic features of cookies. The research material was powdered lucuma, which is a natural, healthy sugar substitute, characterized by antioxidant properties and has an inhibitory effect on α -glucosidase, which means that it may have high pharmaceutical potential, because one of the effective ways to treat diabetes is to reduce postprandial hyperglycemia. Various additions of powdered lucuma in the range from 0% to 10% in

relation to flour and from 10% to 100% in relation to sugar were studied and its effect on the organoleptic characteristics of cakes was analyzed. Research has shown that lucuma is also an ideal product that can be an alternative to color enhancers such as caramel and sugar. Studies on the addition of lucuma to shortbread cookies have shown that a larger addition results in a deterioration of the texture of the cookies, they become more fragile and dry.

Słowa kluczowe: Lucuma, organoleptyczna, owoce, ciastka

Keywords: Pouteria lucuma, organoleptic evaluation, fruits, cookies

Dane do kontaktu z autorem:

Klaudia Martynow

kmartynow7.4@gmail.com

Honorata Mederska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauki o Żywności

Studenckie Koło Naukowe Towaroznawczej Oceny Sensorycznej

Opiekun: dr inż. Anna Gąterska

ANALIZA RYNKOWA PROBIOTYKÓW – SUPLEMENTY CZY LEKI

Wstęp

W ostatnich latach coraz powszechniejsze jest stosowanie suplementów wśród różnych grup wiekowych ludności. Według danych Głównego Inspektoratu Sanitarnego rokrocznie o kilka tysięcy wzrasta asortyment suplementów na polskim rynku. Wśród nich znaczącą grupę stanowią probiotyki. Bogaty rynek tej grupy produktów dostępnych bez recepty niejednokrotnie stwarza konsumentowi dylemat dotyczący wyboru.

Probiotyki według definicji WHO to żywe drobnoustroje, które podane w odpowiedniej ilości wywierają korzystny efekt zdrowotny, czyli poprawiają stan zdrowia lub ograniczają ryzyko zachorowania (Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food 2002; Hill i in. 2014). Bakterie probiotyczne naturalnie mogą występować w kiszonkach spożywczych, piwie, winie, produktach mlecznych (Majoka 2014). Probiotyki bywają też dodawane do produktów fermentowanych (np. jogurtów, kefirów). W aptece możemy dostać różnorodne preparaty probiotyczne w formie kapsułek, saszetek, ampulek lub kropli. W preparatach tych najczęściej występują bakterie wytwarzające kwas mlekowy z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* oraz drożdżaki *Saccharomyces boulardii* (Holzapfel i in. 2001).

Potocznie probiotykiem określa się szeroką grupę produktów dostępnych na rynku, które klasyfikuje się ze względu na status rejestracji na:

- leki (produkty lecznicze),
- suplementy diety,
- środki spożywcze specjalnego przeznaczenia medycznego.

Lek, termin ustawowy: produkt leczniczy to każda substancja, niezależnie od pochodzenia (naturalnego lub syntetycznego), nadająca się do bezpośredniego wprowadzania do organizmu w odpowiedniej postaci farmaceutycznej w celu osiągnięcia pożądanego efektu terapeutycznego, lub w celu zapobiegania chorobie, często podawana w ściśle określonej dawce. Lekiem jest substancja modyfikująca procesy fizjologiczne w taki sposób, że hamuje przyczyny lub objawy choroby albo zapobiega jej rozwojowi. Zakładane korzyści zdrowotne oraz wymagania jakościowe to dwie grupy czynników wyróżniających preparaty probiotyczne mające status leku spośród innych preparatów tego typu (Dz.U. poz. 2236, 2017). Leki powinny mieć potwierdzoną jakość, bezpieczeństwo i skuteczność leczenia, łagodzenia lub zwalczania choroby. Dla potwierdzenia skuteczności określonego probiotyku należy przeprowadzić badanie kliniczne na ludziach lub inne stosowne badania służące określeniu i potwierdzeniu efektywności szczepu/produktu (Dz.U. nr 75, poz. 492, 2007; Jach i in. 2013).

Suplement diety zgodnie z ustawą z 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (Dz.U. nr 171, poz. 1225, 2006 z późn. zm.) oraz Dyrektywą 2002/46/WE jest środkiem spożywczym, którego celem jest uzupełnienie normalnej diety, będącym skoncentrowanym źródłem witamin lub składników mineralnych, lub innych substancji, pojedynczych lub złożonych, wykazujących efekt odżywczy lub inny fizjologiczny.

Według raportu NIK (2017) wprowadzenie na rynek suplementu diety wymaga ze strony przedsiębiorcy jedynie prawidłowego złożenia powiadomienia do organu nadzoru, którym jest Główny Inspektor Sanitarny. Spełnienie tego warunku formalnego umożliwia sprzedaż zgłoszonego produktu. Obowiązujący system notyfikacji pozwala bowiem wprowadzić do obrotu suplement diety natychmiast po złożeniu powiadomienia. Procedura weryfikacji powiadomienia ani ewentualne wszczęcie postępowania wyjaśniającego nie wstrzymują jego dystrybucji. W czasie trwających postępowań niezweryfikowany produkt, a jak wykazano w toku kontroli NIK (2017), niejednokrotnie zawierający niedozwolone, szkodliwe dla zdrowia składniki – może znajdować się w sprzedaży. Stan taki stwarza zatem możliwość wystąpienia zagrożenia dla zdrowia konsumenta.

Środki spożywcze specjalnego przeznaczenia medycznego zgodnie z Rozporządzeniem UE (nr 609/2013) definiuje się jako „żywność specjalnie przetworzoną lub żywność o specjalnym składzie przeznaczoną do dietetycznego odżywiania pacjentów, w tym niemowląt, stosowaną pod nadzorem lekarza; jest przeznaczona do wyłącznego lub częściowego żywienia pacjentów z ograniczoną, upośledzoną lub zaburzoną zdolnością przyjmowania, trawienia, wchłaniania, metabolizowania lub wydalania zwykłej żywności lub niektórych

składników odżywczych zawartych w żywności lub jej metabolitach, lub pacjentów z innymi uzasadnionymi medycznie wymaganiami żywieniowymi, w przypadku których dietetyczne odżywianie nie może zostać osiągnięte jedynie przez zmianę normalnej diety”. W Polsce produkty uznane za środki spożywcze specjalnego przeznaczenia medycznego są pod kontrolą Państwowej Inspekcji Sanitarnej.

Występujące na rynku preparaty probiotyczne różnią się właściwościami funkcjonalnymi, co warunkowane jest składem, procesem wytwarzania, wymaganiami w zakresie rejestracji oraz kontroli jakości. Właściwości funkcjonalne probiotyków zależą od tego, czy zawierają one odpowiedni szczep (szczepy) bakterii bądź drożdżaków o skuteczności potwierdzonej badaniami, ze wskazaniem na konkretny rodzaj, gatunek i szczep (Szajewska 2015).

Wymagania prawne odnośnie do notyfikacji produktów mających status zarówno suplementu diety, jak i środka spożywczego specjalnego przeznaczenia medycznego obejmują jedynie deklarację składu podawanego przez producenta. Natomiast wytwarzanie produktów probiotycznych będących lekami musi odbywać się zgodnie z dobrą praktyką wytwarzania (GMP). Produkty te objęte są wymaganiami rejestracyjnymi potwierdzającymi jakość, skuteczność i bezpieczeństwo preparatu, co wymaga również badań klinicznych (Jach i in. 2013; Lutyńska i in. 2012). Największym problemem jakości leków probiotycznych jest zachowanie wysokich stężeń bakterii probiotycznych (żywołności) podczas przechowywania i pasażowania w żołądku. Stosowane nowe techniki przygotowywania probiotyków z wykorzystaniem mikrokapsulek lub mikrogranulek wpływają na polepszenie przeżywalności w przewodzie pokarmowym (Chen i in. 2012; Jach i in. 2013). Również stosowanie procesu liofilizacji w produkcji tego wpływa na lepszą jakość typu preparatów.

Według ekspertów jakość probiotyków zarejestrowanych jako lek / preparat farmaceutyczny generalnie jest lepsza niż jakość innych preparatów probiotycznych (Szajewska 2017).

Najwyższa Izba Kontroli w raporcie zwraca uwagę na problem oszukańczych praktyk, które stosują producenci i dystrybutorzy, którzy – kreując popyt – reklamują nierzadko suplementy jako równoważne produktom leczniczym (NIK 2017).

Cel pracy

Celem pracy jest analiza rynku preparatów probiotycznych dostępnych bez recepty.

Materiały i metody

Materiałem badawczym były preparaty określone jako probiotyki dostępne na rynku zarówno w punktach sprzedaży stacjonarnej, jak i internetowej.

Badania obejmowały analizę rynku tej grupy produktów z uwzględnieniem klasyfikacji ich na: leki dostępne bez recepty, suplementy diety i środki spożywcze specjalnego przeznaczenia medycznego. Na podstawie informacji deklarowanych przez producentów dokonano porównania występowania składników o działaniu probiotycznym z uwzględnieniem rodzaju, gatunku i szczepu. Przeanalizowano również zakres cenowy tych preparatów.

Wyniki badań i dyskusja

Analiza rynku preparatów probiotycznych, zarówno w sprzedaży stacjonarnej, jak i internetowej wskazuje, preparaty mające status suplementu diety jako te najliczniej dostępne bez recepty. Wśród 78 dostępnych preparatów probiotycznych stanowiły one większość –około 65%. Prawie dwukrotnie mniej jest na rynku różnych probiotyków mających status środka spożywczego specjalnego przeznaczenia medycznego, stanowią 30% ogółu tego typu preparatów. Najmniej dostępnych na rynku jest probiotyków zarejestrowanych jako lek. Badania wskazują jedynie na cztery dostępne tego typu preparatów bez recepty, co stanowi zaledwie 5% udziału ich w ogólnej puli dostępnych probiotyków.

Analizując skład dostępnych środków spożywczych specjalnego przeznaczenia medycznego na podstawie informacji podanych przez producenta stwierdza się, że około 74 % stanowią preparaty jednoskładnikowe, a tylko 26% preparaty wieloskładnikowe (Tab. 1). W preparatach wieloskładnikowych w większości deklarowanych jest występowanie więcej niż dwóch gatunków bakterii bądź drożdżaków. Wartość preparatu probiotycznego określa między innymi nie tylko wskazany rodzaj i gatunek bakterii bądź drożdżaków, ale również występowanie konkretnego szczepu potwierdzonego badaniami. Wśród dostępnych na rynku środków spożywczych specjalnego przeznaczenia medycznego w około 63% przypadków wskazanych gatunkach bakterii lub drożdżaków nie określono szczepu, co kwestionuje jakość wielu z tych preparatów.

W grupie preparatów probiotycznych określonych jako suplementy diety zdecydowaną większość (około 73%) stanowią produkty wieloskładnikowe (Tab. 2). Wśród 37 wieloskładnikowych suplementów diety dostępnych na rynku, w zdecydowanej większości producenci deklarują występowanie od 2 do 5 gatunków lub szczepów bakterii bądź drożdżaków, natomiast w około 30% tego typu produktów skład jest bardziej zróżnicowany. Analizując skład wszystkich

Tab. 1. Preparaty probiotyczne dostępne na rynku jako środki spożywcze specjalnego przeznaczenia medycznego.

Lp.	Nazwa	Deklarowane przez producenta składniki probiotyczne występujące w preparacie
Preparaty jednoskładnikowe		
1.	4 Lacti Baby	liofilizowane żywe kultury bakterii <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)
2.	Axoflor	<i>Saccharomyces boulardii</i>
3.	Dierol	<i>Saccharomyces boulardii</i>
4.	Diflos 60	mikrokapsulowane żywe kultury bakterii <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)
5.	Elektrolity z Probiotykiem Labor	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>Boulardii</i>
6.	Entero osłona APTEO	żywe liofilizowane kultury drożdży <i>Saccharomyces boulardii</i>
7.	EnteroBIOTIC Junior	<i>Saccharomyces boulardii</i>
8.	Entero Acidolac, kapsułki	liofilizowane kultury drożdży szczepu <i>Saccharomyces boulardii</i>
9.	Floractin	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103
10.	Floractin: kapsułki lub krople	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103
11.	Floractin Enteric	<i>Saccharomyces boulardii</i>
12.	Florion Duo Probiotyk + Elektrolity	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
13.	Labiotix	liofilizowany szczep bakterii <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LGG
14.	LacidoEnter	<i>Saccharomyces boulardii</i>
15.	LoGGic+	żywe (mikroenkapsulowane) kultury bakterii <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)
16.	Medibiotic Entero, kapsułki	<i>Saccharomyces boulardii</i>
17.	Probiotyk w kroplach Apteo Dziecko	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)
Preparaty wieloskładnikowe		
18.	Acidolac	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, fruktooligosacharydy
19.	Enteromax: saszetki	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> DSM 27112, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103).
20.	Floractin kolki	<i>Pediococcus pentosaceus</i> CECT 8330, <i>Bifidobacterium longum</i> CECT 7894
21.	Lacidar Baby	fruktooligosacharydy (FOS), liofilizowane kultury drożdżowe szczepu <i>Saccharomyces boulardii</i> , liofilizowane bakterie kwasu mlekowego <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103, <i>Bifidobacterium lactis</i> BS01,
22.	MultiURI	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i>
23.	Trilac Plus	liofilizowany szczep <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103), <i>Lactobacillus acidophilus</i>, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>, <i>Bifidobacterium lactis</i>, fruktooligosacharydy

Źródło: Opracowanie własne

Tab. 2. Preparaty probiotyczne dostępne na rynku jako suplementy diety.

Lp.	Nazwa	Występujące w preparacie składniki probiotyczne zadeklarowane przez producenta
Preparaty jednoskładnikowe		
1.	4 Lacti GG	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103
2.	Acidolac Baby	liofilizowany szczep bakterii <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103
3.	BioGaia : tabletki do żucia, krople	<i>Lactobacillus reuteri</i> <i>Protectis</i> (DSM 17938)
4.	Dicoflor 60	liofilizowane żywe kultury bakterii <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
5.	Dicoflor, krople	liofilizowane żywe kultury bakterii <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
6.	DOZ PRODUCT Enteris balance	mikroenkapsulkowane bakterie kwasu mlekowego <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103
7.	DOZ PRODUCT Enteris defence	<i>Saccharomyces boulardii</i> DBVPG 6763
8.	Entero osłona Apteo	żywe liofilizowane kultury drożdży <i>Saccharomyces boulardii</i>
9.	ENTitis, pastylki do ssania, smak truskawkowy	<i>Streptococcus salivarius</i> K12
10.	LoGGic30	liofilizat bakterii kwasu mlekowego: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)
11.	LoGGic60	liofilizat bakterii kwasu mlekowego: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)
12.	SANPROBI IBS	<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v
13.	Singularis Probiotyk Shield	<i>Bacillus coagulans</i> MTCC 5856
14.	Solgar Żurawina Cran Flora z probiotykami	<i>Lactobacillus Acidophilus</i> SD-5864
Preparaty wieloskładnikowe		
15.	9 Lacti Synbio	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
16.	Asecurin	<i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i>
17.	Asecurin Junior	<i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (ATCC 53103), <i>Lactobacillus reuteri</i> (PBS 072)
18.	Asecurin ZS	<i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103)
19.	Biflorin IBS	liofilizowane żywe kultury bakterii <i>Lactobacillus plantarum</i> , liofilizowane żywe kultury bakterii <i>Lactobacillus acidophilus</i> , liofilizowane żywe kultury bakterii <i>Bifidobacterium bifidum</i> , liofilizowane żywe kultury bakterii <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , liofilizowane żywe kultury bakterii <i>Streptococcus thermophilus</i>
20.	Biopron 9	<i>Bifidobacterium bifidum</i> NCIMB 30179, <i>Bifidobacterium breve</i> NCIMB 30180, <i>Bifidobacterium longum</i> NCIMB 30182, <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCIMB 30184, <i>Lactobacillus casei</i> NCIMB 30185
21.	Coloflor Cesario	liofilizowane żywe kultury bakterii: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103), <i>Lactobacillus fermentum</i> (CECT 5716), <i>Bifidobacterium infantis</i> (5478),

22.	Coloflor Junior	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, <i>Bifidobacterium lactis</i>
23.	DOZ PRODUCT Enteris immune	<i>Lactobacillus plantarum</i> LP02, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR04, <i>Bifidobacterium lactis</i> BS01, <i>Bifidobacterium breve</i> BR03, <i>Lactobacillus casei</i> LC03, <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA02, <i>Bifidobacterium longum</i> BL03, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG
24.	DOZ PRODUCT Probiotyki	<i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-3799, <i>Bifidobacterium animalis lactis</i> BS01, <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA02, <i>Streptococcus thermophilus</i> FP4, <i>Lactobacillus casei</i> SD5213, <i>Lactobacillus bulgaricus</i> LDB01,
25.	DOZ PRODUCT Probiotyki: krople	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103, <i>Bifidobacterium lactis</i> BS01, <i>Bifidobacterium breve</i> BR03
26.	DR MERCOLA, Probiotyki	<i>Lactobacillus acidophilus</i> DDS-1, <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bactobacillus salivarius</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i>
27.	GAL, probiotyki	Fruktoooligosacharydy, <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
28.	Healthy Origins, Probiotic 30 billion CFU	<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14, <i>Bifidobacterium lactis</i> BI-04, <i>Bifidobacterium longum</i> BI-05, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lr-32, <i>Bifidobacterium breve</i> Bb-03
29.	Immunobiotic 50+	<i>Bifidobacterium Lactis</i> HN019, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103,
30.	Immunobiotic Junior C	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103, <i>Saccharomyces boulardii</i>
31.	Inerbiotyki C	liofilizowane bakterie kwasu mlekowego zawierające (w równych częściach) szczepki: <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus casei</i>
32.	LaciflorStrong	<i>Bifidobacterium</i> ssp., <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
33.	LactoSeven	<i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
34.	MediproLac	<i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , Probiotyki – FOS (Fruktoooligosacharydy)
35.	Multi Flora APTEO dla kobiet	<i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
36.	Multilac Baby Synbiotyki	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG, fruktoooligosacharydy
37.	Multilac Control Junior	<i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103), fruktoooligosacharydy (FOS)
38.	MyVita Silver, Probiotic	<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB01; <i>Bifidobacterium lactis</i> BS01; <i>Bifidobacterium longum</i> BL03; <i>Bifidobacterium breve</i> BR03; <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA02; <i>Lactobacillus plantarum</i> LP01; <i>Lactobacillus plantarum</i> LP02; <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR05; <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR04; <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LR06; <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LP01; <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG; <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>salivarius</i> CLR 1328; <i>Streptococcus thermophilus</i> FP4; <i>Lactobacillus pentosus</i> LP01

39.	Naturalna osłona probiotyczna	iofilizowe bakterie kwasu mlekowego zawierające (w różnych częściach) szczepy: <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LGG ATCC 53103, <i>Lactobacillus plantarum</i> LP09, <i>Lactobacillus paracasei</i> LPC00, <i>Bifidobacterium animalis</i> susp. <i>lactis</i> BS 01
40.	Ośłonik Max Extra	iofilizowane kultury drożdży <i>Saccharomyces boulardii</i> DBVPG 6763, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103,
41.	Ośłonka Normal, kapsułki	Liofilizat bakterii probiotycznych: <i>Bifidobacterium lactis</i> FloraActive 32269, <i>Streptococcus thermophilus</i> FloraActive 32319, <i>Lactobacillus rhamnosus</i> FloraActive 19070-2, <i>Lactobacillus plantarum</i> FloraActive 32383, <i>Actilight</i> fruktooligosacharydy (FOS)
42.	Probioset	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA 14 , <i>Bifidobacterium lactis</i> HN019
43.	Probiotyk Medica+Vitamina C	<i>Lactobacillus planatarum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i>
44.	Probiotyk,DORSIM	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium bididum</i> , <i>Lactococcus lactis</i>
45.	Sanprobi Stress	<i>Lactobacillus helveticus</i> Rosell® – 52; <i>Bifidobacterium longum</i> Rosell® – 175
46.	SANPROBI Super Formuła	<i>Bifidobacterium lactis</i> W51, W52; <i>Lactobacillus acidophilus</i> W22; <i>Lactobacillus paracasei</i> W20; <i>Lactobacillus plantarum</i> W21; <i>Lactobacillus salivarius</i> W24; <i>Lactobacillus lactis</i> W19
47.	SEMA Lab Probiotyk + Prebiotyk (synbiotyk)	<i>Bifidobacterium bifidum</i> LMG 25628 (THT 010101), <i>Lactobacillus helveticus</i> LMG 26307 (THT 031102), <i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMG 25626 (THT 030903), <i>Streptococcus thermophilus</i> LMG 26656 (THT 070102)
48.	Trilac IBS	iofilizatu bakterii <i>Bifidobacterium longum</i> W11, liofilizatu <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (ATCC 53103), fruktooligosacharydy <i>Actilight</i> 950P
49.	Vivomixx 112, kapsułki	iofilizowane żywe kultury bakterii: <i>Streptococcus thermophilus</i> DSM24731®, <i>Bifidobacterium longum</i> DSM24736®, <i>Bifidobacterium breve</i> DSM24732®, <i>Bifidobacterium infantis</i> DSM24737®, <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM24735®, <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM24730®, <i>Lactobacillus paracasei</i> DSM24733®, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> DSM24734®
50.	Vivomixx 225, proszek do sporządzenia zawiesiny w saszetkach	iofilizowane żywe kultury bakterii: <i>Streptococcus thermophilus</i> DSM24731®, <i>Bifidobacterium longum</i> DSM24736®, <i>Bifidobacterium breve</i> DSM24732®, <i>Bifidobacterium infantis</i> DSM24737®, <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM24735®, <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM24730®, <i>Lactobacillus paracasei</i> DSM24733®, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> DSM24734®
51.	Vivomixx micro, kapsułki twarde	iofilizowane żywe kultury bakterii: <i>Streptococcus thermophilus</i> DSM24731®, <i>Bifidobacterium longum</i> DSM24736®, <i>Bifidobacterium breve</i> DSM24732®, <i>Bifidobacterium infantis</i> DSM24737®, <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM24735®, <i>Lactobacillus plantarum</i> DSM24730®, <i>Lactobacillus paracasei</i> DSM24733®, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> DSM24734®

Źródło: Opracowanie własne

dostępnych probiotyków określonych jako suplementy diety można stwierdzić, że tylko w przypadku około 63% wskazań gatunków drobnoustrojów podany był numer szczepu. Tak mały procent określonych szczepów kwestionuje jakość wielu preparatów probiotycznych tej grupy.

Preparaty probiotyczne zarejestrowane jako leki, dostępne bez recepty stanowią zaledwie 6% wszystkich dostępnych bez recepty probiotyków. Wśród nich występują zarówno jedno-, jak i wieloskładnikowe (Tab. 3). Istotne natomiast jest to, że w przypadku wszystkich dostępnych na rynku probiotyków-leków producenci podają szczepy poszczególnych gatunków bakterii lub drożdży.

Tab. 3. Preparaty probiotyczne dostępne na rynku jako leki bez recepty.

Lp.	Nazwa preparatu	Występujące w preparacie składniki probiotyczne zadeklarowane przez producenta
Preparaty jednoskładnikowe		
1.	Enterol 250	liofilizowane drożdżaki <i>Saccharomyces boulardii</i> CNCM I-745
Preparaty wieloskładnikowe		
2.	Lacidofil	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> R0011, <i>Lactobacillus helveticus</i> R0052
3.	Lacid, proszek do sporządzania zawiesiny doustnej	Szczep <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Pen, Szczep <i>Lactobacillus rhamnosus</i> E/N, Szczep <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Oxy
4.	Lacid Forte	Szczep <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Pen, szczep <i>Lactobacillus rhamnosus</i> E/N, szczep <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Oxy

Źródło: Opracowanie własne

Ponadto należy podkreślić, że jedynie w 27% wszystkich dostępnych na rynku preparatów probiotycznych występują liofilizowane kultury bakterii lub drożdży, a technikę mikrokapsułkowania zastosowano jedynie w dwóch tego typu produktach.

Tab. 4. Cena probiotyków.

Lp.	Status probiotyków	Przedział cenowy dawki jednostkowej
1.	Leki bez recepty	0,85 zł – 4,50 zł za 1 kapsułkę
2.	Suplementy diety	0,50 zł – 5,33 zł za 1 kapsułkę
3.	Dietetyczny środek spożywczy specjalnego przeznaczenia medycznego	0,50 zł – 1,60 zł za 1 kapsułkę lub 8,95 zł – 14,99 zł za 5 ml

Źródło: Opracowanie własne

Porównując ceny dostępnych na rynku probiotyków, w przeliczeniu na porcję jednostkową, możemy zauważyć duże zróżnicowanie (Tab. 4). Preparaty mające status leku, mimo większych wymagań jakościowych nie zawsze są droższe od innych probiotyków.

Niektóre z dostępnych na rynku preparatów mających status suplementu lub dietetycznego środka spożywczego specjalnego przeznaczenia medycznego są droższe w porównaniu z lekami bez recepty, ma to miejsce szczególnie w przypadku preparatów wieloskładnikowych.

Podsumowanie

1. Spośród występujących na rynku preparatów probiotycznych dostępnych bez recepty, tylko nieliczne są zarejestrowane jako produkty lecznicze, większość to suplementy diety lub dietetyczne środki spożywczego specjalnego przeznaczenia medycznego.
2. Preparaty probiotyczne to w znacznej większości preparaty wieloskładnikowe, zawierające według deklaracji producenta od dwóch do nawet kilkunastu gatunków bakterii bądź drożdżaków.
3. W przypadku probiotyków określanymi jako suplementy diety lub środki spożywcze specjalnego przeznaczenia medycznego dla większości kultur nie określono numeru szczepu, co kwestionuje jakość tych preparatów.
4. Wszystkie dostępne bez recepty probiotyki będące lekami bez recepty posiadały informacje o występującym szczepie lub szczepach bakterii lub drożdży.
5. Niewiele jest na rynku liofilizowanych preparatów probiotycznych w formie mikrokapsulek.
6. Przy dużym zróżnicowaniu asortymentowym i cenowym probiotyków wiedza nabywcy i informacje producenta odnośnie danego preparatu mogą pozwolić na wybór tych dobrych jakościowo.

Literatura

- Chen S., Zhao Q., Ferguson L. R., Shu Q., Weir I., Garg S. 2012. Development of a Novel Probiotic Delivery System Based on Microencapsulation with Protectants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93: 1447-1457.
- Dyrektywa 2002/46/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 10 czerwca 2002 r., w sprawie zbliżenia ustawodawstw Państw Członkowskich odnoszących się do suplementów żywnościowych (Dz.U. UE L 183 z 12.07.2002, s. 51, ze zm.).

- Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London, Ontario, Canada, April 30 and May 1, 2002.
- Hill C., Guarner F., Reid G., Gibson G. R., Merenstein D. J., Pot B., Morelli L., Canani R. B., Flint H. J., Salminen S., Calder P. C., Sanders M. E. 2014. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 11: 506-514.
- Holzapfel W. H., Haberer P., Geisen R., Björkroth J., Schillinger U. 2001. Taxonomy and Important Features of Probiotic Microorganisms in Food and Nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*; 73 (supl.): 365-733.
- Jach M., Łoś R., Maj M., Malm A. 2013. Probiotyki – aspekty funkcjonalne i technologiczne. *Post. Mikrobiol.*, 52: 161-170.
- Lutyńska A., Augustynowicz E., Wiatrzyk A. 2012. Problemy stosowania suplementów diety zawierających probiotyki. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 93(3): 493-498.
- Majoka K. 2014. Probiotyki, prebiotyki i synbiotyki – charakterystyka i funkcje. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 95(3): 541-549.
- Najwyższa Izba Kontroli, raport, 2017 <https://www.nik.gov.pl/aktualnosci/nik-o-dopuszczaniu-do-obrotu-suplementow-diety.html>
- Rozporządzenia UE nr 609/2013 w sprawie żywności dla określonych grup żywność specjalnego przeznaczenia medycznego.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22 listopada 2017r. zmieniające rozporządzenie w sprawie składu oraz oznakowania suplementów diety (Dz. U., poz. 2236).
- Szajewska H. 2015. Probiotyki w gastroenterologii – aktualny stan wiedzy. *Gastroenterologia Kliniczna*, 7(1): 20-26.
- Szajewska H. 2017. Probiotyki – aktualny stan wiedzy i zalecenia dla praktyki klinicznej. *Med. Prakt.*, 7–8: 19–37.
- Ustawa z 25 sierpnia 2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia (Dz.U. nr 171, poz. 1225 2006 r. z późn. zm.).
- Ustawa z 30 marca 2007 r. o zmianie ustawy Prawo farmaceutyczne oraz o zmianie niektórych innych ustaw (Dz. U. nr 75, poz. 492 z 2007 r.).

ABSTRACT**MARKET ANALYSIS OF PROBIOTICS – SUPPLEMENTS OR MEDICINES**

Currently, a growing phenomenon of the use of supplements is observed among various age groups. According to GIS data, the range of supplements on the Polish market increases every year. A significant group are probiotics, which are classified according to their registration status for: over-the-counter medicines, dietary supplements and foods for special medical purposes. Legal requirements regarding the notification of products having the status of both dietary supplements and food for special medical purposes only include the declaration of the composition given by the manufacturer, they do not have requirements for confirmed composition and the declared effect, which is required for probiotics having the status of a drug.

The study analyzes the probiotics market, taking into account the current register. The tests included product analysis based on information contained on the packaging or made available at the point of sale. The market assessment indicates a wide range of dietary supplements compared to medicines. Most probiotics did not have a strain number, which is important when choosing this type of probiotic.

Słowa kluczowe: probiotyki, rynek probiotyków, leki, suplementy diety, środki spożywcze specjalnego przeznaczenia medycznego

Keywords: probiotics, probiotics market, drugs, dietary supplements, food for special medical purposes

Dane do kontaktu z autorem:

Honorata Mederska

E-mail: h.mederska97@gmail.com

Aleksandra Purkiewicz

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauki o Żywności

Koło Naukowe Żywienia i Profilaktyki Żywieniowej

Opiekun: dr inż. Joanna Ciborska

SPOŻYCIE POLIFENOLI Z DIETĄ, AKTYWNOŚĆ FIZYCZNA A WARTOŚCI PARAMETRÓW KĄTA FAZOWEGO

Wstęp

Stan odżywienia, według Charzewskiej (2010), *to stan zdrowia wynikający ze zwyczajowego spożycia żywności, z wchłaniania i wykorzystania wchodzących w jej skład składników odżywczych i nie odżywczych. Stan ten może być modyfikowany przez wiele czynników wpływających na procesy metaboliczne, a w szczególności przez patologie związane ze stanem zdrowia, uwarunkowania genetyczne, warunki społeczno-ekonomiczne lub związane z aktywnością fizyczną czy z zaawansowanym wiekiem.* Istnieją różne narzędzia służące ocenie stanu odżywienia organizmu, takie jak: wywiady żywieniowe (zaliczane do badań podmiotowych), badania przedmiotowe, pomiary antropometryczne oraz badania biochemiczne. Punktem wyjścia w ocenie stanu odżywienia jest wywiad żywieniowy, dzięki któremu możliwe jest dokładne poznanie zwyczajów żywieniowych chorego i postawienie odpowiedniej diagnozy (Małecka-Massalska i in. 2017). Do tego celu stosuje się specjalnie opracowane kwestionariusze i skale (Cederholm i in. 2015). Najpopularniejszym narzędziem tego typu jest subiektywna globalna ocena stanu odżywienia SGA (Subjective Global Assessment) – skala opracowana przez lekarzy z Toronto, zawierająca pytania m.in. odnośnie do zmian masy ciała, zmian w przyjmowaniu pokarmów, objawów ze strony układu pokarmowego czy wydolności fizycznej (Fizia i in. 2013). Uzupełnieniem tak zebranego wywiadu są badania przedmiotowe, które obejmują ocenę masy ciała i wzrostu, pomiar ciśnienia krwi, tętna, badania wzroku, jam nosowej, ustnej i gardła oraz oględziny zewnętrzne – włosów czy skóry (Małgorzewicz

i in. 2013). Badania antropometryczne polegają na porównawczych pomiarach poszczególnych części ludzkiego ciała. Należą do nich pomiar wzrostu, masy ciała oraz pomiary grubości fałdów skórno-tłuszczowych. Najczęściej wykorzystywanymi w badaniach klinicznych są wskaźnik masy ciała BMI (*body mass index*) oraz wskaźnik talia – biodro WHR (*waist – to – hip – ratio*). Znajomość tych parametrów umożliwia rzetelną i obiektywną ocenę pacjenta (Antczak-Domagała i in. 2013). Do ostatnich metod oceny stanu odżywiania – badań biochemicznych – zaliczono pomiary poziomu albumin, hemoglobiny, białka wiążącego retinol czy CRP (Małecka-Massalska i in. 2017). Przy właściwej analizie składu ciała należy zwrócić uwagę na zawartość wody wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej, która warunkuje prawidłowy metabolizm komórek oraz zawartość tkanki tłuszczowej i beztłuszczowej masy ciała (tkanki mięśniowej). Parametry te można monitorować analizą impedancji bioelektrycznej (Bioelectrical Impedance Analysis – BIA) (Khalil 2014). Jest to szybka i nieinwazyjna metoda analizy składu ciała, wykorzystująca właściwości elektryczne różnych tkanek ustroju. Prąd, najczęściej o częstotliwości 50 kHz, przepuszcza się przez organizm i przewodzony jest on przez tkanki w różny sposób. Na impedancję bioelektryczną składają się rezystancja (R), będąca pomiarem oporu wody i znajdujących się w niej elektrolitów oraz reaktancja (X_c), stanowiąca opór pojemnościowy komórek organizmu (Małecka-Massalska 2012). W opisywanym badaniu natężenie prądu jest na tyle małe, że nie powoduje podrażnienia komórek nerwowych oraz mięśnia sercowego. Prąd używany podczas metody ma natężenie 0,8–1 mA i jest on praktycznie nieodczuwalny i nie stanowi żadnego zagrożenia dla zdrowia (Major-Gołuch i in. 2010). Największą zaletą impedancji bioelektrycznej jest jej nieinwazyjność i bezpieczeństwo, a także prostota i szybkość wykonania pomiaru (Lee i in. 2008). Przeciwwskazany jest on dla pacjentów posiadających wszczepione metalowe implanty i rozruszniki serca, ponieważ analizator ma wpływ na inne, emitujące pole elektromagnetyczne urządzenia. Badanie niezalecane jest również kobietom w ciąży (Major-Gołuch i in. 2010). Analizator do wykonywania tego typu pomiarów jest szeroko stosowanym narzędziem w ocenie stanu odżywienia oraz w badaniach epidemiologicznych (Dźygadło i in. 2012). Jednym z parametrów, który można wyznaczyć przy pomocy impedancji bioelektrycznej jest kąt fazowy, wyliczany zgodnie ze wzorem (1) (Kostrzewa i in. 2017):

$$\varphi = \arctan \frac{X_c}{R} \quad (1)$$

gdzie: φ – kąt fazowy, X_c – reaktancja, R – rezystancja.

Kąt fazowy wyznaczany na podstawie rezystancji i reaktancji. Rezystancja ma wpływ na spadek ciśnienia, natomiast reaktancja powoduje przesunięcie fazowe przyłożonego prądu zmiennego, które w ujęciu fazowym jest pojmowane jako kąt fazowy (Major-Gołuch i in. 2010). Parametr ten jest używany jako wskaźnik dobrostanu całego ludzkiego organizmu, który wynika z prawidłowego stanu komórek. Prawidłowe wartości kąta fazowego u osób dorosłych mieszczą się w zakresie 5–7° (Kostrzewa i in. 2017) .

Znając parametry zawartości tkanki tłuszczowej oraz masy beztłuszczowej, wskaźnika ECM/BCM (*extracellular mass, body cel mass*), a także wartości kąta fazowego, można ocenić stopień odżywienia organizmu (Stańczyk i in. 2013). Kiedy organizm jest dobrze odżywiony, masa komórek organizmu (BCM) przyjmuje wyższe wartości niż masa zewnątrzkomórkowa (ECM). Wskaźnik ECM/BCM powinien przyjmować wartości mniejsze od jedności, a jego wartości większe od 1 świadczą o wystąpieniu zaburzeń odżywiania oraz nadmiernym gromadzeniu wody w tkankach. Przyczyną złego stanu odżywienia organizmu jest także zbyt niski poziom aktywności fizycznej. Przy małej ilości wysiłku fizycznego maleje wartość kąta fazowego, co świadczy o nieprawidłowym odżywieniu komórek organizmu (Stańczyk i in. 2013). Potwierdzają to badania Mundstock i in. (2019), w których przeprowadzony pomiar impedancji bioelektrycznej jednoznacznie stwierdzili, że osoby wykonujące regularny wysiłek fizyczny o umiarkowanej intensywności wykazywały istotnie wyższe wartości kąta fazowego. Między stanem odżywienia a kątem fazowym istnieje zależność – im wyższa wartość kąta fazowego, tym organizm jest lepiej odżywiony. Na wartości kąta fazowego ma wpływ również sposób odżywiania. Na szczególną uwagę zasługują produkty takie jak: oliwa z oliwek, płatki zbożowe, nasiona roślin strączkowych, będące typowymi składnikami diety śródziemnomorskiej, których spożycie, według Barrea i in. (2017), ma pozytywny wpływ na kąt fazowy. Badana grupa spożywająca regularnie te produkty miała lepsze samopoczucie, większą wydolność fizyczną oraz korelowało to również ze zmniejszeniem masy ciała. W kondycji organizmu podkreślić należy także żywność roślinną zawierającą polifenole. Przeciwtleniacze te znajdują się w produktach i napojach pochodzenia roślinnego, w szczególności jabłkach, jagodach, owocach cytrusowych, śliwkach, brokułach, kakao, herbacie i kawie. Badania epidemiologiczne dowodzą, że dieta bogata w polifenole chroni przed rozwojem chorób układu krążenia i cukrzycy typu 2 (Williamson 2017). Dieta bogata w polifenole połączona z aktywnością fizyczną ma pozytywny wpływ na stan komórek organizmu – więcej komórek pozostaje w stanie nienaruszonym i wiąże się to z lepszym stanem odżywienia organizmu.

Cel pracy

Celem pracy była ocena parametrów kąta fazowego w grupie 30 studentów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie, w zależności od poziomu aktywności fizycznej oraz od częstotliwości spożycia żywności bogatej w polifenole.

Materiały i metody

Badania zostały wykonane wśród 38 studentów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Analizę przeprowadzono wśród 30 pomiarów, z powodu niepełnych danych uzyskanych w kwestionariuszach. W badaniu udział wzięli zarówno kobiety, jak i mężczyźni, w wieku 21–25 lat. Do pomiaru wartości kąta fazowego użyto medycznego analizatora składu ciała Seca 515 mBCA (medical Body Composition Analyzer). Urządzenie to umożliwia wyznaczenie zawartości tłuszczu, masy beztłuszczowej, wody i masy mięśni szkieletowych w ciele. Ponadto, w graficzny sposób obrazuje dane parametry. Urządzenie wyposażone jest w podporę, zapewniającą odpowiednią pozycję i wyposażoną w ręczne elektrody, dzięki czemu charakteryzuje się wysoką precyzją. Analizator umożliwia ocenę stanu odżywienia organizmu oraz jest pomocą w diagnozie chorób – otyłości, cukrzycy, zaburzeń odżywiania (https://www.seca.com/pl_pl/produkty/wszystkie-produkty/szczegoly-produktu/seca515.html data dostępu 20.02.2020 r.). Uczestnicy badania zobowiązali byli wypełnić dwa kwestionariusze: Międzynarodowy Kwestionariusz Aktywności Fizycznej (IPAQ – International Physical Activity Questionnaire), składający się z 5 części i zawierający informacje o aktywności fizycznej związanej z pracą zawodową, przemieszczaniem się, pracami domowymi, sportem i rekreacją oraz czasem spędzonym siedząc (Biernat i in. 2007), a także zmodyfikowaną wersję kwestionariusza częstotliwości spożycia żywności FFQ – 6 (Food Frequency Questionnaire) uwzględniającego wyłącznie żywność będącą bogatym źródłem polifenoli (owoce pestkowe, kiwi i cytrusy, owoce jagodowe, jabłka i gruszki, warzywa krzyżowe, soki owocowe i nektary owocowe oraz soki warzywne i warzywno-owocowe), który jest jedną z najczęściej stosowanych metod do oceny sposobu żywienia ludzi (Wądołowska 2016). Badanie zostało wykonane na przełomie stycznia i lutego 2020 roku w Katedrze Żywnienia Człowieka Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Obliczenia statystyczne zostały wykonane w programie Statistica w wersji 13.3 pakietu StatSoft. Wykorzystano test chi – kwadrat Pearsona, badający zależności pomiędzy zmiennymi. Za poziom istotności przyjęto $p \leq 0,05$.

Wyniki badań

Analizowano pomiary 30 studentów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego, w tym 12 mężczyzn oraz 18 kobiet, w wieku 23–26 lat. Parametry kąta fazowego analizowano względem płci. Odsetek prawie 40% kobiet charakteryzował się wartościami kąta fazowego poniżej 5°. Z kolei, wśród mężczyzn dominującą wartością kąta fazowego były wartości powyżej 6° (odsetek 75% mężczyzn) (Tab. 1).

Tab. 1. Charakterystyka wybranej grupy populacyjnej ze względu na parametry kąta fazowego

Wartości kąta fazowego [°]	Płeć	
	kobieta	mężczyzna
< 5	38,90%	0,0%
5–6	55,60%	25,0%
> 6	5,60%	75%

Źródło: Opracowanie własne

Z przeprowadzonej analizy wynika, że wartości parametru kąt fazowy są istotnie zależne od płci ($p \leq 0,05$).

Respondentów scharakteryzowano pod względem spożycia wybranych konkretnych grup produktów żywnościowych będących bogatym źródłem polifenoli. Osoby, które spożywały owoce pestkowe z deklarowaną często-

Tab. 2. Rozkład odpowiedzi częstotliwości spożywania owoców pestkowych, kiwi i cytrusów oraz owoców jagodowych w zależności od wielkości parametrów kąta fazowego

Kategoria częstotliwości spożycia	Owoce pestkowe			Kiwi i cytrusy			Owoce jagodowe		
	kąt fazowy [°]			kąt fazowy [°]			kąt fazowy [°]		
	< 5	5–6	> 6	< 5	5–6	> 6	< 5	5–6	> 6
Nigdy lub prawie nigdy	71,4%	–	–	–	–	10%			
Raz w miesiącu lub rzadziej	14,3%	46,2%	40%	71,4%	–	–	85,7%	30,8%	–
Kilka razy w miesiącu	–	–	–	28,6%	53,9%	70%	14,3%	46,2%	10%
Kilka razy w tygodniu	14,3%	30,8%	40%	–	46,2%	–	–	–	30%
Codziennie	–	23,1%	20%	–	–	10%	–	23,1%	60%

Źródło: Opracowanie własne

tliwością nigdy lub prawie nigdy (71,4%), charakteryzowały się parametrami kąta fazowego poniżej 5°. Wraz ze zwiększaniem częstotliwości ich spożycia, wartość kąta fazowego rosła. Badani posiadający wyższe wartości kąta fazowego (> 6°) spożywali z większą częstotliwością owoce pestkowe – kilka razy w tygodniu (40%) oraz codziennie (20%). Odsetek około 70% i 86% osób o najniższych parametrach kąta fazowego z niską częstotliwością spożywał owoce z grupy kiwi i cytrusów oraz owoce jagodowe. W przypadku owoców jagodowych odnotowano odsetek aż 60% respondentów, którzy spożywali je codziennie (Tab. 2).

Przeprowadzona analiza wykazała, że spożycie żywności bogatej w polifenole ma wpływ na zmiany wartości kąta fazowego. Odnotowano istotną zależność między rosnącymi wartościami parametrów kąta fazowego a spożyciem polifenoli z diety ($p \leq 0,05$).

Wartości kąta fazowego scharakteryzowano względem poziomu aktywności fizycznej. Aktywność fizyczną wyrażono w jednostkach MET – min/tydzień, poprzez pomnożenie współczynnika danej aktywności przez liczbę dni jej wykonywania w tygodniu oraz czas trwania wyrażony w minutach na dzień. Wyniki odnośnie do aktywności fizycznej sklasyfikowano według zaleceń IPAQ (Biernat i in. 2007):

- aktywność wysoka: osoby, które wykazały 3 lub więcej dni intensywnych wysiłków fizycznych, łącznie co najmniej 1500 MET-min/tydzień albo 7 lub więcej dni którejkolwiek kombinacji wysiłków (chodzenia, umiarkowanych lub intensywnych wysiłków) przekraczającej 3000 MET-min/tydzień,
- aktywność wystarczająca: osoby, które 3 lub więcej dni intensywnych wysiłków fizycznych nie mniej niż 20 minut dziennie; 5 lub więcej dni umiarkowanych wysiłków lub chodzenia nie mniej niż 30 minut dziennie albo 5 lub więcej dni którejkolwiek kombinacji aktywności fizycznej (chodzenia, umiarkowanych lub intensywnych wysiłków) przekraczającej 600 METmin/tydzień,
- aktywność niewystarczająca: osoby, które nie wykazywały żadnej aktywności fizycznej, bądź nie spełniały warunków dla poziomu wystarczającego i wysokiego.

Wszystkie osoby o wartościach kąta fazowego poniżej 4°, cechowała niewystarczająca aktywność fizyczna. Wśród osób z parametrami kąta fazowego w zakresie 5–6°, najwyższy odsetek (około 70% badanych) charakteryzował się wystarczającym poziomem aktywności fizycznej. Z kolei, odsetek 60% respondentów posiadających wartość kąta fazowego powyżej 6°, zadeklarowało wysoki poziom aktywności fizycznej (Tab. 3).

Tab. 3. Zależności pomiędzy poziomem aktywności fizycznej a wartościami parametrów kąta fazowego

kąt fazowy [°]	aktywność fizyczna		
	wysoka	wystarczająca	niewystarczająca
<5	-	-	100%
5-6	15,4%	69,2%	15,4%
>6	60%	40%	-

Źródło: Opracowanie własne

Na podstawie przeprowadzonej analizy można wywnioskować, że wraz z wyższym poziomem aktywności fizycznej, rośnie wartość kąta fazowego. Różnice te są istotne statystycznie ($p \leq 0,05$).

Dyskusja

Według danych literaturowych kąt fazowy jest zależny od płci. Barbosa-Silva i in. (2005) w swoich badaniach dowiedli, że kąt fazowy przyjmuje istotnie wyższe wartości u mężczyzn. Również Bosa-Westphal i in. (2006) wykazali, że wartości kąta fazowego zależą w znaczącej mierze od płci i przyjmują większe wartości wśród mężczyzn. Przeprowadzone analizy potwierdzają dane z piśmiennictwa i wskazują na zależność między płcią a wartością kąta fazowego. Odmienne zdanie na ten temat mają Baumgartner i in. (1988) oraz Selberg i Selberg (2002), którzy nie stwierdzili istotnej różnicy w wartościach kąta fazowego między płcią.

Aktywność fizyczna ma pozytywny wpływ na stan komórek w organizmie i oddziałuje pozytywnie na integralność błony komórkowej (Norman i in. 2012). Z drugiej strony, Issurin (2009) podaje, że superkompensacja w sporcie może negatywnie wpływać na stan zdrowia komórek – po bardzo intensywnym wysiłku fizycznym następuje osłabienie organizmu i obniżenie jego zdolności wysiłkowych. Po odpowiedniej regeneracji organizmu wraca on jednak do formy wyjściowej, zostaje przywrócona homeostaza organizmu i obserwuje się poprawę struktury komórek, korelującą z poprawą stanu odżywienia organizmu (Cunanan i in. 2018). Kąt fazowy jest odwrotnie proporcjonalny do rezystancji, która z kolei zależy od obecności i ilości wody wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej (Kyle i in. 2004). Trening fizyczny, zwłaszcza siłowy – powodujący wzrost masy mięśniowej, może prowadzić do wzrostu wody wewnątrzkomórkowej, co

z kolei zmniejsza opór i prowadzi do wzrostu kąta fazowego (Riberio i in. 2014). Reaktancja jest wprost proporcjonalna do wartości kąta fazowego i zależy od integralności błony komórkowej (Kyle i in. 2004). Prawidłowo przeprowadzone ćwiczenia mogą być czynnikiem zwiększającym integralność błony komórkowej, co z kolei prowadzi do lepszej kondycji komórek i zwiększenia wartości kąta fazowego (Cunanan 2018). Innym czynnikiem, zwiększającym reaktancję jest całkowita masa komórkowa. Trening może prowadzić do zwiększenia masy komórkowej, co zwiększa wartość reaktancji, a w konsekwencji wzrasta wartość kąta fazowego (Pigłowska i in. 2016).

Stan organizmu zależy w dużej mierze od sposobu żywienia. Ważne jest dostarczenie wszystkich składników odżywczych na odpowiednim poziomie i zadbanie o prawidłową podaż produktów, będących źródłem składników bioaktywnych. Za wzór diety traktuje się dietę śródziemnomorską, bogatą w warzywa, owoce, oliwę z oliwek i owoce morza, która umożliwia utrzymanie odpowiedniego stanu organizmu, zapobiegając chorobom sercowo-naczyniowym, cukrzycy, nowotworom, niepłodności czy chorobom autoimmunologicznym (Chudzińska i in. 2017). Dieta ta bogata jest w polifenole, związki należące do fitozwiązków, mające działanie przeciwutleniające. Są one zawarte m.in. w owocach, warzywach, oliwie z oliwek czy czerwonym winie, orzechach czy pełnoziarnistych produktach zbożowych (Zych i Szostak-Węgierek 2014). Zgodnie z danymi literaturowymi, im dieta jest bogatsza w polifenole, tym mniejsze ryzyko chorób i lepszy stan organizmu. Wykonane analizy potwierdziły dane z piśmiennictwa – osoby spożywające częściej produkty będące źródłem polifenoli, szczególnie owoców pestkowych i jagodowych, charakteryzowały się wyższymi parametrami kąta fazowego, a w konsekwencji lepszą kondycją organizmu.

Podsumowanie

Kąt fazowy jest ważnym parametrem stosowanym w ocenie stanu odżywienia. Im wyższa jego wartość, tym lepszy stan organizmu na poziomie komórki. Odpowiednia wartość kąta fazowego odpowiada za wydolność organizmu i stan zdrowia człowieka. Zbyt niskie jego wartości korelują ze zmęczeniem i osłabieniem organizmu. Na jego wartość wpływ ma styl życia – parametr ten rośnie wraz z większą częstotliwością spożycia żywności bogatej w polifenole oraz jest wyższy u osób aktywnych fizycznie.

Literatura

- Antczak-Domagala K., Magierski R., Wlazlo A., Sobow T. 2013. Stan odzywienia oraz sposoby jego oceny u osob w podeszlym wieku i u chorych ostepialych. *Psychiatr. Psychol. Klin.*, 13(4): 271-277.
- Barbosa-Silva M.C.G., Barros A.J.D., Wang J., Heymsfield S.B., Pierson R.N. 2005. Bioelectrical Impedance Analysis: Population Reference Values for Phase Angle by Age and Sex. *Am. J. Clin. Nutr.*, 82(1): 49-52.
- Barrea L., Muscogiuri G., Macchia P.E., Di Somma C., Falco A., Savanelli M.C., Colao A., Savastano S. 2017. Mediterranean Diet and Phase Angle in a Sample of Adult Population: Results of a Pilot Study. *Nutrients*, 9(2): 151-164.
- Baumgartner R. N., Chumlea W. C., Roche A. F. 1988. Bioelectric impedance phase angle and body composition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 48: 16-23.
- Biernat E., Stupnicki R., Gajewski A. K. 2007. Międzynarodowy Kwestionariusz Aktywności Fizycznej (IPAQ) – wersja polska. *Wychowanie Fizyczne i Sport*, 51(1): 47-54.
- Bosy-Westphal A., Danielzik S., Dörhöfer R. P., Later W., Wiese S., Müller M. J. 2006. Phase Angle from Bioelectrical Impedance Analysis: Population Reference Values by Age, Sex, and Body Mass Index. *J. Parenter. Enteral. Nutr.*, 30(4): 309-316.
- Cederholm T., Bosaeus I., Barazzoni R., Bauer J., Van Gossum A., Klek S. 2015. Diagnostic Criteria for Malnutrition – An ESPEN Consensus Statement. *Clin. Nutr.*, 34(3): 335-340.
- Charzewska J. 2010. Ocena stanu odzywienia [w:] *Żywnienie Człowieka. Podstawy Nauki o Żywieniu*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, s. 529-546.
- Chudzińska M., Wołowicz Ł., Zukow W., Sinkiewicz W. 2017. Dieta śródziemnomorska zalecana nie tylko w chorobach sercowo-naczyniowych. *Health and Sport*, 7(6): 732-746.
- Cunanan A.J., DeWeese B.H., Wagle J.P., Carroll K.M., Sausaman R., Hornsby W.G. 2018. The General Adaptation Syndrome: A Foundation for the Concept of Periodization. *Sports Med.*, 48: 787-797.
- Dzygadło B., Łapecka-Klusek C., Pilewski B. 2012. Wykorzystanie analizy impedancji bioelektrycznej w profilaktyce i leczeniu nadwagi i otyłości. *Probl. Hig. Epidemiol.*, 93(2): 274-280.
- Fizia K., Gętek M., Czech N., Muc-Wierzoń M., Nowakowska-Zajdel E. 2013. Metody oceny stanu odzywienia u chorych na nowotwory. *Pielęg. Pol.*, 2(48): 105-110.
- https://www.seca.com/pl_pl/produkty/wszystkie-produkty/szczegoly-produktu/seca515.html data dostępu 20.02.2020 r.
- Issurin V. B. 2009. Generalized Training Effects Induced by Athletic Preparation. A Review. *J. Sports Med. Phys. Fit.*, 49: 333-345.

- Khalil S.F., Mohkhtar M.S., Ibrahim F. 2014. The Theory and Fundamentals of Bio-impedance Analysis in Clinical Status Monitoring and Diagnosis of Diseases. *Sensors*, 14(6): 10895-10928.
- Kostrzewa J., Małeck-Massalska T., Ciesielska Z. 2017. Kąt fazowy jako wykładnik stanu komórek [w:] *Choroby XXI w. – analiza współczesnej sytuacji zdrowotnej*. Wydawnictwo Naukowe TYGIEL, Lublin, s. 37-43.
- Kyle U. G., Bosaeus I., De Lorenzo A. D., Deurenberg P., Elia M., Gomez J. M. 2004. Bioelectrical Impedance Analysis – Part I: Review of Principles and Methods. *Clin. Nutr.*, 23: 1226-1243.
- Lee K., Lee S., Kim Y. J., Kim Y. J. 2008. Waist Circumference, Dual-energy X-ray Absorptiometrically Measured Abdominal Adiposity and Computed Tomographically Derived Intraabdominal Fat Area on Detecting Metabolic Risk Factors in Obese Women. *Nutrition*, 24: 625–631.
- Major-Gołuch A., Miazgowski T., Krzyżanowska-Świniarska B., Safronow K., Hajduk A. 2010. Porównanie pomiarów masy tłuszczu u młodych zdrowych kobiet z prawidłową masą ciała za pomocą impedancji bioelektrycznej i densytometrii. *Endokr. Otył. Zab. Przem. Mat.*, 6(4): 189-195.
- Małecka-Massalska T. 2012. Ocena wybranych parametrów analizy impedancji bioelektrycznej u chorych na nowotwory złośliwe głowy i szyi. Wydawnictwo Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, Lublin, s. 22-60.
- Małecka-Massalska T., Popiołek J., Teter M., Homa-Mlak I., Dec M., Makarewicz A., Karakuła-Juchnowicz H. 2017. Wykorzystanie kąta fazowego do oceny stanu odżywienia pacjentów z jadłowstrętem psychicznym. *Psychiatr. Pol.*, 61(6): 1121-1131.
- Małgorzewicz S., Czajka B., Kaczkan M., Dębska Ślizień A., Rutkowski B. 2013. Niedożywienie białkowo-kaloryczne – rozpoznanie i monitorowanie. *Forum Nefrologiczne*, 2: 77-83.
- Mundstock E., Amaral M. A., Baptista R. R., Sarria E. E., Dos Santos R. R. G., Filho A. D., Rodrigues C. A. S., Forte G. C., Castro L., Padoin A. V., Stein R., Perez L. M., Ziegelmann P. K., Mattiello R. 2019. Association between Phase Angle from Bioelectrical Impedance Analysis and Level of Physical Activity: Systematic Review and Meta – analysis. *Clin. Nutr.*, 38 (4): 1504-1510.
- Norman K., Stobaus N., Pirlich M., Bosy-Westphal A. 2012. Bioelectrical Phase Angle and Impedance Vector Analysis – Clinical Relevance and Applicability of Impedance Parameters. *Clin. Nutr.*, 31: 854-861.
- Pigłowska M., Kostka T., Drygas W., Jegier A., Leszczynska J., Bill-Bielecka M. 2016. Body Composition, Nutritional Status, and Endothelial Function in Physically Active Men without Metabolic Syndrome e a 25 Year Cohort Study. *Lipids Health Dis.*, 15: 1-8.

- Ribeiro A. S., Avelar A., Schoenfeld B. J., Ritti Dias R. M., Altimari L. R., Cyrino E. S. 2014. Resistance Training Promotes Increase in Intracellular Hydration in Men and Women. *Eur J. Sport Sci.*, 14: 578-585.
- Selberg O., Selberg S. 2002. Norm and Correlates of Bioimpedance Phase Angle in Healthy Human Subjects, Hospitalized Patients, and Patients with Liver Cirrhosis. *Eur. J. Appl. Physiol.*, 86: 509-516.
- Stańczyk M., Krenc Z., Tkaczyk M., 2013. Wpływ regularnej aktywności fizycznej na skład ciała i ciśnienie tętnicze dzieci ze szkoły sportowej. *Pediatr Med. Rodz.*, 9(2): 165-172.
- Wądołowska L. 2016. Walidacja kwestionariusza częstotliwości spożycia żywności – FFQ. Ocena powtarzalności. *Bromat. Chem. Toksykol.*, XXXVIII(1): 27-33.
- Williamson G. 2017. The Role of Polyphenols in Modern Nutrition. *Nutr. Bull.*, 42(3): 226-235.
- Zych P., Szostak-Węgierek D. 2014. Dieta paleolityczna. Część II. Porównanie z dietą śródziemnomorską. *Nowa Medycyna*, 1: 28-35.

ABSTRACT

CONSUMPTION OF POLYPHENOLS WITH DIET, PHYSICAL ACTIVITY, AND VALUES OF PHASE ANGLE PARAMETERS

The phase angle is a parameter that allows you to study and assess the condition of the body. Aspects that can affect the condition of cells in the body are physical activity and a proper diet. The aim of the study was to assess phase angle parameters in a group of 30 students of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. The Seca 515 mBCA (medical Body Composition Analyzer) was used to measure phase angle values. Study participants were required to complete two questionnaires: the International Physical Activity Questionnaire (IPAQ) and the Food Frequency Questionnaire (FFQ-6) which includes foods that are a rich source of polyphenols. People showing lower physical activity and declaring the consumption of food rich in polyphenols with a lower frequency, showed lower phase angle parameters. The value of phase angle parameters increased with increasing levels of physical activity and a diet richer in polyphenols.

Keywords: phase angle, polyphenols, physical activity, bioelectrical impedance

Słowa kluczowe: kąt fazowy, polifenole, aktywność fizyczna, impedancja bioelektryczna

Dane do kontaktu z autorem:

Aleksandra Purkiewicz

E-mail: ola-purkiewicz@wp.pl

Tel.: 691738081

inż. Martyna Rychta

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Naukowe Koło Technologów Mleczarstwa

Opiekun: prof. dr hab. inż. Bogusław Staniewski

CHARAKTERYSTYKA MLEKA KOZIEGO – WŁAŚCIWOŚCI FUNKCJONALNE I MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA W PRZEMYŚLE SPOŻYWCZYM

Wstęp

W europejskich państwach UE wyprodukowano w 2016 roku 168,3 mln ton mleka, w tym 2,3 mln ton mleka koziego. Produkcja mleka koziego jest najbardziej popularna na obszarze basenu Morza Śródziemnego i Bliskiego Wschodu, gdzie hodowla kóz jest od lat istotną częścią gospodarki narodowej. W UE mleko kozie jest najchętniej produkowane we Francji, Włoszech, Hiszpanii i Grecji (Kumar i in. 2012; Garcia i in. 2014).

Popularnością cieszą się zwłaszcza kozie sery i jogurty. Wraz ze wzrostem dochodów i stale bogacącym się społeczeństwem zapotrzebowanie na produkty z mleka koziego rośnie. Zainteresowanie tego typu produktami wynika z nowych trendów żywieniowych oraz braku limitów na jego produkcję (Stanisławczyk 2017). Wiele osób uczulonych na białka mleka krowiego lub zmagających się dolegliwościami żołądkowo-jelitowymi i przeciwwskazaniami do ich spożywania wybiera przetwory z mleka koziego (Kumar i in. 2012).

Cel pracy

Celem opracowania jest przegląd wiedzy dotyczącej właściwości funkcjonalnych mleka koziego, podkreślenie jego potencjału odżywczego oraz wskazanie zalet rozwoju i upowszechnienia na rynku produktów na bazie mleka koziego.

Tab. 1. Kryteria mikrobiologiczne dotyczące środków spożywczych wyprodukowanych z mleka.

Rodzaj wyrobu	Badany mikroorganizm	Limits		Plan pobierania próbek			Etap stosowania kryterium	Referencyjna metoda badania
		m	M	n	c			
Sery, masło i śmietana wyprodukowane z mleka surowego lub mleka poddanego obróbce termicznej w temperaturze niższej niż pasteryzacja	Salmonella	Nieobecne w 25 g		5	0	Produkty w ciągu okresu przydatności do spożycia	EN/ISO 6579	
Mleko w proszku i serwatka w proszku	Salmonella	Nieobecne w 25 g		5	0	Produkty w ciągu okresu przydatności do spożycia	EN/ISO 6579	
Mleko pasteryzowane i pasteryzowane płynne produkty mleczne	Enterobacteriaceae	< 1/ml	5/m	5	2	Na końcu procesu produkcji	ISO 21528-1	
Sery z mleka lub serwatki poddanych obróbce termicznej	E. coli	100 jtk/g	1000 jtk/g	5	2	Badania prowadzi się w momencie, gdy spodziewana jest najwyższa liczba badanego mikroorganizmu	ISO 16649-1 lub 2	
Sery z mleka surowego	Gronkowce koagulato-dodatnie	10 ⁴ jtk/g	10 ⁵ jtk/g	5	2		EN/ISO 6888-2	
Sery z mleka poddanego obróbce termicznej niższej niż pasteryzacja oraz sery dojrzewające wyprodukowane z mleka lub serwatki poddanych pasteryzacji lub obróbce termicznej w wyższej temperaturze	Gronkowce koagulato-dodatnie	100 jtk/g	1000 jtk/g	5	2		EN/ISO 6888-1 lub 2	
Sery świeże z mleka lub serwatki poddanych pasteryzacji lub obróbce termicznej w wyższej temperaturze	Gronkowce koagulato-dodatnie	10 jtk/g	100 jtk/g	5	2	Na końcu procesu produkcji	EN/ISO 6888-1 lub 2	
Masło i śmietana wyprodukowane z mleka surowego lub poddanego obróbce termicznej w temperaturze niższej niż pasteryzacja	E. coli	10 jtk/g	100 jtk/g	5	2	Na końcu procesu produkcji	ISO 16649-1 lub 2	

Oznaczenia: M – akceptowana wartość progowa, powyżej której wyniki są dyskwalifikujące,

m – wartość równa lub poniżej której wszystkie wyniki uznawane są za zadowalające,

n – liczba próbek badanych w partii,

c – liczba próbek z partii dających wynik między m i M.

Źródło: Rozporządzenie (WE) nr 1441/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 5 grudnia 2007 r. zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych; Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r.

Podstawy prawne i normy dotyczące przetwarzania mleka koziego

Według Rozporządzenia (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r. ustanawiające szczególne przepisy dotyczące higieny w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego „Produkty mleczne oznaczają produkty przetworzone, uzyskane w wyniku przetworzenia surowego mleka lub dalszego przetworzenia takich przetworzonych produktów”. Rozporządzenie (WE) nr 1441/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 5 grudnia 2007 r. zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych określa kryteria jakościowe dla wyrobów z mleka (w tym mleka koziego), limity, plan pobierania próbek, referencyjną metodę badania oraz etap, w którym jest ona stosowana (Tab. 1).

Dostępne na rynku produkty z mleka koziego i możliwości modyfikacji technologicznych

Rys. 1. Produkty z mleka koziego.



Źródło: Opracowanie własne

Mleko kozie jest sprzedawane w Polsce najczęściej w postaci mleka UHT, UHT bez laktozy oraz mleka w proszku. Cena kartoniku o pojemności 0,5 l (jedyne dostępne na rynku opakowanie), jest około czterokrotnie wyższa od ceny mleka krowiego (<https://www.danmis.com.pl/kategoria-produktu/mleko/>, 03.03.2020r.).

Jogurt z mleka koziego ma specyficzne cechy tekstury. Skrzep kwasowy z mleka koziego charakteryzuje się mniejszą zwięzłością niż skrzep uzyskany z mleka krowiego. Jogurt produkowany metodą termostatową osiąga zbyt luźną konsystencję, natomiast przy produkcji metodą zbiornikową jogurt ma małą lepkość. Niektóre cechy sensoryczne negatywnie wpływają na postrzeganie produktu przez konsumentów (Domagała, Wszolek 2008; Gursel i in. 2016).

Istnieje możliwość poprawienia cech tekstury poprzez wzbogacenie mleka przerobowego w składniki suchej masy, na przykład przez odparowanie, dodatek mleka w proszku, ultrafiltrację, odwróconą osmozę lub dodatek stabilizatorów.

Wzbogacenie mleka przeznaczonego na jogurt ma wpływ na podatność na synerżę. Istotny jest także dobór kultur starterowych, ponieważ mają one wpływ na teksturę i wygląd gotowego produktu. Niektóre bakterie fermentacji mlekowej mają zdolność do produkcji zewnątrzkomórkowych polisacharydów, wpływających korzystnie na stabilność fizyczną mlecznych napojów fermentowanych (Domagała, Wszolek 2008; Mituniewicz-Małek i in. 2017).

Sery z mleka koziego cieszą się dużą popularnością wśród smakoszy z całego świata. Podpuszczka powoduje szybszą denaturację białka mleka koziego, w porównaniu z białkami mleka krowiego, jednak uzyskana wydajność produktu jest mniejsza. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe C6-C10 powodują ostry smak koziego sera. Niski poziom kazeiny alfa-s1 (od 0% do 20% kazein) w kozim mleku odpowiada za luźną teksturę wyrobów. Sery wyprodukowane przy wcześniejszym zastosowaniu metod ultrafiltracji cechowały się wyższym pH, wilgotnością i zawartością popiołu, oraz niższą zawartością tłuszczu i białka. Zastosowanie ultrafiltracji ma wpływ na wzrost wydajności sera (21%), ilości białka (21–26%), ilości tłuszczu (17–22%) oraz skrócenie czasu procesu wytwarzania (Mehendra i in. 2017).

Skład mleka koziego

Tab. 2. Skład mleka różnych gatunków ssaków – porównanie.

Rodzaj mleka Składnik[%]	Krowie	Kozie	Ludzkie
Woda	86,50–87,70 ²	86,8–88,5 ²	86,47 ³ –87,43 ¹
Tłuszcz	3,7 ¹ –4,04 ³	3,07–5,1 ²	3,75 ¹ –4,17 ³
Białka	3,32 ³ –3,5 ¹	2,90–3,76 ²	1,11 ³ –1,63 ¹
Laktoza	4,27 ³ –4,9 ¹	4,10–4,50 ²	6,98 ¹ –7,12 ³
Związki mineralne	0,7 ¹ –0,83 ³	0,71–0,87 ²	0,21 ^{1,3}
Sucha masa beztłuszczowa	9,1 ¹	8,75 ²	8,82 ¹
Sucha masa ogółem	12,6–12,8 ¹	11,5–13,20 ²	12,75 ¹ –13,53

Źródło: Webb i Johnson (1965); Pandya i Ghodke (2007); Soliman (2005)

Zawartość suchej masy beztłuszczowej, laktozy i związków mineralnych jest porównywalna w odniesieniu do mleka krowiego (Tab. 2) (Soliman 2005).

Zawartość składników mleka ulega zmianie w ciągu roku, jest to spowodowane między innymi dostępem do światła słonecznego i zmianami sposobu karmienia (Tab. 4). Mleko pochodzące z sezonu letniego cechuje się niższą koncentracją podstawowych składników (białka i tłuszczu). Mleko pozyskiwane jesienią ma wyższą zawartość tłuszczu (Tab. 3) (Zeng i in. 1997; Barłowska i in. 2013).

Tab. 3. Podstawowy skład chemiczny mleka koziego oraz wydajność dobową z uwzględnieniem sezonu udoju.

Składnik [%]	Tłuszcz	Białko	Laktoza	Sucha masa	Wydajność dobową [kg]
Sezon letni	3,39	2,65	4,11	10,97	2,88
Sezon jesienny	3,66	3,08	4,45	11,71	1,10

Źródło: Wolanciuk i in. (2013)

Tab. 4. Podstawowy skład chemiczny mleka oraz wydajność dobową koziego z uwzględnieniem miesiąca udoju (sezon letni).

Miesiąc Składnik [%]	Marzec	Kwiecień	Maj	Czerwiec	Lipiec	Sierpień
Tłuszcz	2,91	2,26	2,26	2,53	2,46	2,45
Białka	3,27	2,85	2,68	2,69	2,73	2,64
Laktoza	4,44	4,33	4,08	4,13	4,07	4,08
Sucha masa beztłuszczowa	8,30	7,76	7,33	7,32	7,28	7,27
Sucha masa ogółem	11,20	10,01	9,87	9,74	9,72	9,59
Wydajność dobową [kg]	2,28	2,22	2,13	1,98	1,64	1,42

Źródło: Zeng i in. (1997)

Tab. 5. Procentowy udział białek w mleku kozim i krowim – porównanie.

Rodzaj mleka	Kazeina (K)	(K) α_{s1}	(K) α_{s2}	(K) $\beta + \kappa$	Białka serwatkowe
Kozie	82,70	18,92	8,52	55,26	17,30
Krowie	82,65	30,80	7,50	44,35	17,35

Źródło: Ceballos i in. (2009)

Ilość białek serwatkowych jest porównywalna w obu rodzajach mleka analizowanego przez Ceballos i in. (2009). Mleko krowie oraz kozie istotnie różnią się pod względem zawartości kazeiny α_{s1} oraz β - i κ -kazeiny. Mleko krowie zawiera ponad 20 białek, które mogą powodować reakcje alergiczne. Najczęściej są one wywoływane przez frakcje kazeinowe oraz laktoglobuliny- β . Białka mleka koziego, w porównaniu z białkami mleka krowiego, cechują się niższym udziałem frakcji kazeiny α_{s1} (Tab. 5), natomiast reaktywność laktoglobuliny- β jest obniżona (El-Agamy 2007). Mleko kozie uważa się za łatwiej przyswajalne, w porównaniu z mlekiem krowim, między innymi ze względu na mniejszy rozmiar miceli kazeinowych. Mleko kozie wpływa na redukcję niektórych

markerów biorących udział w reakcji alergicznej, dlatego jest produktem polecany dla osób uczulonych na niektóre składniki mleka krowiego (Silanikove i in. 2010; Lad i in. 2017).

Tłuszcz w mleku kozim

Tłuszcz mleka koziego występuje w formie kuleczek tłuszczowych, które są otoczone membraną fosfolipidowo-białkową, podobnie jak kuleczki mleka krowiego. Kuleczki tłuszczowe mleka koziego są wielkości około 2–4 μm , są mniejsze od kuleczek mleka krowiego oraz nie wykazują tendencji do aglomeracji z powodu braku aglutyniny. Ich rozmiar sprawia, że mleko kozie odznacza się wyższą strawnością tłuszczu mlecznego (Danków, Pikul 2011; Barłowska i in. 2016).

Mleko kozie cechuje się większą zawartością krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych oraz większą podatnością na procesy lipolityczne. Jest to przyczyna tzw. zapachu koziego, który jest cechą niepożądaną przez konsumentów w odniesieniu do niektórych produktów spożywczych (Barłowska i in. 2016).

Tab. 6. Porównanie zawartości kwasów tłuszczowych w mleku krowim i kozim (chów w systemie alkierzowym).

Rodzaj kwasów tłuszczowych	Wartość [%]		Źródło
	Mleko krowie	Mleko kozie	
Nasycone SFA	71,24	70,42	(1)
Nienasycone UFA	28,76	29,75	(1)
Jednonienasycone MUFA	25,56	25,67	(1)
Wielonienasycone PUFA	3,2	4,08	(1)
Wielonienasycone n-3	0,25	0,51	(1)
Wielonienasycone n-6	2,53	2,8	(1)
n-6/n-3	10,49	5,49	(1)
Zawartość tłuszczu w mleko ogółem	3,44–4,96	3,16–4,73	(2)

Źródło: Ceballos i in. (2009); Mahmood i Usman (2010)

Ceballos i in. (2009) oraz Mahmood i Usman (2019) wykazali, że mleko kozie zawiera mniej kwasów tłuszczowych nasyconych oraz więcej kwasów tłuszczowych nienasyconych w porównaniu z mlekiem krowim (Tab. 6). Stosunek ilości kwasów n-3 do n-6 w mleku kozim jest korzystniejszy dla zdrowia konsumentów, ponieważ stosunek ilości tych kwasów jest bardziej zbliżony do zalecanego.

Ser wyprodukowany z mleka koziego zawiera więcej kwasów tłuszczowych jednonienasyconych oraz wielonienasyconych (Pajor i in. 2009) w porównaniu z serami wyprodukowanymi z mleka kóz z chowu alkierzowego (Tab. 7) (Sikora i Kawięcka 2015).

Tab. 7. Przykłady uzyskanego profilu kwasów tłuszczowych sera koziego.

Rodzaj kwasów tłuszczowych	Wartość [%]		
	1 (pastwiskowy)	2 (alkierzowy)	3 (pastwiskowy)
Nasycone SFA	76,21	73,42	71,44
Nienasycone UFA	23,79	26,58	28,56
Jednonienasycone MUFA	20,68	22,87	24,32
Wielonienasycone PUFA	3,11	3,71	4,24
Wielonienasycone n-3	0,67	0,64	1,07
Wielonienasycone n-6	1,68	2,76	2,65
n-6/n-3	2,51	4,32	2,47

Źródło: Sikora i Kawięcka (2015); Pajor i in. (2009)

Profil kwasów tłuszczowych w produkcie finalnym różni się w zależności od sposobu żywienia zwierzęcia. Sery wyprodukowane z mleka pochodzącego od kóz z chowu pastwiskowego cechują się bardziej optymalnym stosunkiem ilości kwasów n-6 do n-3. Za optymalny stosunek n-6 do n-3 przyjmuje się 4:1 lub mniej (Simopoulos 2002; Pajor i in. 2009).

Mleko kozie jako produkt funkcjonalny

Mleko kozie ma wyjątkowe właściwości odróżniające je od mleka krowiego, co czyni je atrakcyjną alternatywą dla żywienia niemowląt, ale także dorosłych oraz matek karmiących. Mleko zawiera witaminy, minerały, elektrolity, pierwiastki śladowe, enzymy, kwasy tłuszczowe i aminokwasy (min. tryptofan). Mleko kozie ma zdolność do neutralizowania kwasów i toksyn obecnych w organizmie (Park 2006; Getaneh i in. 2016).

Zawartość witamin i minerałów w mleku kozim i krowim jest podobna, jednak są one różne pod względem ilości tych składników. Mleko kozie zawiera więcej wapnia, witaminy B6, witaminy A, potasu, niacyny, miedzi, selenu oraz przeciwutleniaczy. Mleko kozie ma również niższą zawartość kwasu orotowego, co może być znaczące przy zapobieganiu zespołowi stłuszczenia wątroby (Krstanovic i in. 2010; Lad i in. 2017).

Mleko kozie jest bogate w składniki bioaktywne, które wpływają na regulowanie ciśnienia i kontroli wagi. Ponieważ skład chemiczny mleka koziego jest

podobny do składu mleka ludzkiego, jego składniki są łatwo przyswajalne dla ludzi. Mleko kozie cechuje się wysoką biodostępnością składników mineralnych i odżywczych (Lad i in. 2017).

Mleko kozie cechuje się wysoką zawartością CLA (sprzężonego kwasu linolowego), a głównie izomerów cis-9, trans-11. CLA trans-10, cis-12 powoduje zmniejszenie ryzyka wystąpienia cukrzycy typu 2 oraz przeciwdziała otyłości. CLA wpływa także na poprawę mineralizacji kości oraz wykazuje działanie bakteriostatyczne (Pastuszka i in. 2015).

Rolnictwo ekologiczne i produkcja przyjazna środowisku

Ochrona środowiska naturalnego jest bardzo istotna. Produkcja żywności na świecie również pozostawia po sobie pozostałości, mogące powodować zagrożenia dla gleby i wód. Należy dążyć do zasobooszczędnej produkcji, zwiększonego poziomu innowacyjności, rozwoju produktów i poszukiwania alternatyw, oszczędności wody, pozyskania nowych, biodegradowalnych opakowań oraz optymalizacji procesów w przemyśle spożywczym (Langelaan i in. 2013).

Hodowle kóz na świecie są znacznie mniejsze niż farmy pozyskujące krowie mleko. Z ekologicznego punktu widzenia niższa produkcja mleka ma znaczący wpływ na środowisko. Ślad węglowy jest znacznie mniejszy. Rezygnacja z karmienia zwierząt gotowymi paszami również pozytywnie wpływa na środowisko (Zucali i in. 2020).

Ważnym czynnikiem w produkcji rolno-spożywczej jest woda, która optymalizuje rozwój i wzrost, umożliwia rozród oraz laktację u ssaków. Europejskie Stowarzyszenie Mleczarstwa (EDA) określa wodę jako wrażliwy witalnie, ograniczony zasób, istotny element mleczarstwa (<http://www.portalspozywczy.pl/mleko/wiadomosci/woda-jest-kluczowym-zasobem-dla-mleczarstwa,159803.html>, dostęp 12.03.2020r.; Kuczyńska i Puppel 2016). W trosce o ochronę środowiska, należy przeprowadzić badania dotyczące ilości wody wykorzystywanej do produkcji mleka koziego i jego przetworów, aby zoptymalizować jej zużycie.

Podsumowanie

Mleko kozie jest cennym surowcem o wysokim potencjale żywieniowym. Stosowanie produktów z mleka koziego pozytywnie wpływa na organizm człowieka w większym stopniu, niż spożywanie produktów z mleka krowiego, głównie ze względu na bardziej optymalny stosunek nienasyconych kwasów tłuszczowych n-3 i n-6 oraz wyższą zawartość witamin i minerałów, oraz skład bardziej przypominający mleko ludzkie.

Mleko kozie w większości przypadków może być spożywane przez osoby uczulone na białka mleka krowiego. Dalsze badania dotyczące poprawy cech sensorycznych pozwolą na uzyskanie produktów, które spełnią oczekiwania konsumentów.

Hodowle kóz stanowią alternatywę dla produkcji mleka krowiego, która pozwala na ograniczenie emisji CO₂ oraz mniej ingeruje w środowisko naturalne, głównie dzięki niewielkim rozmiarom hodowli.

Literatura:

- Barłowska J., Woanciuk A., Kędzierska-Matysek M., Litwińczuk Z. 2013. Wpływ sezonu produkcji na podstawowy skład chemiczny oraz zawartość mikro- i makroelementów w mleku krowim i kozim. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 6(91): 69-78.
- Barłowska J., Litwińczuk Z., Domaradzki P., Pastuszka R., Wójcik-Saganek A. 2016. Wpływ sezonu na skład chemiczny i profil kwasów tłuszczowych mleka krowiego i koziego produkowanego w gospodarstwach ekologicznych. *Żywność. Nauka Technologia. Jakość*, 1(104): 45-56.
- Ceballos L. S., Morales E. R., Adarve G., Castro J. D., Martinez L. P., Sampelayo M. R. 2009. Composition of Goat and Cow Milk Produced under Similar Conditions and Analyzed by Identical Methodology. *J. Food Compos. and Anal.* 22: 322-329.
- Danków R., Pikul J. 2011. Przydatność technologiczna mleka koziego do przetwórstwa. *Nauka Przyr. Technol. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu*, 5(2): 1-15.
- Domagała J., Wszolek M. 2008. Wpływ sposobu zagęszczania oraz rodzaju szczepionki na teksturę i podatność na synerezę jogurtu i biojogurtów z mleka koziego. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 15(6): 118-128.
- El-Agamy E. I. 2007. The Challenge of Cow Milk Protein Allergy. *Small Rumin. Res.*, 68: 64-72.
- García V., Garbayo S. R., Boytoial K., Lopez M. B. 2014. Improvements in Goat Milk Quality: A Review. *Small Rumin. Res.*, 121(1): 51-57.
- Getaneh G., Mebrat A., Wubie A., Kendie H. 2016. Review on Goat Milk Composition and its Nutritive Value. *J. Nutr. Health Sci.*, 3(4): 1-10.
- Gursel A., Gursoy A., Anli E., Budak S., Aydemir S., Dulu-Ozkaya F. 2016. Role of Milk Protein-based Products in Some Quality Attributes of Goat Milk Yogurt. *J. Dairy Sci.*, 99: 1-4.
- <https://www.danmis.com.pl/kategoria-produktu/mleko/> (dostęp 01.03.2020r.)

- <http://www.portalspozywczy.pl/mleko/wiadomosci/woda-jest-kluczowym-zasobem-dla-mleczarstwa,159803.html> (dostęp 12.03.2020r.)
- Krstanovic V., Slacanac V., Bozanic R., Hardi J., Rezessy J., Lucan M. 2010. Nutritional and Therapeutic Value of Fermented Caprine Milk. *Int. J. Dairy Technol.*, 63: 171-189.
- Kuczyńska B., Puppel K. 2016. Elementy gospodarki wodnej w aspekcie globalnej produkcji mleka. *Przegląd Hodowlany*, 6: 10-14.
- Kumar S., Kumar B., Kumar R., Kumar S., Khatkar S. K., Kanawjia S. K. 2012. Nutritional Features of Goat Milk – A Review. *Indian J. of Dairy Sci.*, 65(4): 266-273.
- Lad S. S., Aparnathi K. D., Mehta B., Velpula S. 2017. Goat Milk in Human Nutrition and Health – A Review. *Int. J. Curr. Microb. App. Sci.*, 6(5): 1781-1792.
- Langelaan H. C., Pereira da Silva F., Thoden van Velzen U., Broeze J., Matser A. M., Vollebregt M. 2013. Sposoby na zrównoważane wytwarzanie żywności. *Wageningen UR Food & Biobased Res.*, PE 513.533, 1-9.
- Mahmood A., Usman S. 2010. A Comparative Study on the Physicochemical Parameters of Milk Samples Collected from Buffalo, Cow, Goat and Sheep of Gujrat. *Pakistan J. Nutr.*, 9(12): 1192-1197.
- Mehendra P., Dudhrejjiya P., Pinto S. 2017. Goat Milk Products and Their Significance. *Beberage and Food World*, 44(7): 21-25.
- Mituniewicz-Małek A., Ziarno M., Dmytrów I., Tuma P., Witczak A., Vovk S. 2017. Properties of Drinking Yogurt Obtained from Cow's and Goat's Organic Milk Fermented by Traditional Yogurt Cultures. *Polish Academy of Sciences, Cracow Branch*, 1755-1771.
- Pajor F., Galló O., Steiber O., Tasi J., Póti P. 2009. The Effect of Grazing on the Composition of Conjugated Linoleic Acid Isomers and Other Fatty Acids of Milk and Cheese in Goats. *J. Anim. Feed Sci.*, 18: 429-439.
- Pandya A. J., Ghodke K. M. 2007. Goat and Sheep Milk Products Other than Cheeses and Yoghurt. *Small Rumin. Res.*, 68: 193-206.
- Park Y. W. 2006. Goat Milk—chemistry and Nutrition. [w:] *Handbook of Milk of Non-bovine Mammals*. Blackwell Publishing Professional, Oxford, UK/Ames, Iowa, 34-58.
- Pastuszka R., Barłowska J., Litwińczuk Z. 2015. Walory odżywcze i prozdrowotne mleka koziego. *Med. Wet.*, 71(8): 480-485.
- Rozporządzenie (WE) nr 853/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29 kwietnia 2004 r.,
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1583971644185&uri=CELEX:32004R0853> (dostęp 12.03.2020 r.).
- Rozporządzenie (WE) nr 1441/2007 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 5 grudnia 2007 r. zmieniającego rozporządzenie (WE) nr 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych, <https://>

- eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?qid=1583971567688&uri=CELEX:32007R1441 (dostęp 12.03.2020 r.)
- Sikora J., Kawięcka A. 2015. Jakość produktu tradycyjnego z mleka koziego – sera podkarpackiego białego. *Wiad. Zootech.*, RLIII, 4: 10-15.
- Silankove N., Leitner G., Merin U., Prosser C. 2010. Recent Advances in Exploiting Goat's Milk: Quality, Safety and Production Aspects. *Small Rumin. Res.*, 10.1016: 1-15.
- Simopoulos A. P. 2002, The Importance of the Ratio of Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acids. *Biomed. Pharmacotherapy*, 56: 365-379.
- Soliman G. 2005. Comparison of Chemical and Mineral Content of Milk from Human, Cow, Buffalo, Camel and Goat in Egypt. *Egypt. J. Hosp. Med.*, 21: 116-130.
- Stanisławczyk R. 2017. Wartość odżywcza mleka koziego. Podkarpacki Ośrodek Doradztwa Rolniczego z siedzibą w Boguchwale, <https://www.podrb.pl/index.php/kozy/338-wartosc-odzywcz-mleka-koziego> (dostęp: 03.03.2020 r.).
- Webb B. H., Johnson A. H. 1965 *Fundamentals of Dairy Chemistry*. The AVI Publishing Co. Inc. Westport, Connecticut, s. 1-6.
- Wolanciuk A., Barłowska J., Pastuszka R., Topyła B. 2013. Podstawowy skład chemiczny i wybrane parametry tłuszczu mleka koziego z okresu żywienia letniego i jesienno-zimowego. *Roczniki Naukowe Pol. Tow. Zootech.*, 9(2): 63-70.
- Zeng S. S., Escobar E. N., Popham T. 1997. Daily Variations in Somatic Cell Count, Composition, and Production of Alpine Goat Milk. *Small Rumin. Res.*, 26: 253-260.
- Zucali M., Loverelli D., Celozzi S., Bacenetti J., Sandrucci A., Bava L. 2020. Management Options to Reduce the Environmental Impact of Dairy Goat Milk Production. *Livestock Sci.*, 231: 1-9.

ABSTRACT

CHARACTERISTICS OF GOAT'S MILK – FUNCTIONAL PROPERTIES AND POSSIBILITIES OF USE IN THE FOOD INDUSTRY

Goat's milk has become a popular raw material in the dairy industry in recent years. It is used to make cheese, yogurt and other products. It is considered to be more easily digestible comparing to cow's milk. Due to properties of goat's milk it is recommended for people who are allergic to some components of cow's milk.

The aim of the study is to review knowledge about the functional properties of goat milk, highlight its nutritional potential and indicate the advantages of development and commercialization of goat milk products on the market.

The composition of goat's milk may vary depending on the individual characteristics. Functional properties of goat milk products compete with cow's milk products, min. due to increased bioavailability of some ingredients. Obtaining better quality of products is possible due to the creation of small environmentally friendly farms. It is possible to produce dairy products from goat milk in a form well known to consumers, while offering more attractive functional features than in cow's milk products.

Słowa kluczowe: mleko kozie, produkty z mleka koziego

Keywords: goat milk, goat's milk products

Dane do kontaktu z autorem:

Martyna Rychta

E-mail: martyna.rychta@gmail.com

Joanna Więckowska

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauki o Żywności

Studenckie Koło Naukowe Towaroznawczej Oceny Sensorycznej

Opiekun naukowy: dr inż. Anna Gątorska

PREFERENCJE KONSUMENTÓW ODNOŚNIE DO SPOŻYCIA PIECZYWA

Wstęp

Produkty zbożowe są jednym z kluczowych elementów zbilansowej diety człowieka i zaleca się spożycie tej grupy wyrobów w ilości przynajmniej 5 porcji dziennie, ze wskazaniem szczególnie produktów pełnoziarnistych i niskoprzetworzonych typu kasza, brązowy ryż czy pieczywo żytnie (Jarosz 2019). Wyroby pełnoziarniste posiadają niższy indeks glikemiczny w porównaniu z produktami z mąki wysokoocyszczzonej (Gąsiewska 2018). Wyroby zbożowe mogą wykazywać wiele korzystnych oddziaływań na zdrowie. Stwierdzono, że regularne spożycie pieczywa razowego sprzyja zmniejszeniu wystąpienia chorób krążenia oraz wybranych chorób nowotworowych i chorób cywilizacyjnych (Wyka i in. 2015). Zalecenia Instytutu Żywności i Żywienia wskazują na pewne zależności między rodzajem spożywanej żywności a zdrowiem. Aby zapewnić prawidłowe funkcjonowanie organizmu należy sięgać po produkty, które dostarczają odpowiednią ilość energii i składników odżywczych (Pyrzyńska 2014). Produkty wysoko przetworzone są pozbawione znacznej części wartościowych składników, natomiast często zawierają wiele dodatkowych substancji w celu poprawienia atrakcyjności sensorycznej. Spożycie ich w nadmiarze może jednak doprowadzić do pojawienia się chorób cywilizacyjnych jak otyłość czy cukrzyca typu 2.

Podstawowym składnikiem w produkcji pieczywa jest mąka. Im wyższy jest typ mąki, tym mniejszy jest stopień jej przetworzenia. Jest to istotne ze względu na walory zdrowotne, gdyż pieczywo z takiego surowca zawiera więcej składników mineralnych między innymi witamin z grupy B oraz błonnika

pokarmowego. Pieczywo jest częstym produktem, po który sięgają konsumenci. Stanowi ono jedno z głównych źródeł węglowodanów złożonych, będących źródłem energii (Ceglińska 2017).

Producenci starając się spełnić wymagania i potrzeby konsumentów, a zarazem zachęcić ich do spożywania pieczywa poszerzając asortyment przez wprowadzenie na rynek pieczywa z różnorodnymi dodatkami, między innymi różnego rodzaju ziarnami, bakaliami, przetworzonymi warzywami lub owocami. Te dodatkowe składniki, niejednokrotnie będące bogatym źródłem substancji aktywnych biologicznie, zwiększającymi nie tylko walory sensoryczne, ale i żywieniowe pieczywa (Borowska i Rejman 2011).

Szeroki asortyment tej grupy produktów daje możliwość wyboru konsumentowi, którego potrzeby często ulegają zmianie w zależności od panujących trendów.

Istotnym elementem w celu osiągnięcia sukcesu przez każdego producenta jest przeprowadzanie badań preferencji konsumenckich. Mają one na celu zapoznanie się z potrzebami i wymaganiami konsumentów oraz określenie czynników wpływających na decyzje zakupowe. Potrzeby są jednak zróżnicowane pod względem profilu konsumenta, dlatego istotne jest ustalenie kryteriów demograficznych, społecznych czy ekonomicznych.

Ich dobór jest zależny od specyfiki badanego rynku (Woźny 2013). Pojawienie się nowych trendów związane jest z kryzysem gospodarczym. Stał się głównym powodem zmiany w poziomie i strukturze konsumpcji. Wywołał również zjawisko „nowego konsumeryzmu”, który polega na priorytetowym znaczeniu grupy konsumentów stawiających na rozważne podejmowanie decyzji zakupowych. Metody badań marketingowych nabierają coraz większego znaczenia. Odzwierciedlają one charakter współczesnego rynku badawczego, co związane jest z intensywnym wzrostem zaufania do badań przeprowadzonych on-line. Maleje natomiast wykorzystanie tradycyjnej metody PAPI (Papier & Pen Personal Interview). Przeprowadzanie badań za pomocą internetu jest ściśle związane z racjonalizacją kosztów i oszczędnością czasu realizacji badania oraz dotarcie do licznej populacji. Firmy coraz częściej odbiegają od zlecenia badań i wykorzystują informacje uzyskane za pomocą portali społecznościowych poprzez prowokację tematu na forum, jednak nie zawsze może to być zaufane i wiarygodne źródło wiedzy (Hall 2014).

Na przestrzeni ostatnich lat zauważyć można znaczny rozwój asortymentu produktów spożywczych, który odzwierciedla się poprzez szeroką gamę produktów dostępnych na półkach sklepowych. Producenci starają się tworzyć coraz więcej funkcjonalnych, łatwych w przygotowaniu produktów. Ich popularność znacznie wzmagają reklamy w mediach społecznościowych oraz informacje dostępne na różnego rodzaju stronach internetowych.

Aktualnie, coraz bardziej popularne są diety eliminacyjne, jak na przykład dieta bezglutenowa. Na potrzeby takich klientów, producenci stworzyli pieczywo specjalne, które eliminuje surowce z białkiem-glutenu. Konsumenti stają się coraz bardziej świadomi swoich wyborów. Przejawia się to zapoznawaniem się ze składem wyrobów, również tych zbożowych, a w szczególności z występowaniem substancji dodatkowych, co do których producenci mają obowiązek umieszczania informacji (Żakowska-Biemans 2018).

Oznakowanie żywności powinno być dokładne oraz kompletne, czego wymagają przepisy prawne. W większości krajów ustanowiono przepisy, które dokładnie określają, jakie informacje muszą znajdować się na etykiecie. Pomimo uregulowań prawnych, zdarzają się jeszcze zafałszowania wyrobów. Wykrycie takiego działania jest trudne przez konsumenta zmysłami sensorycznymi, jednak wyznaczono specjalne jednostki, które mają za zadanie przeprowadzenie odpowiednich działań w celu określenia jakości produktu. Rozwój technik analitycznych pozwolił na określenie nawet niewielkich ilości niepożądanych substancji, które zostały dodane do wyrobu, natomiast nie zostały ich nazwy umieszczone na etykiecie.

Żywność występująca na rynku nie zawsze, a nawet często jest nie najwyższej jakości.

Takiego typu wyroby są zazwyczaj pozbawione cennych substancji odżywczych oraz właściwości prozdrowotnych. Istnieje również zagrożenie dla zdrowia ze względu na występowanie substancji niedozwolonych, które mogą wywołać u konsumentów reakcje alergenne (Makała 2013). Nadwrażliwość układu immunologicznego organizmu obserwuje się nietypowo. Jest zależna od czynnika wywołującego reakcję i ma różne mechanizmy przebiegu. Objawiać się może bezpośrednio (typ I), gdzie reakcja następuje natychmiastowo. Efekt jest zauważalny bardzo szybko, a w przypadku braku informacji odnośnie do występowania substancji wywołującej reakcję alergenną, może doprowadzić do wstrząsu anafilaktycznego. Reakcja może również występować po pewnym czasie od spożycia produktu. Są one jednak uwarunkowane czynnikami genetycznymi, środowiskowymi lub też mogą ze sobą współdziałać (Jędrychowski 2001).

Jedną z najbardziej wpływowych grup konsumentów, która jest silnie powiązana z rozwojem działań marketingowych są osoby młode. Ta grupa konsumentów jest wyjątkowo zróżnicowana, ze względu na różnorodność poglądów. Można zauważyć pewne preferencje wśród tych konsumentów są bardziej wrażliwi na nowości, luksusowe marki oraz jakość produktów. Korzystają również z internetu w życiu codziennym, co wykorzystują producenci. Coraz częściej zauważa się transformację stylu życia oraz postaw, zmiany systemów wartości

i gustu. Spowodowane to jest stopniem zamożności polskiego społeczeństwa, ale również zwiększoną podatnością na wpływ wzorców zachowań osób pochodzących z krajów wysokorozwiniętych. Wszystkie te wyróżniki grupy konsumentów są bardzo istotne na niektórych rynkach branżowych (Woźny 2013).

Cel pracy

Celem pracy jest określenie preferencji i zachowań konsumentów odnośnie do struktury spożycia pieczywa, ze szczególnym uwzględnieniem rodzaju pieczywa, częstotliwości spożycia, miejsca zakupu oraz czynników wpływających na decyzje zakupowe tej grupy produktów i źródła wiedzy z zakresu żywienia.

Materialy i metody

Badania przeprowadzono w styczniu 2020 roku z wykorzystaniem kwestionariusza wywiadu wśród 300 studentów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Dobór ankietowanych był dogodny, kwestionariusz był anonimowy i przeprowadzono go w formie formularza internetowego.

Kwestionariusz wywiadu obejmował pytania jednokrotnego oraz wielokrotnego wyboru. Pierwszą część badania stanowiły pytania metryczkowe dotyczące płci, kierunku i roku studiów. Kolejna część obejmowała zagadnienia dotyczące preferencji konsumentów odnośnie do rodzaju, częstotliwości, czynników wyboru, miejsca zakupu spożywanego pieczywa oraz źródła informacji żywieniowych. Istotność poszczególnych czynników przy wyborze pieczywa respondenci określali za pomocą skali 5-punktowej, gdzie 1 punkt oznaczał cechę zupełnie nieistotną, natomiast 5 punktów – zdecydowanie istotną. Wśród tych czynników uwzględniono: wygląd zewnętrzny, gramaturę, cenę, formę oraz możliwość zakupu produktu pokrojonego, walory smakowe, walory zdrowotne, zawartość dodatków oraz przyzwyczajenie.

Omówienie wyników

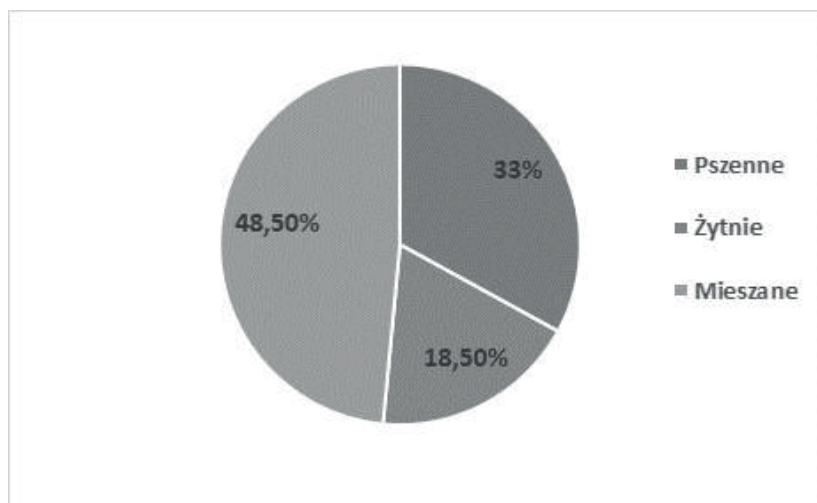
Spśród 300 ankietowanych studentów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie zdecydowana większość deklarowała spożywanie pieczywa, a jedynie 8 osób wskazało, że nie spożywa pieczywa, stanowili oni niecałe 3% wszystkich ankietowanych. Dalszą analizę wyników odnoszono tylko do osób deklarujących spożywanie pieczywa (292 osób). W tej grupie respondentów kobiety stanowiły zdecydowaną większość – 74%. Respondenci byli studentami różnych wydziałów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie.

Wśród ankietowanych byli studenci od I do V roku studiów. Najlicniejszą grupę – 31% – stanowiły osoby z II roku studiów. Respondenci z III i IV roku stanowili odpowiednio: 18 i 19%. Najmniej liczną grupą byli studenci I i V roku, stanowili po 16% ankietowanych.

Analizując preferencje studentów odnośnie do rodzaju spożywanego pieczywa stwierdza się, że połowa z nich najczęściej spożywała pieczywo mieszane, mniejszy procent ankietowanych preferowała pieczywo pszenne (33%), natomiast tylko 18,5% deklarowała najczęściej wybór pieczywa żytniego (Wyk. 1). To zróżnicowanie występowało wśród respondentów ze wszystkich wydziałów, co nie różnicuje ich znacznie w zależności od kierunku studiów.

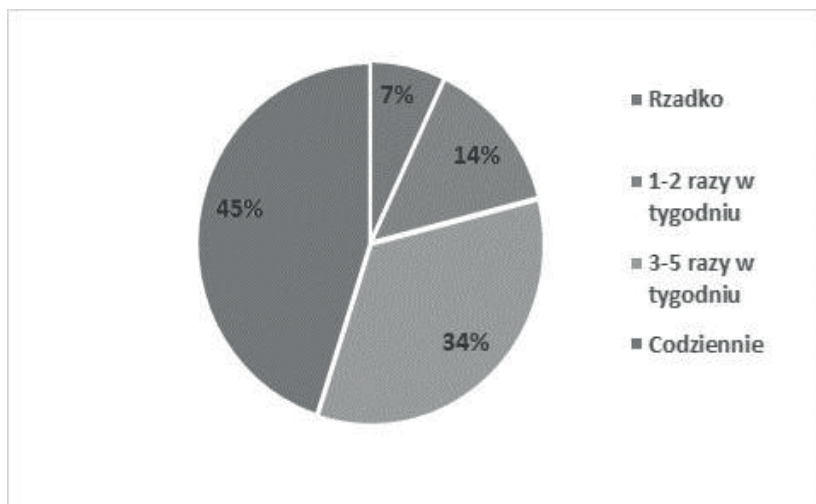
Chociaż badania Głównego Urzędu Statystycznego w ostatnich latach wskazują, że tendencja spożycia wyrobów zbożowych ciągle maleje (Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej 2019), przeprowadzone badania wskazują, że znaczna część ankietowanych (45%) spożywała pieczywo codziennie. Są to dane zbliżone do wcześniejszych wyników badań Ciecierskiej i in. (2018), gdzie prawie połowa ankietowanych (50%) zadeklarowała występowanie pieczywa w codziennej diecie. Natomiast znaczna część respondentów – 34% – oświadczyła, że spożywa pieczywo też dość często 3–5 razy w tygodniu. Znacznie mniej jest studentów, którzy spożywają pieczywo co najwyżej 1–2 razy w tygodniu, a 7% wręcz rzadko sięga po pieczywo (Wyk. 2). Tę ostatnią

Wyk. 1. Rodzaj pieczywa najczęściej spożywanego przez respondentów.



Źródło: Opracowanie własne

Wyk. 2. Częstotliwość spożycia pieczywa przez respondentów.



Źródło: Opracowanie własne

grupę najliczniej stanowią studenci Wydziału Nauki o Żywności, z których połowa jest studentami IV roku.

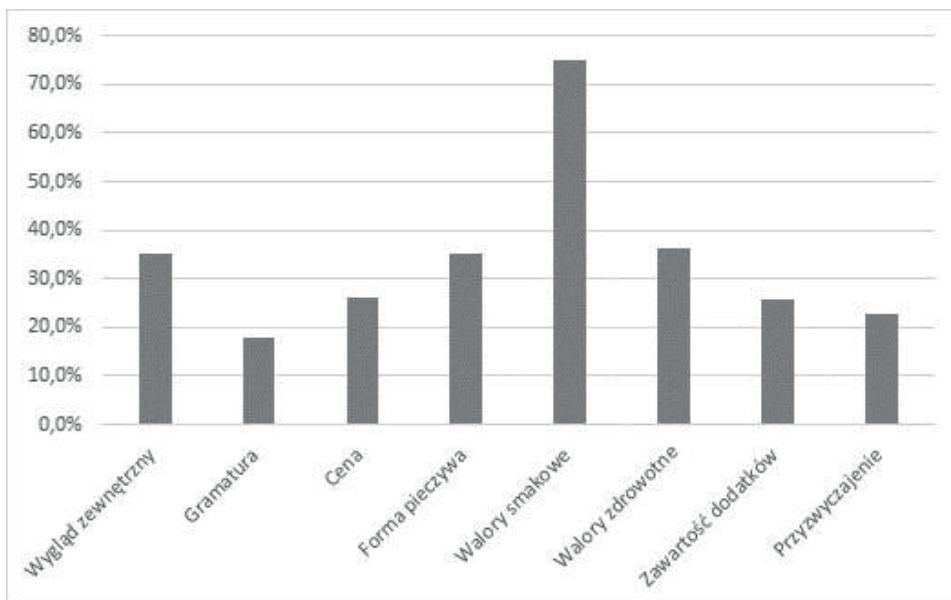
Respondenci określili również ważności różnych czynników przy wyborze pieczywa, co określono w skali 5-punktowej. Uzyskane wyniki wskazują, że aż dla 75% ankietowanych spożywających pieczywo zdecydowanie istotnym czynnikiem wyboru (wskazania na poziomie 5 w skali pięciostopniowej) tej grupy produktów były walory smakowe. W opinii około 35% respondentów jako równie ważne wyróżniki wskazano: walory zdrowotne, wygląd zewnętrzny oraz formę pieczywa (Wyk. 3a). Inne czynniki wyboru, takie jak: zawartość dodatków, przyzwyczajenia, cena, gramatura są równie istotne tylko w opinii około 20% ankietowanych.

Istotność poszczególnych czynników przy wyborze pieczywa na poziomie 4 (w skali 5-punktowej) kształtowała się odmiennie (Wyk. 3b). Najwięcej osób przypisało ten poziom ważności takim wyróżnikom jak: wygląd zewnętrzny, zawartość dodatków, cena, przyzwyczajenie. Taką opinię wyraziło około 40% studentów. Pozostałe cechy były równie istotne dla znacznie mniejszego odsetka respondentów.

Uzyskane wyniki wskazują również, że dla około 30% ankietowanych wskazane powyżej czynniki nie odgrywają bardzo istotnej roli – ocena na skali istotności na poziomie 3 (Wyk. 3c).

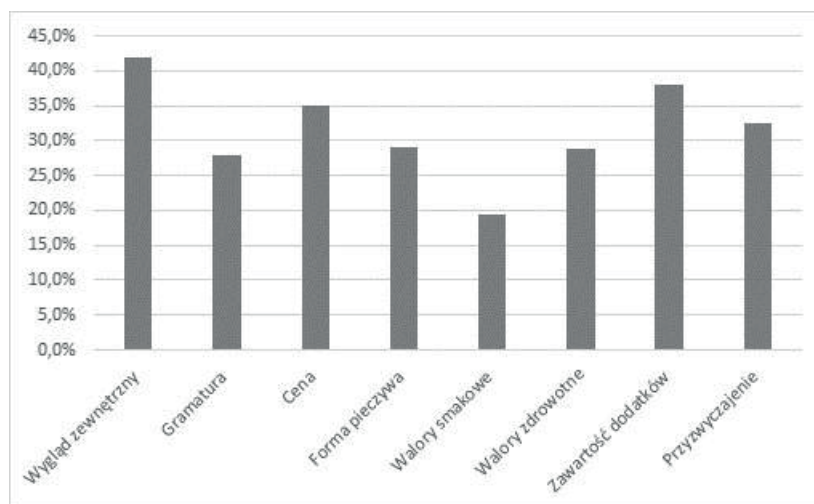
Ankietowani mieli również możliwość oceny wyróżnika na poziomie 2 jako nieistotny (Wyk. 3d). W opinii 12% respondentów gramatura jest dominującym

Wyk. 3a. Istotność czynników przy wyborze pieczywa – na poziomie 5 punktów.



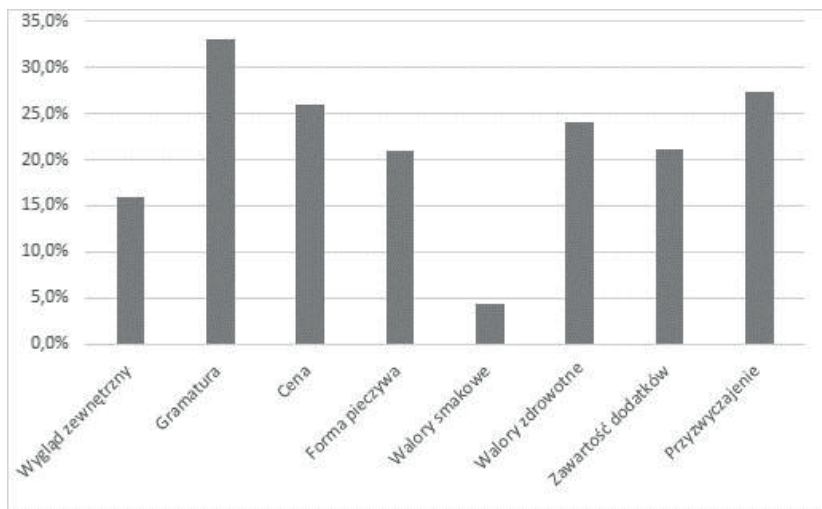
Źródło: Opracowanie własne

Wyk. 3b. Istotność czynników przy wyborze pieczywa – na poziomie 4 punktów.



Źródło: Opracowanie własne

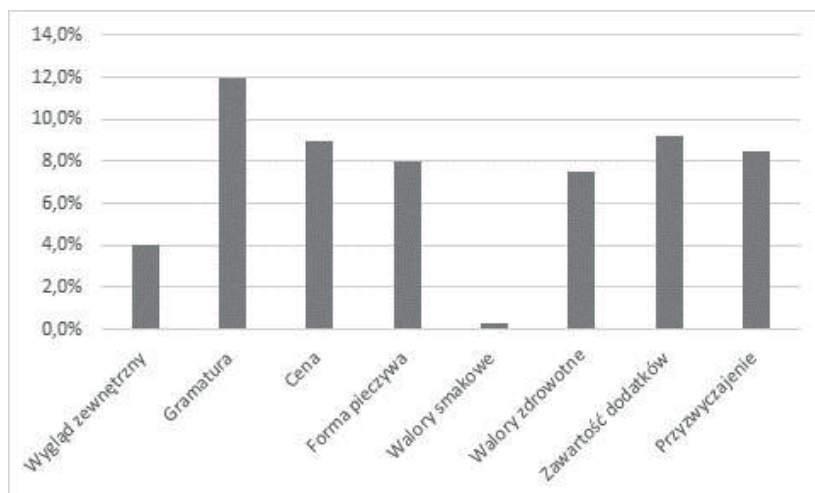
Wyk. 3c. Istotność czynników przy wyborze pieczywa – na poziomie 3 punktów.



Źródło: Opracowanie własne

wyróżnikiem mającym najwięcej wskazań. Kolejno, w skali 5-punktowej ankietowani ocenili zawartość dodatków, cenę, przyzwyczajenie, formę pieczywa oraz walory zdrowotne odpowiednio w procentach: 9,2; 9,0; 8,5; 8,0; 7,5. Najmniejszą ilość wskazań zauważyć można dla wyglądu zewnętrznego (4%), jak i dla walorów smakowych (0,3%), stanowiących niewielki odsetek ocen.

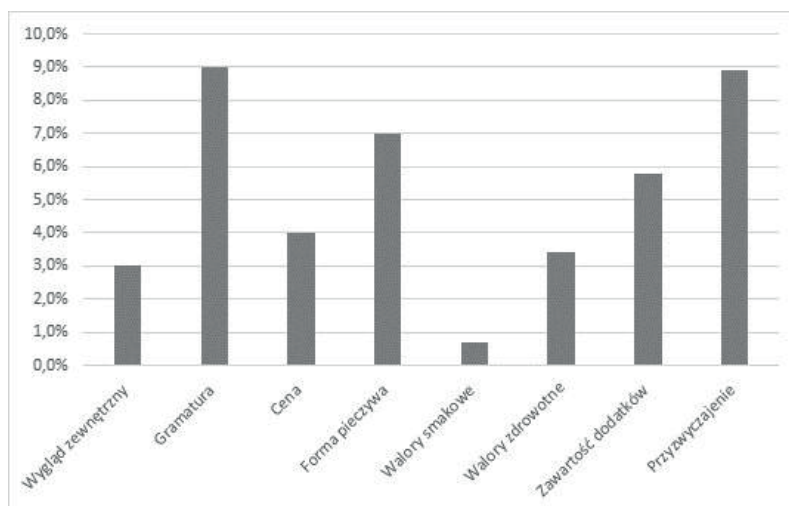
Wyk. 3d. Istotność czynników przy wyborze pieczywa – na poziomie 2 punktów.



Źródło: Opracowanie własne

Jako zupełnie nieistotne czynniki wpływające na decyzje zakupowe najczęściej wskazywano gramaturę i formę pieczywa oraz przyzwyczajenia (Wyk. 3e). Takie opinie wyraziło po około 10% respondentów. W przypadku innych czynników wyboru tej grupy produktów niewiele osób wskazało na ich nieistotność, co jest dowodem ich ważności przy zakupie.

Wyk. 3e. Istotność czynników przy wyborze pieczywa – na poziomie 3 punktów.

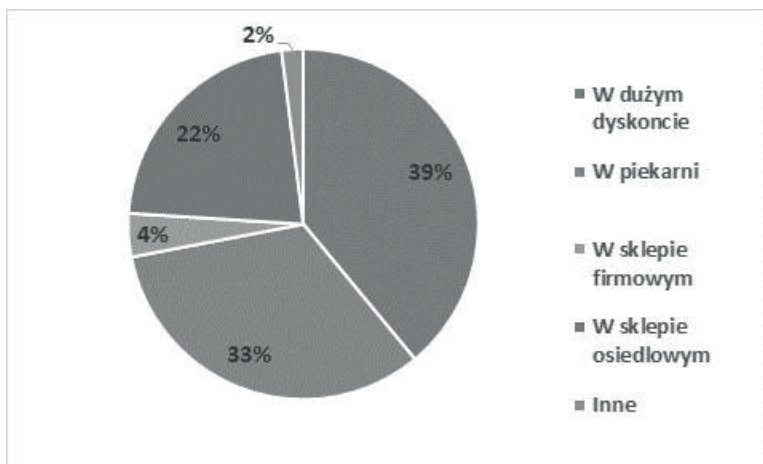


Źródło: Opracowanie własne

Ankietowani zostali zapytani również o miejsce, w jakim najczęściej kupują pieczywo (Wyk. 4). Najwięcej respondentów wskazało duży dyskont i piekarnie jako punkty nabycia tego typu produktów, odpowiednio 39% i 33% ankietowanych. Mniejsza grupa (22%) decyduje się na zakup pieczywa w sklepach osiedlowych. Natomiast zaledwie kilka procent ankietowanych wskazało sklep firmowy (4%) lub inny punkt (2%) jako miejsce nabycia pieczywa, w tym samodzielny wypiek w domu. Obecnie można zauważyć zróżnicowaną jakość pieczywa na rynku, a szczególnie porównując te sprzedawane w dyskoncie z oferowanym w tradycyjnej piekarni. Duże sieci handlowe często wypiekają wyroby mrożone, które posiadają wiele substancji polepszających smak oraz nadających odpowiednie cechy sensoryczne. W piekarniach natomiast często stosowane są tradycyjne receptury, tworząc świeże rozczyny oraz masy, które są poddane jedynie obróbce cieplnej. Poza tym odnośnie do tej ostatniej grupy produktów, istnieje możliwość zasięgnięcia informacji od producenta o składzie, czy też zastosowanej technologii wytwarzania. Wiele z nich reklamuje również swoje produkty na stronie internetowej. Tam również konsument ma możliwość

zapoznania się z ofertą produktową oraz ze składem każdego z nich. Zwiększa to możliwość wyboru pieczywa o korzystniejszych walorach zdrowotnych (Gąsiewska 2019).

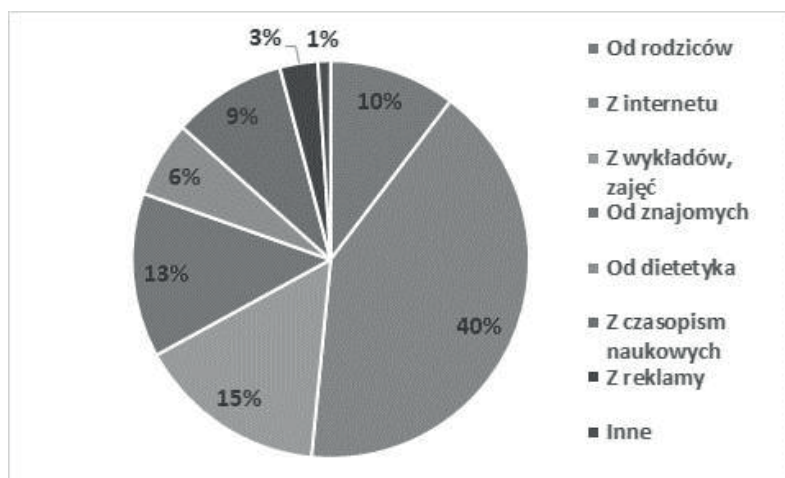
Wyk. 4. Miejsca, w których respondenci najczęściej kupują pieczywo.



Źródło: Opracowanie własne

Na podstawie badań wykazano, że głównym źródłem wiedzy studentów z zakresu żywienia są informacje zamieszczone w internecie, tak deklarowało 40% respondentów (Wyk. 5).

Wyk. 5. Źródła informacji na temat żywienia, z których korzystają anketowani.



Źródło: Opracowanie własne

Innym źródłem informacji żywieniowych dla pewnej grupy studentów były wykłady i informacje uzyskane od znajomych, odpowiednio dla 15% i 13% ankietowanych. Wśród nich najliczniejszą grupą studentów, korzystających z wiedzy uzyskanej na wykładach okazali się uczęszczający na Wydział Nauki o Żywności. Należy również wskazać, że jedynie w przypadku około 10% respondentów rodzice byli głównym źródłem wiedzy w zakresie żywienia, i podobny odsetek ankietowanych wskazuje czasopisma naukowe (9%). Korzystanie z wiedzy dietetyka w tym zakresie deklaruje jedynie około 6% respondentów. Znaczna część studentów z Wydziału Nauki o Żywności wskazywała na czasopisma oraz wykłady jako główne źródło wiedzy na temat żywienia.

Podsumowanie

1. Zdecydowana większość respondentów Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego spożywała pieczywo.
2. Około połowa respondentów najczęściej spożywała pieczywo mieszane, znacznie mniej osób sięgała po pieczywo pszenne, a tylko niespełna co piąty ankietowany regularnie sięgał po pieczywo żytnie.
3. Wśród respondentów najbardziej istotnymi wyróżnikami przy wyborze pieczywa były walory zdrowotne i smakowe; zupełnie nieistotnymi natomiast gramatura, przyzwyczajenie oraz forma dostępności pieczywa w sklepie.
4. Głównym miejscem zakupu pieczywa wśród studentów były duże dyskonty. Drugim, najczęściej wybieranym miejscem zakupu są piekarnie.
5. Dla zdecydowanej większości ankietowanych głównym źródłem wiedzy na temat żywienia był internet.

Literatura:

- Borowska A., Rejman K. 2011. Spożycie pieczywa i preferencje konsumentów wobec innowacyjności produktowej branży piekarskiej, *Studies & Proceedings of Polish Association for Knowledge Management*, 52: 309-322.
- Ceglińska A. 2017. Znaczenie pieczywa w codziennym życiu człowieka. *Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Zeszyty Naukowe*, 54(3): 30-37.
- Gąsiewska P. 2018. Czy pieczywo pszenne ma więcej kalorii niż żytnie? *ABC Żywienia/Fakty i mity, Narodowe Centrum Edukacji Żywieniowej IŻŻ*.

- Gąsiewska P. 2019. Czy nie jeść pieczywa na diecie odchudzającej? ABC Żywienia/ Fakty i mity, Narodowe Centrum Edukacji Żywnościowej IŻŻ.
- Hall H. 2014. Nowy konsument a zmiany w metodach jego badania. *Prace Naukowe Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu*, 336: 163-173.
- Jarosz M. 2019. Piramida Zdrowego Żywienia i Stylu Życia Dzieci i Młodzieży. ABC Żywienia/Zasady zdrowego żywienia, Narodowe Centrum Edukacji Żywnościowej IŻŻ.
- Jędrzychowski L. 2001. Alergeny pokarmowe jako czynniki ryzyka zdrowotnego. *Żywność Nauka Technologia Jakość. Suplement*, 4: 29.
- Makała H. 2013. Fałszowanie produktów spożywczych – zagrożenia związane z tym zjawiskiem i sposoby ich identyfikacji przedstawione na przykładzie mięsa i produkowanych z niego wyrobów. *Postępy Nauki i Technologii Przemysłu Rolno Spożywczego*, 68(4).
- Pyrzyńska E. 2014. Zalecenia żywieniowe i formy ich upowszechniania. *Zeszyty Naukowe, Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie*, 3(927): 75-86.
- Rocznik Statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej 2019.
- Woźny D. 2013. Analiza kategorii młodych konsumentów z uwzględnieniem różnych kryteriów jej wyodrębniania. *Wyższa Szkoła Zarządzania i Bankowości w Krakowie*.
- Żakowska-Biemans S., Sajdakowska M., Jeżewska-Zychowicz M. 2018. Konsumenty wobec zmian na rynku pieczywa: ich zróżnicowanie i uwarunkowania wyboru. *Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Handel Wewnętrzny*, 3(374): 424-437.

ABSTRACT

CONSUMER PREFERENCES REGARDING CONSUMPTION OF BREAD

Food producers, in order to stay on the market, endeavor not only to offer the best food, but also take a lot of marketing activities, including market research. Such studies give the producer a specific advantage over their competitors and allow to define marketing strategies that will reach the client. According to the nutrition pyramid, cereal products should make a large participation in a balanced diet. Statistical data from the Central Statistical Office of Poland (GUS) indicate, however, that the consumption of bread has been decreasing in recent years. This is a worrisome signal for producers in this branch.

The study analyzes the structure of bread consumption among students of the University of Warmia and Mazury in Olsztyn. The research tool was an interview questionnaire

covering questions regarding consumption preferences of this product group. The research aims to indicate, among others: preferences regarding bread consumption and what students follow when buying.

Słowa kluczowe: preferencje konsumenckie, badania konsumenckie, pieczywo, spożycie

Keywords: consumer preferences, consumer research, bread, consumption

Dane do kontaktu z autorem:

Joanna Więckowska

E-mail: aska.wieckowska1@gmail.com

Marcelina Wilczak

Uniwersytet Morski w Gdyni

Wydział Przedsiębiorczości i Towaroznawstwa

Naukowe Koło Towaroznawstwa „CARGO”

Opiekun: dr hab. inż. Przemysław Dmowski

Opiekun naukowy: dr inż. Jadwiga Stankiewicz

CHARAKTERYSTYKA PRODUKTÓW NISKO PRZETWORZONYCH NA PRZYKŁADZIE JOGURTÓW NATURALNYCH. PORÓWNANIE POLSKIEGO I CHORWACKIEGO RYNKU JOGURTÓW NATURALNYCH.

Wstęp

Na rynku spożywczym zaobserwowano nowy trend, zgodnie z którym producenci żywności coraz częściej dążą do tego, aby na etykietach zamieszczać zrozumiałe dla konsumenta treści oraz ograniczać do minimum lub jeśli to możliwe całkowicie eliminować stosowanie substancji dodatkowych podczas produkcji żywności. Wyroby te określone zostały mianem „produktów nisko-przetworzonych”.

Pod terminem „żywność minimalnie przetworzona” rozumie się takie wyroby, które otrzymywane są niskoenergetycznymi metodami, zachowującymi naturalne właściwości wyjściowego surowca (Nowicka i in. 2014). Istotą produkcji żywności nisko- lub minimalnie przetworzonej jest otrzymanie produktów, które składem chemicznym oraz cechami sensorycznymi jak najbardziej zbliżone są do surowców wyjściowych (Nowicka i in. 2014). Pierwsze informacje na temat żywności nisko przetworzonej pojawiły się w połowie lat 80. XX wieku w Stanach Zjednoczonych, gdzie roczny obrót tego typu produktami na początku XXI wieku wynosił już około 25 mld dolarów (Reagert i in. 2007).

Konsumenci zaczęli wykazywać zainteresowanie tymi produktami w wyniku intensywnego promowania w ostatnim dziesięcioleciu tzw. zdrowego trybu życia. Przejawia się on poprzez zmianę nawyków żywieniowych czy zwięk-

szenie aktywności fizycznej. Nadmierne spożywanie żywności, niewłaściwie zbilansowana dieta czy niedobory żywieniowe potencjalnie mogą mieć wpływ na rozwój przewlekłych chorób niezakaźnych, tzw. chorób cywilizacyjnych. Wynikiem tych zmian jest poszukiwanie przez konsumenta na rynku produktów o dużej wartości żywieniowej, bez obecności substancji dodatkowych, których skład oraz cechy sensoryczne są zbliżone do surowców wyjściowych.

Według ujednoliconej definicji opracowanej przez Światową Organizację Zdrowia (FAO/WHO) oraz Międzynarodową Federację Mleczarską (IDF/FIL) mleczne napoje fermentowane, do których zalicza się między innymi jogurty, to „produkty otrzymane z mleka pełnego, częściowo lub całkowicie odtluszczonego, zagęszczonego lub regenerowanego w proszku, poddanego fermentacji przez specyficzne mikroorganizmy, które fermentując laktozę, obniżają pH mleka i powodują jego koagulację. Mikroflora ta musi pozostać żywa, aktywna i liczna w produkcie finalnym aż do ostatniego dnia przydatności do spożycia”. W procesie produkcji wykorzystywana jest mikroflora mezofilna, termofilna (pochodzenia jelitowego) i mieszana.

Mleko charakteryzujące się dużą zawartością wody oraz możliwość jego zanieczyszczenia podczas udoju, zaliczane jest do produktów nietrwałych. Dlatego istotne jest jego jak najszybsze schłodzenie po etapie udoju. Aby podwyższyć jego trwałość stosuje się szereg zabiegów dodatkowych jak na przykład baktofugacja, paskalizacja, homogenizacja, pakowanie za pomocą właściwie dobranych systemów przemysłowych, czy oczyszczanie na membranach. W takich produktach jak jogurt łagodne przetworzenie rozumie się poprzez wykorzystanie fermentacji mlekowej jako utrwalenia biologicznego (Barska 2018). Aby otrzymać bezpieczną żywność, która jest minimalnie przetworzona, obowiązkiem producenta jest przestrzeganie określonych zasad w łańcuchu produkcji. Spełnienie tych wymagań pozwala na eliminację zagrożeń chemicznych, czy mikrobiologicznych w finalnym produkcie, co gwarantuje tym samym stabilność mikrobiologiczną, a także zachowanie ich właściwych cech sensorycznych (Barska 2018).

Cel pracy

Głównym celem pracy jest analiza rynku produktów niskopretworzonych na przykładzie rynku jogurtów naturalnych, wyciągnięcie wniosków z otrzymanych wyników oraz ich interpretacja.

Główny cel pracy zrealizowany został poprzez następujące cele szczegółowe:

- Przedstawienie koncepcji rynku produktów niskopretworzonych w świetle prawa i literatury przedmiotu.

- Przeprowadzenie analizy porównawczej polskiego i chorwackiego rynku jogurtów naturalnych.
- Ustalenie podobieństw i różnic między badanymi przedmiotami.

Materiały i metody

W zakresie gromadzenia materiału badawczego korzystano z literatury przedmiotu, artykułów, norm i aktów prawnych, danych statystycznych, a także wiedzy własnej.

Materiałem badawczym do realizacji pracy była analiza porównawcza rynku produktów niskoprzetworzonych w Polsce i Chorwacji, którą wykonano na podstawie analizy asortymentu jogurtów naturalnych w wybranych punktach sprzedaży w obu krajach. Obserwację wykonano w celu wykazania różnic pomiędzy dostępnością jogurtów naturalnych w obu krajach. Przedstawiono informacje na temat etykietowania, składów, cen detalicznych, różnorodności asortymentu, a także zróżnicowania dostępnych opakowań i gramatur jogurtów. Wyniki badań przedstawione zostały w formie tabelarycznej i opisowej.

W toku badania przyjęto następujące hipotezy badawcze:

1. Rynek produktów niskoprzetworzonych nie jest uregulowany prawnie.
2. Zachowania konsumenta istotnie wpływają na kształtowanie rynku produktów niskoprzetworzonych, w tym rynku jogurtów naturalnych.
3. Asortyment na rynku jogurtów naturalnych w Polsce jest bardziej różnorodny i charakteryzuje się wyższymi cenami w porównaniu z asortymentem na rynku chorwackim.
4. Jogurty naturalne dostępne na rynku chorwackim cechują się czystsza etykietą w porównaniu z jogurtami naturalnymi obecnymi na rynku polskim.

Wyniki badań

Europejski rynek jogurtów jest bardzo konkurencyjny. Wiodący producenci w Europie (Danone, Nestlé, Parmalat, Yakult, Chobani, Yoplait, Arla Foods, Müller i FrieslandCampina), koncentrują się na dostarczaniu konsumentom innowacyjnych i wygodnych produktów, przy jednoczesnym uwzględnieniu korzyści funkcjonalnych w każdym z wyrobów. W danych kategoriach produktowych można zauważyć występowanie dywersyfikacji poziomej asortymentu, która objawia się stałym rozszerzaniem oferty oraz wdrażaniem odmiennych od dotychczas stosowanych metod produkcji czy promocji. Dzięki temu producenci mają możliwość lepszego dostosowania produktów do potrzeb konsumentów bez konieczności podejmowania wysokiego ryzyka. Ze względu na

istotne znaczenie czynników konsumenckich warunkujących spożycie produktów mlecznych określany jest on mianem rynku konsumpcyjnego produktów podstawowych. Przyniesione elementy czynią z sektora mleczarskiego rynek stabilny (Chudzian 2011).

Wiodącym kanałem sprzedaży w skali globalnej są hipermarkety i supermarkety, które odpowiadają za połowę sprzedaży w całej kategorii produktowej. Jedną trzecią sprzedaży stanowią jogurty pitne. Jogurty naturalne o gęstej konsystencji coraz częściej w diecie wypierają majonez, śmietanę czy tłusty twaróg. Uważa się, że te typy jogurtów mają najwyższy potencjał wzrostu (<https://www.forummleczarskie.pl/NEWS/6620/> dostęp: 04.01.2020).

Polska stała się istotnym producentem mleka i jego przetworów na rynku wspólnotowym. Obecnie jest 6. co do wielkości producentem mleka w Unii Europejskiej. Mleko stanowi jeden z najważniejszych produktów rolniczych i posiada ono najwyższy udział w towarowej produkcji rolnej kraju. Polskie przetwórstwo mleczarskie, pod względem cen, należy do jednego z najbardziej konkurencyjnych sektorów na rynku UE. Źródłem tej przewagi nad innymi krajami członkowskimi jest niższe wynagrodzenie za pracę w przetwórstwie i rolnictwie, niż w rozwiniętych krajach UE (Judzińska 2015).

Liderami rynkowymi sprzedaży jogurtów w Polsce są Zott Polska, Danone i Bakoma, którzy kontrolują ponad 70% krajowego rynku jogurtów. Wysoka sprzedaż jest utrzymywana między innymi przy pomocy ogromnych nakładów marketingowych (Euromonitor Report 2019).

Istotnym trendem kształtującym rynek jogurtów naturalnych w Polsce jest wzrost świadomości i zainteresowania konsumentów na temat GMO (organizmów zmodyfikowanych genetycznie). Narasta również presja społeczna, aby producenci jednoznacznie wskazywali, które produkty mleczne nie zawierają GMO. Zjawisko to doprowadziło do decyzji Polskiej Izby Mleka o ustanowieniu standardu, który pozwoli mleczarniom uzyskać certyfikat potwierdzający, że mleko, z którego wytwarzają oni swoje produkty jest produkowane „bez GMO” (Ruciński 2018).

Otrzymanie statusu członkowskiego Unii Europejskiej w 2013 roku silnie wpłynęło na rentowność przemysłu mleczarskiego Chorwacji. Jej rolnictwo jest raczej niewielkie, a przeciętne stado bydła mlecznego wynosi zaledwie 6 krów na gospodarstwo (Muminović i in. 2012).

Struktura rynku mleczarskiego w Chorwacji pokazuje, że jest on bardzo skoncentrowany – trzech liderzy rynkowi Dukat, Vindija i Belje posiadali łączny udział w rynku w wysokości 82% w 2017 roku. Dla porównania ich łączny udział w rynku w 2016 roku wynosił 79%. Koncentracja tego rynku wyraźnie rośnie pomimo pewnych zmian w powiązaniach strukturalnych między przedsię-

biorstwami mleczarskimi (<http://www.aztn.hr/ea/wp-content/uploads/2016/10/Prikaz-stanja-na-trzistu-mljeka-i-mlijecnih-proizvoda-u-RH-u-2017..pdf>, dostęp: 04.01.2020).

Produktami objętymi obserwacją były jogurty naturalne z mleka krowiego dostępne w dwóch marketach sieciowych (Kaufland, Lidl) oraz w prywatnych sklepach spożywczych w Polsce i Chorwacji.

Asortyment jogurtów naturalnych w analizowanych polskich punktach sprzedaży był znacznie uboższy w porównaniu z asortymentem chorwackich sklepów (Tab. 1). Najbardziej różnorodną gamą produktów wyróżniał się Kaufland w obu krajach, która wynosiła 50 pozycji w chorwackim Kauflandzie i 30 pozycji w polskim Kauflandzie. Lidl w swojej ofercie posiadał w Polsce 10 pozycji, a w Chorwacji 15 pozycji. Obserwacja asortymentu w prywatnych sklepach spożywczych wykazała, że punkty te oferują najmniej różnorodne produkty – w Polsce 7 pozycji, a w Chorwacji 13 pozycji. Niemniej zaobserwowano, że chorwacki prywatny sklep spożywczy ma bogatszą ofertę produktów w porównaniu z polskim Lidlem (Tab. 1).

Analizując ofertę marek jogurtów naturalnych, w polskich sklepach występuje zróżnicowana struktura producentów – obecni są zarówno polscy wytwórcy jak na przykład Bakoma, Mlekovita, Łowicz, oraz europejscy liderzy Danone, Zott. W chorwackich punktach sprzedaży struktura ta jest jednorodna – nie zaobserwowano występowania europejskich marek komercyjnych jak Danone czy Zott (Tab. 1).

W każdym z badanych punktów sprzedaży dominują najwięksi chorwaccy producenci jak Dukat, Vindija Quality z marką Z' Bregov i Meggle. Dodatkowo w Kauflandzie, oprócz własnych marek dyskontowych zaobserwowano występowanie produktów serbskiego producenta Imlek oraz słoweńskiego Alpsko. Zarówno w chorwackim, jak i polskim Lidlu zróżnicowanie to było najmniejsze. Polski Lidl oferuje produkty trzech marek (w tym jedna marka własna) – Zott, Danone i Pilos, a chorwacki dwóch marek – Dukat i Pilos. W polskim prywatnym sklepie występowały produkty następujących marek: Zott, Danone, Bakoma i Maluta, a w chorwackim sklepie: Meggle, Z' Bregov oraz Dukat. W obu krajach występują także wyroby dyskontowych marek własnych jak K-Classic, K-BIO (Kaufland), czy Pilos będący marką koncernu Lidl (Tab. 1).

W badanych polskich punktach sprzedaży występuje szeroki wybór jogurtów bez laktozy, w Chorwacji nie zaobserwowano występowania jogurtów bez laktozy w analizowanych sklepach. Natomiast w każdym z nich, bez względu na kraj, obecny jest przynajmniej jeden rodzaj jogurtu „BIO” oznaczony „Eko liściem” reprezentującym certyfikat rolnictwa ekologicznego (Tab. 1).

Tab. 1. Porównanie asortymentu jogurtów naturalnych w wybranych punktach sprzedaży w Polsce i Chorwacji.

Punkt sprzedaży	Asortyment jogurtów naturalnych		Oferowane marki jogurtów naturalnych		Ogólna liczba pozycji jogurtów naturalnych w danym sklepie	
	Polska	Chorwacja	Polska	Chorwacja	Polska	Chorwacja
Kaufland	klasyczny (pitny i gęsty); light; bez laktozy; BIO; typu greckiego; typu bałkańskiego; probiotyczny	klasyczny (pitny i gęsty); light; BIO; wysokobiałkowy; probiotyczny; typu islandzkiego „Skyr”	Zott; Mlekovića; Łowicz; Bakoma; Danone; Piątница; Jovi; Maluta; Lapol; Kri Kri; K-Classic; K-BIO;	Z' Bregov; Meggle; Euromilk; Dukat; Alpsko; Imlek K-classic;	30	50
Lidl	klasyczny (pitny i gęsty); light; bez laktozy; BIO; typu greckiego; typu tureckiego „Ayran”; probiotyczny	klasyczny (pitny i gęsty); light; BIO; wysokobiałkowy; probiotyczny; typu islandzkiego „Skyr”	Zott; Danone; Pilos	Dukat; Pilos;	10	15
Prywatny sklep spożywczy	Klasyczny (gęsty); bez laktozy; BIO; typu bałkańskiego	klasyczny (pitny i gęsty); light; BIO; wysokobiałkowy; probiotyczny;	Zott; Danone; Bakoma; Maluta	Meggle; Z' Bregov; Dukat;	7	13

Źródło: Opracowanie własne

Większość przeanalizowanych jogurtów w polskich punktach sprzedaży zawiera dodatek mleka w proszku, które między innymi dodatkowo zagęszcza produkt, co w przypadku chorwackich wyrobów jest rzadko stosowaną praktyką. Produkty, które nie zawierają tego dodatku, na rynku polskim są promowane przez producentów poprzez podkreślenie tej wartości na etykiecie. Ten sam zabieg ma zastosowanie w przypadku próby zwiększenia atrakcyjności jogurtów wyprodukowanych z mleka pochodzącego od krów karmionych paszami bez GMO.

Chorwackie jogurty w większości cechuje, pożądana z punktu widzenia czystości etykiety, dwuskładnikowa forma. Zaobserwowano jedynie 2 produkty marki K-BIO i K-Classic, które zawierały dodatek mleka w proszku. Natomiast wiele jogurtów na rynku chorwackim wzbogaca się wapniem, wit. B6 i E, czego nie zaobserwowano pośród analizowanych produktów na terenie Polski.

Na etykietach produktów chorwackich producentów zawsze podawana jest zawartość tłuszczu w produkcie, co może być istotne z dietetycznego punktu widzenia. W przypadku polskich wytwórców jest to rzadka praktyka, która ma zastosowanie jedynie dla produktów „light”.

Najczęściej spotykanym rodzajem opakowania w sklepach w obu krajach był kubek tłoczony z folii PS lub PP zamykany platynką z aluminium (Tab. 2). W polskich punktach sprzedaży występowały następujące gramatury jogurtów w ww. opakowaniach: 150; 165; 180; 200; 230; 250; 330; 350; 360; 370; 400 g. W chorwackich sklepach zaobserwowano szerszą gamę gramatur dla tego opakowania, są to kolejno: 150; 165; 180; 200; 250; 330; 350; 360; 370; 400 g.

Charakterystycznym opakowaniem dla jogurtów pitnych jest butelka PET, która występowała tylko w dwóch gramaturach (290; 400 g) w polskich sklepach (Tab. 2). Chorwackie punkty sprzedaży w swojej ofercie posiadały znacznie

Tab. 2. Porównanie różnorodności rodzajów opakowań i dostępnych gramatur produktów dostępnych w wybranych punktach sprzedaży.

Rodzaj opakowania	Dostępne gramatury [g]	
	Polska	Chorwacja
Kubek tłoczony z folii PS lub PP zamykany folią aluminiową	150; 165; 180; 200; 250; 330; 350; 360; 370; 400;	150; 165; 180; 200; 230; 250; 330; 350; 360; 370; 400;
Butelka PET	290; 400	200; 330; 500; 900; 1000; 1500; 1750;
Tetrapack	–	1000;
Wiaderko PP	–	800; 900;

Źródło: Opracowanie własne

szerszy zakres gramatur jogurtów pitnych w tym rodzaju opakowania (200; 330; 500; 900; 1000; 1500; 1750 g).

Opakowaniem, którego występowanie zaobserwowano jedynie w chorwackich punktach sprzedaży był Tetra Pak o gramaturze 1000 g i wiaderko PP 800 i 900 gramowe (Tab. 2).

Analizując średnie ceny za 1 kg jogurtu naturalnego w przeliczeniu na walutę euro stwierdza się, że w chorwackich odpowiednikach analizowanych punktów sprzedaży ceny są wyższe niż w polskich sklepach (Tab. 3). Wynikać to może ze względu na różnice w kursie polskiego złotego i kury chorwackiej w przeliczeniu na euro, ale także ze względów ekonomicznych. Polski rynek mleczarski jest samowystarczalny i stabilny, natomiast chorwacki nie jest w stanie zapewnić sobie wystarczającej podaży mleka, które musi eksportować, co czyni go mniej stabilnym. W Kauflandzie ceny były te o około 12% wyższe, największą różnicę średnich cen jogurtów naturalnych zaobserwowano w Lidlu, która wyniosła 32%, a w prywatnych sklepach spożywczych różnica ta była najmniejsza i wyniosła 9%.

Tab. 3. Porównanie średnich cen za 1 kg jogurtu naturalnego w wybranych punktach sprzedaży w Polsce i Chorwacji.

Punkt sprzedaży	Średnia cena za 1 kg jogurtu naturalnego (euro*)	
	Polska	Chorwacja
Kaufland	1,83	2,06
Lidl	1,45	2,13
Prywatny sklep spożywczy	2,02	2,20

*kurs euro z dnia 05.01.2020 roku

Źródło: Opracowanie własne

Dyskusja

Wiele źródeł podaje, że jest produkcja żywności minimalnie przetworzonej, ogranicza się wyłącznie do podstawowych zabiegów umożliwiających uzyskanie produktu gotowego, o zachowanych właściwościach naturalnych (Czapski 2007; Martins i in. 2004; Ohlsson 1994; Pietrzyk 2008). Inne źródła traktują to pojęcie dosłownie, czyli jako żywność, która dostarczana jest konsumentowi w formie pierwotnej, typowej dla danego surowca lub wyłącznie przetworzonej kulinarnie (Barska 2018). Mimo faktu występowania różnic w interpretacji pojęcia *żywności minimalnie przetworzonej* można wyszczególnić właściwości wspólne dla tej specyficznej grupy produktów (Kowalska 2006).

Uważa się, że produkty podlegające temu trendowi powinny być postrzegane jako pochodzące z natury, na przykład ze względu na ich tradycję spożywania, cechować się prostym procesem wytwarzania, możliwie o jak najmniejszej liczbie składników oraz odznaczające się korzystnym profilem żywieniowym, co nie zawsze ma zastosowanie w przypadku produktów tradycyjnych. Stosowanie substancji dodatkowych żywności jest regulowane prawem UE, jednak sprawę dyskusyjną stanowi to, że powszechne interpretacje terminu „czysta etykieta” nie zostały ujednolicone oraz ujęte w żadnym akcie prawnym i z prawnego punktu widzenia nie ma on żadnego zastosowania, w prawie żywnościowym brak również formalnej definicji terminu „naturalny”. Sformułowania „czysta etykieta” czy „naturalny” nie są jednoznacznie, klarownie rozumiane przez społeczeństwo. Sytuacja ta może prowadzić do powstawania nieścisłości oraz rozczarowań, a także wprowadzać w błąd konsumentów na skutek rozbieżnych zamierzeń producentów żywności i własnych rozumowań oraz oczekiwań. Ponadto, istnieje ryzyko wolnej interpretacji „Clean Label” przez producentów, co może prowadzić do manipulacji i niepożądanych nadużyć z ich strony (Zaręba i Ziarno 2017).

Zakłady mleczarskie zazwyczaj nie prowadzą „czyszczenia” etykiety, ponieważ nie mają z czego ich „oczyścić”. Wytworzone produkty są relatywnie proste, a ich wytworzenie nie wymaga stosowania dodatków do żywności. Dodatki do żywności najczęściej stosowane są w aplikacjach, które wymagają na przykład stabilizacji oraz uzyskania specyficznej tekstury, w napojach mlecznych lub deserach. W mleczarstwie Europy Środkowo-Wschodniej, z racji nieśpiesznego rozwoju, stosowanie dodatków do żywności nie stanowiło wyraźnego trendu jak to miało miejsce w Europie Zachodniej. Wiele mlecznych produktów fermentowanych ma naturalny, prosty skład. Niemniej konsumenci coraz częściej oczekują również produktów wzbogaconych czy przetworzonych, toteż zapotrzebowanie na specyficzne surowce będzie istniało.

Podsumowanie

Przyjęta hipoteza badawcza, oparta na założonych celach, stanowiąca przypuszczenie, że status rynku produktów niskoprzetworzonych nie jest uregulowany prawnie, została zweryfikowana pozytywnie. Potencjalnie może prowadzić to do błędnej interpretacji produktów wpisujących się w ten kanon zarówno ze strony producentów, jak i konsumentów, którzy istotnie wpływają na kształtowanie rynku produktów niskoprzetworzonych, w tym rynku jogurtów naturalnych.

Asortyment na rynku jogurtów naturalnych w Polsce jest mniej różnorodny i charakteryzuje się niższymi cenami w porównaniu z asortymentem na rynku

chorwackim. Jogurty naturalne dostępne na rynku chorwackim cechują się czystsza etykietą w porównaniu z jogurtami naturalnymi obecnymi na rynku polskim.

Wywołuje to potrzebę podejmowania kolejnych analiz w celu przedstawienia pełniejszej interpretacji pojęcia produktu niskopretworzonego.

Literatura:

- Barska A. 2018. Atrybuty produktu żywnościowego a decyzje konsumentów. *Handel Wewnętrzny*, 3(374): 37-47.
- Chudzian J. 2011. Uwarunkowania spożycia produktów mleczarskich. *Polityki Europejskie, Finanse i Marketing*, 7(56): 20-28.
- Czapski J. 2007. Czy nowe znaczy bezpieczne? *Przemysł Spożywczy*, 4: 12-15.
- Euromonitor Report 2019. Yoghurt and Sour Milk Products in Poland, <https://www.euromonitor.com/yoghurt-and-sour-milk-products-in-poland/report> (dostęp: 10.01.2020).
- FAO/WHO Codex Alimentarius Commission. Annex Proposed Draft Standard for Fermented Milks (A11) CL 1997, MMP 12.
- FIL/IDF, Commission D-Legislation. Standards of Identity Terminology Fermented Milk Products, Doc. 316, 1997.
- <http://www.aztn.hr/ea/wp-content/uploads/2016/10/Prikaz-stanja-na-trzistu-mlijeka-i-mlijecnih-proizvoda-u-RH-u-2017..pdf> (dostęp: 04.01.2020)
- <https://www.forummleczarskie.pl/NEWS/6620/> (dostęp: 04.01.2020)
- Judzińska A. 2015. Konkurencyjność cenowa polskiego sektora mleczarskiego w Unii Europejskiej. *Stowarzyszenie ekonomistów rolnictwa i agrobiznesu. Roczniki Naukowe*, 18(5): 60-65.
- Kowalska H. 2006. Żywność minimalnie przetworzona – owoce i warzywa. *Przemysł Spożywczy*, 6: 24-31.
- Martins C. G., Behrens J. H., Destro M. T., Franco B. D. G. M., Vizeu D. M., Hutzler B., Landgraf M. 2004. Gamma Radiation in the Reduction of Salmonella spp. Inoculated on Minimally Processed Watercress (*Nasturtium Officinale*). *Rad. Phys. Chem.*, 71: 87-91.
- Muminović S., Pavlović V. 2012. Profitability of Dairy Industry in Slovenia, Croatia and Serbia. *Mljekarstvo*, 62(2): 96-110.
- Nowicka P., Wojdyło A., Oszmiański J. 2014. Zagrożenia powstające w żywności minimalnie przetworzonej i skuteczne metody ich eliminacji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2(93): 5-18.
- Ohlsson T. 1994. Minimalprocessing – Preservation Methods of the Future: An Overview. *Trends Food Sci. Technol.*, 5(11): 341-348.

- Pietrzyk S. 2008. Żywność minimalnie przetworzona. *Laboratorium Przemysłowe*, 11: 18–23.
- Ragaert P., Devlieghere F., Debevere J. 2007. Review. Role of Microbiological and Physiological Spoilage Mechanisms during Storage of Minimally Processed Vegetables. *Postharvest Biol. Technol.*, 44: 185–194.
- Ruciński P. 2018. Poland: 2018 Dairy and Products Report. USDA, <https://gain.fas.usda.gov/>
- Zaręba D., Ziarno M. 2017. Czysta etykieta – trudności i szanse. *Forum Mleczarskie*, 27(1): 40–43.

ABSTRACT

CHARACTERISTICS OF LOW-PROCESSED PRODUCTS ON THE EXAMPLE OF NATURAL YOGHURTS. COMPARISON OF THE POLISH AND CROATIAN MARKET OF NATURAL YOGHURTS.

Work titled „Characteristics of low-processed products on the example of natural yoghurts: Comparison of the Polish and Croatian market of natural yoghurts” raises multidirectional aspects that characterize the concept of low-processed products and their commercial offer.

The article discusses the concept of low-processed food and the idea of „clean label”. The model product, on which the work was based, was natural yogurt. The article includes such issues as: general characteristics of natural yoghurts, aspects related to the production process, packaging and legal regulations. The characteristics of the European, Polish and Croatian yogurt market were made, the assortment of natural yoghurts was analyzed and compared at three different Polish and Croatian sales outlets in order to indicate the differences and connections between natural yoghurts available in both countries in terms of prices, variety of packaging, weights, labeling, as well as composition in terms of its „purity”.

Słowa kluczowe: żywność niskoprzetworzona, przetwórstwo mleka, rynek jogurtów naturalnych, czysta etykieta

Keywords: low processed food, milk industry, natural yoghurt market, clean label

Dane do kontaktu z autorem:

Marcelina Wilczak

E-mail: marcelinawilczak@gmail.com

Patryk Wiśniewski, Arkadiusz Zakrzewski
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Wydział Nauki o Żywności
Studenckie Koło Naukowe Mikrobiologii Żywności
Opiekun: dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska

PODOBIENSTWO FENOTYPOWE PAŁECZEK *LISTERIA MONOCYTOGENES* IZOLOWANYCH Z MROŻONYCH PRODUKTÓW PRZETWÓRSTWA OWOCOWO-WARZYWNEGO

Wstęp

Bezpieczeństwo mikrobiologiczne żywności stanowi jeden z podstawowych czynników mających wpływ na wytwarzanie żywności najwyższej jakości. Uregulowania prawne wpływają na kontrolę produktów żywnościowych pod względem wykrywania obecności określonych grup mikroorganizmów. Do grupy mikroorganizmów, nad którą należy sprawować kontrolę, zaliczono rodzaj *Listeria*, wśród której wyodrębniono patogennego przedstawiciela – *Listeria monocytogenes* (nieobecna w 25 g produktu przed opuszczeniem przedsiębiorstwa produkującego żywność – w przypadku produktów gotowych do spożycia, przeznaczonych dla niemowląt i do specjalnych celów medycznych) (Rozporządzenie Komisji WE NR 2073/2005).

Listeria sp. obejmuje obecnie 17 różnych gatunków, wśród których wymienia się: *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. marthii*, *L. innocua*, *L. grayi*, *L. fleischmannii*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. rocourtiae*, *L. wehenstephanensis*, *L. grandensis*, *L. riparia* i *L. booriae* (Orsi i Wiedmann 2016). Konkretnie gatunki należące do *Listeria* sp. charakteryzuje zróżnicowany stopień pokrewieństwa. Obecnie wyróżnia się dwa klady – zgrupowane mikroorganizmy, które wywodzą się od wspólnego przodka (Muskalska i Szymczak 2015).

Listeria monocytogenes to chorobotwórczy dla człowieka mikroorganizm, szeroko rozpowszechniony w środowisku naturalnym między innymi w glebie

i wodzie. Te Gram-dodatnie, względnie beztlenowe mikroorganizmy wykazujące ruch w temp. 10–25°C odpowiedzialne są za wywoływanie zakażeń u ludzi, określanych mianem listeriozy (Vázquez-Boland i in. 2008). Wśród objawów zakażeń wymienić należy: posocznicę, zapalenie opon mózgowych oraz poronienia. Zakażenia te są najbardziej niebezpieczne dla osób będących w grupie ryzyka: osób starszych, o obniżonej odporności, kobiet w ciąży (Wang i Hong 1999; Vázquez-Boland i in. 2008).

Patogeny te przejawiają zdolność adaptacji do różnych środowisk. Rozwijają się w temperaturze 1–45° (optimum 37°C). Należą do grupy mikroorganizmów określanych mianem psychrotrofów – drobnoustrojów mających zdolność rozwoju w trakcie chłodniczego przechowywania żywności, dlatego też wszelkiego rodzaju produkty mrożone, w tym mrożonki warzywne, w sposób szczególny narażone są na ich występowanie (Wing i Gregory 2002).

Łatwość rozprzestrzeniania się patogenów oraz rosące zapotrzebowanie konsumentów na towary bez opakowań detalicznych (tzw. na wagę) skupia uwagę na badaniach w kierunku identyfikacji tych mikroorganizmów oraz ich fenotypowego podobieństwa. Dotychczasowe narzędzia identyfikacyjne, wśród których wymienić należy API-*Listeria*, serotypowanie przy zastosowaniu metody PCR, czy też sekwencjonowanie genów 16S rRNA, są drogie i czasochłonne. Technika spektrometrii mas typu MALDI-TOF z użyciem desorpcji/ionizacji laserowej, wspomagane matrycą z analizatorem czasu przelotu przy użyciu spektrometru masowego stało się niezawodnym narzędziem służącym, do szybkiej identyfikacji gatunków *Listeria* (Barbuddhe i in. 2008; Rychert i in. 2013; Hsueh i in. 2014; Jadhav i in. 2015; Ojima-Kato i in. 2016) oraz serotypowania *L. monocytogenes* (Barbuddhe i in. 2008; Jadhav i in. 2015; Ojima-Kato i in. 2016). Technikę tę cechuje dokładność identyfikacji, niski koszt materiałów eksploatacyjnych mających zastosowanie podczas oznaczania oraz możliwość archiwizacji danych (Thouvenot i in. 2017).

Cel pracy

Celem pracy jest oznaczenie podobieństwa fenotypowego pałeczek *L. monocytogenes* wyizolowanych z mrożonych produktów przetwórstwa owocowo-warzywnego, bez opakowania detalicznego, zakupionych w trzech losowo wybranych marketach na terenie Olsztyna.

Materiały i metody

Materiał do badań stanowiło 23 próbek warzyw, owoców i innych produktów mrożonych pochodzenia roślinnego, bez opakowania detalicznego, zakupionych

Tab. 1. Lista produktów mrożonych poddanych analizom.

Lp.	Produkt	Sklep
1.	Fasola	Sklep I
2.	Brokuł	
3.	Mix zupa	
4.	Szpinak	
5.	Marchew	
6.	Marchew mini	
7.	Malina	
8.	Truskawka	
9.	Śliwka	
10.	Wiśnia	
11.	Mieszanka chińska	Sklep II
12.	Zupa mix	
13.	Marchew mini	
14.	Fasolka szparagowa	
15.	Włoszczyzna paski	
16.	Mix 8 składników	
17.	Warzywa na patelnie	
18.	Warzywa na patelnie	Sklep III
19.	Pierogi z kapustą i grzybami	
20.	Pyzy ziemniaczane	
21.	Szpinak	
22.	Uszka	
23.	Brokuł	

Źródło: Opracowanie własne

w trzech różnych sklepach na terenie Olsztyna (Polska). Produkty przedstawiono w Tab. 1.

Izolacja szczepów

Izolację pałeczek *L. monocytogenes* przeprowadzono zgodnie z metodą PL ISO 11290-1: 2000/A1: 2004 (7), która obejmowała pierwotne i wtórne namnażanie. Każdą z próbek poddano inkubacji w bulionie pół-Frasera (Merck, Niemcy) – 37°C/24 h. Po inkubacji przeniesiono 0,1 ml powstałej hodowli do 10 ml wcześniej sporządzonego bulionu Fräsera (Merck, Niemcy) i prowadzono inkubację w 37°C przez 48 h. Po wykonaniu procesów namnażania hodowlę przesiano na podłoże stałe według Ottaviani Agosti – ALOA (Merck, Niemcy). Płytki z podłożem inkubowano w 37°C przez 24 do 48 h. Wyrosłe, charakte-

rystyczne niebiesko-zielone kolonie otoczone nieprzezroczystą strefą podłoża uznano za domniemane *L. monocytogenes*. Typowe kolonie, niebiesko-zielone kolonie z nieprzezroczystą strefą podłoża lub niebiesko-zielone kolonie bez nieprzezroczystą strefą podłoża sklasyfikowano jako *Listeria sp.* i poddano dalszym analizom.

Identyfikacja

W celu przeprowadzenia identyfikacji kolonii potencjalnie należących do rodzaju *Listeria*, wybrano jednego przedstawiciela każdego morfotypu (różniącego się rozmiarem, kolorem i/lub morfologią kolonii) i posiano na płytkę z wybiórczym podłożem dla danej grupy drobnoustrojów.

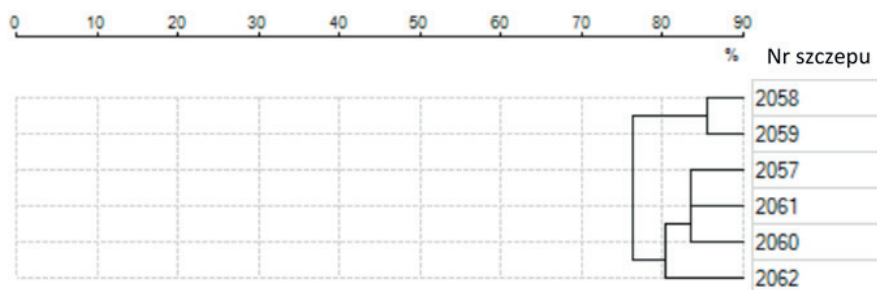
Identyfikacje uzyskanych szczepów przeprowadzono za pomocą techniki desorpcji / jonizacji laserowej wspomaganej matrycą z analizatorem czasu przelotu (ang. MALDI-TOF – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight). Analizę wykonano przy użyciu Vitek MS MALDI-TOF (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francja), przy napięciu 200 kV, zakresie masy 2–20 kDa, częstotliwości lasera 50 Hz i czasie opóźnienia ekstrakcji 200 ns. Jako matrycę zastosowano MALDI VitekMS-CHCA (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francja). Uzyskane spektra analizowano z wykorzystaniem bazy danych SARAMIS.

Grupowanie widm MALDI-TOF MS

Widma uzyskane dla każdego izolatu z wykorzystaniem MALDI-TOF MS VITEK MS porównano ze sobą za pomocą analiz oprogramowania SARAMIS – przeprowadzono hierarchiczne grupowanie próbek, a wyniki przedstawiono w postaci dendrogramu.

Wyniki i dyskusja

W wyniku przeprowadzonych badań z 23 próbek mrożonych produktów przetwórstwa owocowo-warzywnego wyizolowano 9 szczepów *Listeria sp.* Identyfikacja izolatów potwierdziła ich przynależność do gatunku *L. monocytogenes*. Klasowy dendrogram wszystkich izolatów *L. monocytogenes*, wygenerowany przez oprogramowanie VITEK MS Saramis, wyróżnił dwa klastry, w których podobieństwo między szczepami wynosi > 70% do 83,6%. Z próbek mrożonek zakupionych w Sklepie II wyizolowano dwa szczepy, a ich podobieństwo uplasowało się na poziomie 87%. W trzecim ze sklepów wyizolowano zaledwie jeden szczep, dlatego też nie poddano go analizie podobieństwa. Uzyskany dendrogram przedstawiono na Rys. 1 oraz Rys. 2.

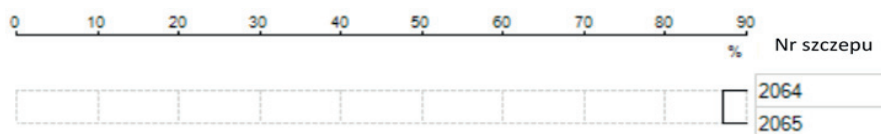
Rys. 1. Dendrogram szczepów *L. monocytogenes* wyizolowanych ze Sklepu I.

Źródło: Opracowanie własne

Listerioza jest chorobą charakteryzującą się niską zachorowalnością, ale przejawiająca wysoki wskaźnik śmiertelności, szczególnie u osób z obniżoną odpornością (Nørrung 2000). Doniesienia wskazują, że różne rodzaje żywności mogą być czynnikiem przenoszącym pałeczki *L. monocytogenes* (McLauchlin 1996), wśród których wymienia się warzywa, produkty mleczne (mleko pasteryzowane i ser) oraz produkty mięsne i rybne. Chociaż minimalna dawka wywołująca zatrucia u ludzi nie jest znana, różne badania sugerują, że żywność powiązana z pojawieniem się listeriozy zawiera podwyższone poziomy patogeny (McLauchlin 1990; Hitchins 1996).

W przeprowadzonym badaniu pałeczki *L. monocytogenes* obecne były w 37,5% przebadanych próbek. Otrzymane wyniki przewyższają te uzyskane przez Maneru i Garcia Jalon (1996), którzy wśród badanych, mrożonych warzyw pozyskanych ze sklepów na terenie Hiszpanii, wyizolowali pałeczki *L. monocytogenes* z 20% prób. W badaniu warzyw mrożonych z terenu Portugalii opublikowanych przez Mena i współpracowników (2004) stwierdzono obecność pałeczek *L. monocytogenes* w 12,9% prób. W dwuletnich badaniach Vitas i in. (2004) dotyczących analizy warzyw pozyskiwanych z jednej chłodni i stwierdzono obecność patogeny w zaledwie 1,8% prób (Vitas i Garcia-Jalon, 2004). W badaniu Białasiewicz i Królasik (1999) sprawdzano występowanie patogeny w warzywach mrożonych pozyskanych z początkowej, środkowej i końcowej fazy zbioru warzyw. Nie stwierdzono ich obecności w żadnej z prób. Obecności pałeczek *L. monocytogenes* w badanych warzywach przygotowanych i zamrożonych przez Aguado i in. (2004) stwierdzono w zaledwie 1,2% prób (Aguado i García-Jalón 2004).

Obecność patogeny może wynikać z kontaminacji zakładów produkcyjnych. W literaturze dostępnych jest niewiele badań dotyczących skażenia warzyw

Rys. 2. Dendrogram szczepów *L. monocytogenes* wyizolowanych ze Sklepu II.

Źródło: Opracowanie własne

przez *Listeria* sp. Cox i in. (1989) stwierdzili występowanie *L. monocytogenes* w zakładzie przetwórstwa ziemniaków w 3% prób (Cox i in. 1989). W nowszych badaniach występowanie *Listeria* sp. w środowisku zakładów przetwórczych wyniosło 47%, przy czym większość bakterii wykrywano w stojącej wodzie na podłogach (Aguado i in. 2004). Należy zwrócić uwagę na powszechne występowanie *Listeria* sp. w glebie, często przypisuje się zanieczyszczenie rozkładającym się materiałem roślinnym i kałowym, przy czym wilgotna gleba powierzchniowa zapewnia chłodne, wilgotne środowisko ochronne, a rozkładający się materiał podłoże, które razem umożliwiają przetrwanie *L. monocytogenes* (Miettine i Wirtanen 2006). Genetyczne zróżnicowanie szczepów w badaniu Skowrona i in. (2018) wskazywało na istnienie wielu potencjalnych źródeł pałeczek *L. monocytogenes*, między innymi z dostarczanych do zakładów surowców, a także z obszarów roboczych, co wykazała Prazak i in. (2002). Zaznaczyć należy, że dzięki psychrotrofowym właściwościom oraz dużej oporności na zabiegi technologiczne pałeczki *L. monocytogenes* mogą przetrwać łańcuch technologiczny i rozwijać się w sklepowych urządzeniach chłodniczych (Prazak i in. 2002; Pulcrano i in. 2012; Skowron i in. 2018).

W badaniu klasowym, dendrogram wszystkich izolatów *Listeria monocytogenes* z jednego ze sklepów, wygenerowanych przez oprogramowanie VITEK MS Saramis, wyróżnił dwa klastry, w których podobieństwo między szczepami wynosiło > 70% do 83,6%. W drugim sklepie wyizolowano dwa szczepy i ich podobieństwo określono na poziomie 87%. W badaniach dendrograme wygenerowane przy pomocy techniki MALDI-TOF wykorzystywane są do innych celów niż określenie podobieństwa samych izolatów – do szybkiej identyfikacji szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na metycylinę (MRSA) (Lindgren i in. 2018), do biotypowania opornych szczepów *Klebsiella pneumoniae* (Berrazeg in. 2013), czy też do wyszukania specyficznych markerów *Candida parapsilosis* w infekcjach szpitalnych (Pulcrano i in. 2012).

Tak wysokie podobieństwo wyizolowanych szczepów może sugerować, że izolaty te, pochodzące z różnych produktów, mogą wywodzić się z tego samego

szczepu, który dostał się do sklepu z zakładów przetwórstwa. Jak dowodzi Aguado i in. (2004) istniała możliwość krzyżowego zanieczyszczenia przetwarzanych surowców w zakładzie przetwórstwa, a więc także na terenie sklepu, zwłaszcza, że produkty te oddzielone są od siebie tylko kosztami lub przegródkami.

Jak dowodzi Aguado i in. (2004) istnieje możliwość krzyżowego zanieczyszczenia przetwarzanych surowców w zakładzie przetwórstwa. Wyniki badań własnych wskazują, że względu na klonarny charakter izolatów, na możliwość krzyżowego zanieczyszczenia mrozonek w obrębie sklepu.

Podsumowanie

Wyniki tego badania pokazują duże podobieństwo fenotypowe szczepów znajdujących się w warzywach mrożonych bez opakowań detalicznych. Wysokie podobieństwo może sugerować, że niektóre z badanych izolatów pochodzą od tego samego szczepu, a niewielkie różnice fenotypowe wynikać z losowych mutacji. Szczepy tym samym mogą przenosić się z produktu na produkt w czasie przechowywania. Wyniki te sugerują, że należy podjąć działania uniemożliwiające przenoszenie się pałeczek *L. monocytogenes* w produktach mrożonych sprzedawanych bez opakowań detalicznych

Literatura

- Aguado V., Vitas A. I., García-Jalón I. 2004. Characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from a Vegetable Processing Plant by RAPD and REA. Int. J. Food Microbiol., 90(3): 341-347.
- Barbuddhe S. B., Maier T., Schwarz G., Kostrzewa M., Hof H., Domann, E., Chakraborty T., Hain T. 2008. Rapid Identification and Typing of *Listeria species* by Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry. Appl. Environ. Microbiol., 74: 5402-5407.
- Berrazeg M., Diene S. M., Drissi M., Kempf M., Richet H., Landraud L., Rolain J. M. 2013. Biotyping of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates from France and Algeria Using MALDI-TOF MS. PLoS ONE, 8(4).
- Białasiewicz D., Królasik J. 1999. Wpływ procesu technologicznego na jakość mikrobiologiczną mrożonej fasoli szparagowej. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 4(21): 96-104.
- Cox L. J., Kleiss T., Cordier J. L., Cordellana C., Konkel P., Pedrazzini C., Beumer R., Siebenga A. 1989. *Listeria* spp. in Food Processing, Non-food, and Domestic Environments. Food Microbiol., 6(1): 49-61.

- Hitchins A. D. 1996. Assessment of Alimentary Exposure to *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., 30(1–2): 71-85.
- Hsueh P. R., Lee T. F., Du S. H., Teng S. H., Liao C. H., Sheng W. H., Teng L. J. 2014. Bruker Biotyper Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species. J. Clin. Microbiol., 52: 2371-2379.
- Jadhav S., Gulati V., Fox E. M., Karpe A., Beale D. J., Seviour D., Bhavne M., Palombo E. A. 2015. Rapid Identification and Source-tracking of *Listeria monocytogenes* Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. Int. J. Food Microbiol., 202: 1-9.
- Lindgren Å., Karami N., Krlsson R., Åhren Ch., Welker M., Moore E .R. B., Stadler L. S. 2018. Development of a Rapid MALDI-TOF MS Based Epidemiological Screening Method Using MRSA as a Model Organism. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 37(1): 57-68.
- Maneru I., Garcia-Jalon I. 1995. *Listeria monocytogenes* in Foods Available in the Market at Pamplona. Alimentaria, 267: 39-43.
- McLauchlin J. 1990. Distribution of Serovars of *Listeria monocytogenes* Isolated from Different Categories of Patients with Listeriosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 9(3): 210-213.
- McLauchlin, J. 1996. The Relationship between *Listeria* and Listeriosis?. Food Control, 7(4–5): 187-193.
- Mena C. 2004. Incidence of *Listeria monocytogenes* in Different Food Products Commercialized in Portugal. Food Microbiol., 21(2): 213-216. DOI: 10.1016/S0740-0020(03)00057-1.
- Miettinen H., Wirtanen G. 2006. Ecology of *Listeria* spp. in a Fish Farm and Molecular Typing of *Listeria monocytogenes* from Fish Farming and Processing Companies. Int. J. Food Microbiol., 112(2): 138-146. DOI: 10.1016/j.ijfood-micro.2006.06.016.
- Muskalska K.B., Szymczak B. 2015. Postępy badań nad bakteriami rodzaju *Listeria*. Post. Mikrobiol., 54(2): 123–132.
- Nørrung B. 2000. Microbiological Criteria for *Listeria monocytogenes* in Foods under Special Consideration of Risk Assessment Approaches. Int. J. Food Microbiol., 62(3): 217-221. DOI: 10.1016/S0168-1605(00)00338-X.
- Ojima-Kato T., Yamamoto N., Takahashi H., Tamura H. 2016. Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Can Precisely Discriminate the Lineages of *Listeria monocytogenes* and Species of *Listeria*. PLoS One, 11(7). DOI: 10.1371/journal.pone.0159730.
- Orsi H. R., Wiedmann M. 2016. Characteristics and Distribution of *Listeria* spp., Including *Listeria* Species Newly Described since 2009. Appl. Microbiol. Biotechnol., 100: 5273-5287. DOI: 10.1007/s00253-016-7552-2.

- PN-EN ISO 11290-1:1999. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania *Listeria monocytogenes* – część 1: metoda wykrywania.
- Prazak A. M., Murano E. A., Merccado I., Acuff G. R. 2002. Prevalence of *Listeria monocytogenes* during Production and Postharvest Processing of Cabbage. *J. Food Prot.*, 65(11): 1728–1734. DOI: 10.4315/0362-028X-65.11.1728.
- Pulcrano G., Roscetto E., Iula V. D., Panellis D., Rossano F., Catania M. R. 2012. MALDI-TOF Mass Spectrometry and Microsatellite Markers to Evaluate Candida Parapsilosis Transmission in Neonatal Intensive Care Units. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 31(11): 2919-2928. DOI: 10.1007/s10096-012-1642-6.
- Rozporządzenie Komisji (WE) NR 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. *Dz. Urz. UE L 338 z dnia 22 grudnia 2005 r.*, 1–26.
- Rychert J., Burnham C. A., Bythrow M., Garner O. B., Ginocchio C. C., Jennemann R., Lewinski M. A., Manji R., Mochon A. B., Procop G. W., Richter S. S., Sercia L., Westblade L. F., Ferraro M. J., Branda J. A. 2013. Multicenter Evaluation of the Vitek MS Matrix-assisted Laser Desorption Ionization-time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of Gram-positive Aerobic Bacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 51: 2225-2231.
- Skowron K., Hulisz K., Gryń G., Olszewska H., Wiktorczyk N., Paluszak Z. 2018. Comparison of Selected Disinfectants Efficiency against *Listeria monocytogenes* Biofilm Formed on Various Surfaces. *Int. Microbiol.*, 21(1–2): 23-33. DOI: 10.1007/s10123-018-0002-5.
- Thouvenot P., Vales G., Bracq-Dieye H., Tessaund-Rita N., Maury M. M., Moura A., Lecuit M., Leclercq A. 2018. MALDI-TOF Mass Spectrometry-based Identification of *Listeria* Species in Surveillance: A Prospective Study. *J. Microbiol. Methods.*, 144: 29-32.
- Vázquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J. 2008. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clin. Microbiol. Rev.*, 14: 584-640.
- Vitas A. I., Garcia-Jalon V. A. 2004. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in Fresh and Processed Foods in Navarra (Spain). *Int. J. Food Microbiol.*, 90(3): 349-56. DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00314-3.
- Wang C., Hong C. 1999. A Rapid PCR-based Hybridization Assay for the Detection of *Listeria monocytogenes* in Channel Catfish. *Food Microbiol.*, 16: 291-297.
- Wing E. J., Gregory S. H. 2002. *Listeria monocytogenes*: Clinical and Experimental Update. *J. Infect. Dis.*, 185: 18-24.

ABSTRACT**PHENOTYPIC SIMILARITY OF *LISTERIA MONOCYTOGENES* ISOLATED FROM FROZEN FRUIT AND VEGETABLE PROCESSING PRODUCTS**

The purpose of this work was to determine the phenotypic similarity of *L. monocytogenes* in frozen products, without retail packaging, purchased in three supermarkets in Olsztyn. Isolation of the strain was performed according to ISO 11290. Confirmation of the belonging of the strain to the species *L. monocytogenes* was performed by MALDI-TOF.

In the analyzed nine strains of *L. monocytogenes* from 24 samples of frozen products. Identification of all isolates confirmed their belonging to the species *L. monocytogenes*. Examination of the similarity of strains from one of the stores contains two clusters, in which the similarity between strains was > 70% to 83.6%. In the second store, two strains were isolated, and their similarity is at the level of 87%.

The results of this study are of high phenotypic similarity in strains composed in frozen products. A high similarity may suggest that some of the isolates tested may be from the same strain, and differences due to random mutations.

Słowa kluczowe: *Listeria monocytogenes*, podobieństwo fenotypowe, mrożonki

Keywords: *Listeria monocytogenes*, phenotypic similarity, frozen food

Dane do kontaktu z autorem:

Patryk Wiśniewski

E-mail: paatrykk.w@wp.pl

Arkadiusz Zakrzewski

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauki o Żywności

Naukowe Koło Mikrobiologii

Opiekun: dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska

GDZIE CZAI SIĘ ZŁO – STAN MIKROBIOLOGICZNY TERMINALI W ZAKŁADACH GASTRONOMICZNYCH

Wstęp

Nośniki zakażenia (ang. *Fomites*) to przedmioty nieożywione, zdolne do absorpcji i przenoszenia zakaźnych mikroorganizmów (Angelakis i in. 2014). W ujęciu globalnym pieniądze (bilon oraz banknoty) są jednym z przedmiotów najczęściej przekazywanych z rąk do rąk. Banknoty i monety dotykane są przez osoby o różnych standardach higienicznych i przechowywane w różnych warunkach środowiskowych i higienicznych. Biorąc pod uwagę, że pieniądze mogą ulec zanieczyszczeniu w trakcie ich przekazywania, odgrywają rolę w przenoszeniu mikroorganizmów na inne osoby (Stephens i in. 2019). Zważywszy, że waluta jest często obsługiwana i przenoszona na duże obszary geograficzne, istnieje możliwość szybkiego rozprzestrzeniania się skażenia na całym świecie (Narayan i in. 2015). Obecnie szybkie zmiany w społeczeństwie powodują, że twarde waluty są wypierane poprzez bardziej nowoczesne rozwiązania jak karty kredytowe, aplikacje na telefony komórkowe, systemy komunikacji bliskiego zasięgu i kryptowaluty, takie jak bitcoiny. Wydawać by się mogło, że dzięki tym rozwiązaniom możliwa jest redukcja transferu mikroorganizmów z człowieka na człowieka, jednak należy pamiętać, że w przypadku kart płatniczych czy aplikacji konieczne jest wpisanie hasła zabezpieczającego na klawiaturze terminalu, który może stanowić idealny pośredni czynnik zakażeń patogenami lub zakażeń oportunistycznych. Tym bardziej, że nie ma norm wymuszających na pracownikach zakładów dezynfekcję terminali (Sucilathangam i in. 2016).

Cel pracy

Celem pracy jest określenie stanu mikrobiologicznego terminali płatniczych znajdujących się w zakładach gastronomicznych na terenie Olsztyna.

Materiały i metody

Materiały

Materiał do badań stanowił wymaz z 10 terminali płatniczych pobranych z 7 zakładów gastronomicznych na terenie Olsztyna, województwo warmińsko-mazurskie, Polska.

Metody

W celu zbadania obecności mikroorganizmów wymazy z terminali zostały przeniesione do zbuforowanej wody peptonowej i namnożone w 37°C przez 24h.

Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych

Próbki z terminali pobierano w centrach ich klawiatury numerycznej, fizycznie dotykając ich powierzchni za pomocą płytek agarowych kontaktowych TSA zawierających środki neutralizujące dezynfektanty (BioMaxima SA, Lublin, Poland) przez 10 s. Po pobraniu próbek płytki inkubowano przez 72h w temperaturze 30°C. Następnie zliczono wszystkie kolonie i obliczono obciążenie bakteryjne w jtk/m² (jednostkach tworzących kolonię/m²).

Obecność bakterii fekalnych (ang. Fecal indicator bacteria)

Obecność bakterii z grupy coli oraz enterokoków jelitowych określono przy użyciu podłoży wybiórczych: podłoże płynne z żółcią, laktozą, zielenią brylantową oraz rurką Dürhama oraz VRBL-agar (Merck, Niemcy) dla grupy coli oraz podłoże Slanetza i Bartleya (Merck, Niemcy) do oznaczenia *Enterococcus* sp. Podłoża dla grupy coli inkubowano w 37°C przez 24h, natomiast czas inkubacji dla enterokoków wydłużono do 48h.

Obecność gronkowców

W celu oznaczenia gronkowców 100 µl hodowli prowadzonej na zbuforowanej wodzie peptonowej przeniesiono na bulion Giolitti-Cantoni (Merck, Niemcy) i inkubowano w warunkach beztlenowych w 37°C przez 24h. Zbuforowaną wody peptonowej wykorzystano z powodu małej ilości zebrane-

go materiału. W przypadku ściemnienia pożywki hodowle przeniesiono na podłoże stałe Baird Parker (Merck, Niemcy) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 48h.

Obecność patogenów

W celu oznaczenia obecności *Salmonella* sp. 100 µl zbuforowanej wody peptonowej po inkubacji przeniesiono do bulionu RVS (Merck, Niemcy) i inkubowano w 37°C przez 24h, w przypadku zaobserwowanego zmętnienia zawieszinę drobnoustrojów przenoszono na podłoże stałe XLD (Merck, Niemcy) i inkubowano w 37°C przez 24h.

Do oznaczenia obecności *Listeria monocytogenes* wykorzystano dwuetapowe namnażanie materiału w podłożach pół-Fraser oraz Fraser w 37°C przez kolejno 24 i 48h. Następnie w przypadku, gdy zaobserwowano zaciemnienie podłoża hodowle przeniesiono na podłoże według Ottaviani i Agosti (Merck, Niemcy) i inkubowano w 37°C przez 24h.

Obecność *Yersinia enterocolitica* oznaczono przy użyciu podłoża stałego CIN (Merck, Niemcy) poprzez naniesienie zawiesiny drobnoustrojów ze zbuforowanej wody peptonowej i inkubację w 37°C przez 24h.

Identyfikacja szczepów

Do identyfikacji wybrano jednego przedstawiciela każdego morfotypu kolonii (różniącego się rozmiarem, kolorem i/lub morfologią kolonii) z płytki z wybiórczym podłożem dla danej grupy drobnoustrojów. Każdy z morfotypów przesiano na podłoże stałe Tryptic Soy Agar (Merck, Niemcy) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24–48h.

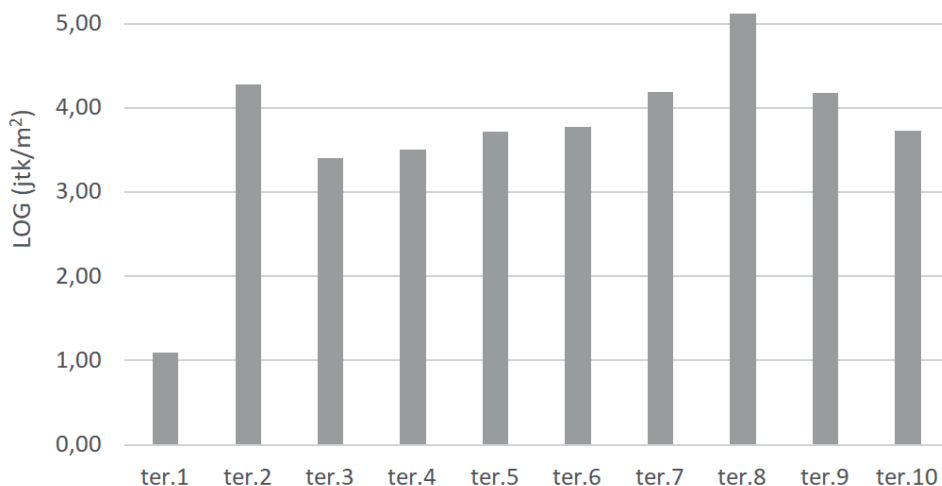
Identyfikacje uzyskanych szczepów przeprowadzono za pomocą techniki desorpcji/ionizacji laserowej wspomaganej matrycą z analizatorem czasu przelotu (ang. MALDI-TOF – Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight). Analizę wykonano przy użyciu Vitek MS MALDI-TOF (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francja) przy napięciu 200 kV, zakresie masy 2–20 kDa, częstotliwości lasera 50 Hz i czasie opóźnienia ekstrakcji 200 ns. Jako matrycę zastosowano MALDI VitekMS-CHCA (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francja). Uzyskane spektra analizowano z zastosowaniem bazy danych SARAMIS.

Wyniki

Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych

Ogólna liczba drobnoustrojów mezofilnych na powierzchni terminali wynosiła od $2,51 \times 10^3$ do $> 1,5 \times 10^5$ jtk/m². Średnia dla wszystkich badanych terminali wynosiła $2,04 \times 10^4$ jtk/m². Wyniki przedstawiono na Rys. 1.

Rysunek 1 Ogólna liczba drobnoustrojów na powierzchni terminali.



Źródło: Opracowanie własne

Obecność bakterii fekalnych

Po przeprowadzeniu badań wykazano, że aż w 60% badanych prób znajdowały się pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae*. Pałeczki z grupy coli natomiast znalazły się na powierzchni 50% badanych terminali. Do najczęściej izolowanych szczepów należały te z gatunku *Enterobacter cloacae*, pałeczka należąca do grupy coli, dodatkowo identyfikowano pałeczki *Acinetobacter* sp., *Pantoea agglomerans*, a także zdolne do wzrostu na podłożu VRBL pałeczki *Pseudomonas putida*.

Wśród badanych prób nie wykryto obecności bakterii należących do rodzaju *Enterococcus*.

Tab. 1. Obecność wybranych grup drobnoustrojów na powierzchni badanych terminali.

Terminal	Obecność wybranych grup drobnoustrojów						
	<i>Enterobacteriaceae</i>	gr. coli	gronkowce	enterokoki	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Yersinia sp.</i>	<i>Salmonella sp.</i>
1	ob.	ob.	ob.	nb.	nb.	nb.	nb.
2	nb.	nb.	ob.	nb.	nb.	nb.	nb.
3	nb.	nb.	ob.	nb.	nb.	nb.	nb.
4	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.	nb.
5	ob.	nb.	ob.	nb.	nb.	nb.	nb.
6	nb.	nb.	ob.	nb.	nb.	nb.	nb.
7	ob.	ob.	ob.	nb.	nb.	nb.	nb.
8	ob.	ob.	ob.	nb.	nb.	nb.	nb.
9	ob.	ob.	ob.	nb.	nb.	nb.	nb.
10	ob.	ob.	ob.	nb.	nb.	nb.	nb.

ob. – obecne na powierzchni, nb. – nieobecne na powierzchni

Źródło: Opracowanie własne

Obecność gronkowców

Obecność gronkowców została stwierdzona w 90% badanych prób. Spośród wyizolowanych szczepów do identyfikacji dominującym okazał się *Staphylococcus aureus* (53,85%), kolejnymi *Staphylococcus epidermidis* (30,77%) oraz *Staphylococcus piscifermentans* (15,38%).

Obecność pozostałych patogenów

W badaniu w żadnym z badanych prób nie stwierdzono obecności patogenów należących do rodzaju *Salmonella sp.*, *Yersinia sp.* oraz gatunku *Listeria monocytogenes*.

Dyskusja

Jest to pierwsze badanie dotyczące stanu mikrobiologicznego terminali płatniczych w lokalach gastronomicznych. Przeprowadzone badanie miało na celu pokazanie, jakie zagrożenie mogą nieść terminale jako czynnik pośredni transmisji mikroorganizmów z człowieka na człowieka. Istnieje wiele doniesień, że zarówno bilon oraz banknoty są istotnym nośnikiem bakterii fekalnych i patogenów (Firoozeh i in. 2017; Moosavy i in. 2013; Allan i in. 2018). Badanie przeprowadzone w Indiach, w mieście Tirunelveli, wykazało, że aż 86,4%

tamtejszej waluty jest źródłem bakterii fekalnych (Sucilathangam i in. 2016). Różne doniesienia dowodzą, że nie jest to problem tylko krajów rozwijających się. W badaniu przeprowadzonym w Stanach Zjednoczonych na banknotach jednodolarowych wykazano, że aż 92% banknotów było nośnikami bakterii patogennych lub potencjalnie patogennych (Pope i in. 2002). Podobnie jak pieniądze, bankomaty mogą być zanieczyszczone różnymi mikroorganizmami z powodu ich codziennego kontaktu z rękami wielu użytkowników. W niniejszym badaniu ogólna liczba bakterii tlenowych na powierzchni terminali wynosiła od $2,51 \times 10^3$ do $< 1,5 \times 10^5$ jtk/m². Badanie innego czynnika transferu bakterii, jakim jest bankomat pokazało, że w 96 losowo wybranych bankomatów w Nigerii liczba bakterii tlenowych wynosiła od $1,01 \times 10^3$ do $2,51 \times 10^7$ jtk/m² (Abdulaziz i in. 2019). Dodatkowe obawy budzi odsetek szczepów opornych na antybiotyki izolowanych z banknotów. W badaniu Abd Alfadil przeprowadzonym w 2018 roku wykazano, że banknoty sudańskie są zanieczyszczone patogenami i potencjalnie chorobotwórczymi bakteriami. Ponadto, badanie to wykazało, że odporność na wiele leków stosowanych powszechnie, występuje u większości szczepów izolowanych z powszechni sudańskich banknotach. Co wyjątkowo niepokojące, wszystkie szczepy wykazały oporność na ampicylinę oraz penicilinę G, a ponad połowa (64%) wykazywała oporność na amoksycylinę, z kolei 44% badanych szczepów była oporna na amoksycylinę z kwasem klawulanowym, a 42% szczepów była oporna na erytromycynę. Wszystkie szczepy były wrażliwe na 4 spośród 18 badanych antybiotyków: cyprofloksacynę, lewofloksacynę, kotrimoksazol oraz meropenem. Do najczęściej izolowanych bakterii wieloopornych należały te z gatunków *P. aeruginosa*, *Escherichia coli* oraz *Klebsiella spp.* (Alfadil i in. 2018).

Ważnymi czynnikami dla przeżycia bakterii na powierzchni jest obecność materii organicznej, promieniowanie słoneczne, temperatura oraz wilgotność (Taylor i in. 2013). W przeglądzie Kramer i in. (2006) stwierdzono, że wiele bakterii Gram-dodatnich, takich jak *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* i *Streptococcus pyogenes*, jak i bakterie Gram-ujemne, takie jak *Acinetobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* i *Shigella spp.*, może przetrwać miesiące na powierzchniach. Podobnie jak wyżej wymienione bakterie również prątki czy *Clostridium difficile* charakteryzują się możliwością długotrwałego przetrwania, podczas gdy inne patogeny, takie jak *Bordetella pertussis*, *Haemophilus influenzae*, *Proteus vulgaris* lub *Vibrio cholera*, utrzymują się w stanie żywym tylko przez kilka dni (Kramer i in. 2006).

Obecność bakterii przez tak długi czas możliwa jest dzięki sile adhezji. Przyczepność bakterii do powierzchni podłoża jest na ogół niska, zwykle rzędu

100 bakterii cm^2 (Li i in. 2011), co odpowiada pokryciu powierzchni $< 1\%$. Początkowo przylegające bakterie mogą wyrosnąć w dojrzwały biofilm o grubości do $300 \mu\text{m}$ i zawierający 10^{10} bakterii cm^2 (Sjollema i in. 2011). Bakteryjna przyczepność do powierzchni zwykle stanowi początek poważnych problemów, takich jak korozja pod wpływem drobnoustrojów, zanieczyszczenie systemów wody pitnej, choroby jamy ustnej, takie jak próchnica i zapalenie dziąseł, uszkodzenie sztucznych implantów w ludzkim ciele i kilka innych problemów przemysłowych i środowiskowych, a w przypadku terminali zwiększoną liczbę drobnoustrojów i ich potencjalny transfer (Galié i in. 2018).

W badaniu wykazano, że na powierzchni 60% terminali stwierdzono obecność pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae*, spośród których najpowszechniejszym gatunkiem był *Enterobacter cloacae*. W badaniach oceniających jakość mikrobiologiczną banknotów często oznaczano obecność bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae*, w tym *Salmonella* sp., *Klebsiella* sp. (Elumalai i in. 2012), *Enterobacter* sp. (Kuria i in. 2009; Göktaş, Oktay 1992), *Yersinia* sp. oraz *Shigella* sp. (Ashraf i in. 2019). *Enterobacter cloacae*, jak większość przedstawicieli rodziny *Enterobacteriaceae*, jest zdolny do wywoływania zakażeń oportunistycznych u pacjentów hospitalizowanych lub osłabionych. Co ważne, *Enterobacter* sp. jest drugim najczęstszym rodzajem z rodziny *Enterobacteriaceae* opornym na karbapenemy w Stanach Zjednoczonych, przyczyniając się do rozprzestrzeniania się zakażeń opornych na leczenie tym antybiotykiem (Wilson i in. 2017; Keller i in. 1998).

Aż w 90% badanych terminali obecne były gronkowce, spośród których ponad połowę stanowiły szczepy *S. aureus*. *Staphylococcus aureus* jest głównym ludzkim patogenem, który powoduje szeroki zakres klinicznych infekcji. Jest główną przyczyną bakteriemii i infekcyjnego zapalenia wsierdza, a także zakażeń kostno-stawowych, skóry i tkanek miękkich, zakażeń opłucnej i płuc. W ciągu ostatnich dwóch dekad nastąpiły dwie wyraźne zmiany w epidemiologii zakażeń *S. aureus*: po pierwsze, rosnąca liczba zakażeń związanych z opieką zdrowotną, szczególnie widocznych w infekcyjnym zapaleniu wsierdza i zakażeniach urządzeń protetycznych, a po drugie, epidemia skóry związanej ze społecznością oraz infekcje tkanek miękkich wywołane przez szczepy z pewnymi czynnikami wirulencji i opornością na antybiotyki β -laktamowe (Liu i George 2009).

Choć nie oznaczono patogenów należących do rodzajów *Yersinia* sp., *Salmonella* sp. oraz gatunku *Listeria monocytogenes*, jeden ze szczepów wyrósł na podłożu VRBL, stosowanym w oznaczeniach drobnoustrojów z rodziny *Enterobacteriaceae*. Stwierdzono wzrost szczepu z gatunku *P. agglomerans*. Gatunek ten, związany jest przede wszystkim z roślinami i nie jest uważany

za patogen ludzki. Może on jednak być przyczyną oportunistycznych zakażeń u ludzi, głównie u osób z obniżoną odpornością. Septyczne zapalenie stawów lub zapalenie błony maziowej pojawia się jako powszechny wynik kliniczny egzogenego zakażenia *P. agglomerans*, inne obejmują zapalenie wnętrza gałki ocznej, zapalenie okostnej, zapalenie wsierdza oraz zapalenie kości i szpiku. Epidemie szpitalnej posocznicy z przypadkami śmiertelnymi opisano w kilku krajach, zarówno u dorosłych, jak i u dzieci. W większości przypadków przebieg kliniczny choroby nabytej w szpitalu był jednak łagodny, a zastosowanie odpowiedniego leczenia antybiotykiem doprowadziło do pełnego wyzdrowienia (Dutkiewicz i in. 2016).

Podsumowanie

Badanie stanu mikrobiologicznego terminali wykazało obecność patogennych drobnoustrojów, takich jak *Staphylococcus aureus* oraz innych gatunków potencjalnie patogennych. Wyniki tego badania budzą obawy związane ze zdrowiem publicznym, ponieważ wskazują, że terminale są potencjalnymi obszarami akumulacji mikroorganizmów chorobotwórczych, dlatego wydaje się konieczne wprowadzenie standardów postępowania z terminalami oraz kontroli organów zajmujących się bezpieczeństwem zakładów gastronomicznych.

Literatura:

- Abdulaziz J., Kwaga J., Okolocha E., Abdullahi S., Ibrahim K. 2019. Determination of Bacterial Contamination, Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* on Commercial Banks Automated Teller Machines (ATMs) in Kaduna Metropolis, Kaduna State, Northwestern Nigeria.
- Alfadil N., Mohamed M., Ali M., Nima E. 2018. Characterization of Pathogenic Bacteria Isolated from Sudanese Banknotes and Determination of Their Resistance Profile. *Int. J. Microbiol.*, 1-7.
- Allan M., Atuhaire C., Nathan M., Ejobi F., Cumber S. 2018. Bacterial Contamination of Ugandan Paper Currency Notes Possessed by Food Vendors around Mulago Hospital Complex. *Uganda. Pan Afr. Med. J.*, 31: 143.
- Angelakis E., Azhar E., Bibi F., Yasir M., Al-Ghamdi A., Ashshi A., Elshemi A., Raoult D. 2014. Paper Money and Coins as Potential Vectors of Transmissible Disease. *Future Microbiol.*, 9: 2.
- Ashraf M., Bashir M., Mariam S., Tabassum M., Bilal M., Mustafa M., Ur Rehman S. 2019. An Assessment of Social, Economic and Managemental Factors

- Affecting Average Production per Week in Commercial Layers at District Toba Tek Singh, Punjab, Pakistan. *Adv. Life Sci.*, 6: 139-146.
- Dutkiewicz J., Mackiewicz B., Lemieszek M., Golec M., Milanowski J. 2016. *Pantoea Agglomerans*: A Mysterious Bacterium of Evil and Good. Part III. Deleterious Effects: Infections of Humans, Animals and Plants. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 23(2): 197-205.
- Elumalai E., David E., Hemachandran J. 2012. Bacterial Contamination of Indian Currency notes (Rupee). *Int. J. Occup. Environ. Med.*, 3: 204-205.
- Firoozeh F., Dadgostar E., Akbari H., Zibaei M., Sadjjadian S., Moshtaghi M., Shakib A. 2017. Bacterial Contamination of Iranian Paper Currency and Their Antibiotic Resistance Patterns. *Int. J. Enteric Pathog.*, 5: 106-110.
- Galié S., García-Gutiérrez C., Miguélez E., Villar C., Lombó F. 2018. Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front. Microbiol.*, 9: 898.
- Göktaş P., Oktay G. 1992. Bacteriological Examination of Paper Money. *Mikrobiyol. Bul.*, 26: 344-348.
- Keller R., Pedroso M., Ritchmann R., Silva R. 1998. Occurrence of Virulence-associated Properties in *Enterobacter Cloacae*. *Infect. Immun.*, 66: 645-649.
- Kramer A., Schwebke I., Kampf G. 2006. How Long do Nosocomial Pathogens Persist on Inanimate Surfaces? A Systematic Review. *BMC Infect. Dis.*, 6: 130.
- Kuria J., Wahome R., Jobalamin M., Kariuki S. 2009. Profile of Bacteria and Fungi on Money Coins. *East Afr. Med. J.*, 86: 151-155.
- Li J., Busscher H., Norde W., Sjollema J. 2011. Analysis of the Contribution of Sedimentation to Bacterial Mass Transport in a Parallel Plate Flow Chamber. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.*, 84: 76-81.
- Moosavy M., Shavisi N., Warriner K., Mostafavi E. 2013. Bacterial Contamination of Iranian Paper Currency. *Iran. J. Public Health.*, 42: 1067-70.
- Narayan D., Reddy M., Sujatha B., Biradar S. 2015. Assessment of Microbial Contamination and Oral Health Risks Associated with Handling of Indian Currency Notes Circulating in Bengaluru City: A Cross-sectional Survey. *J. Indian Assoc. Public Heal. Dent.*, 13: 337-341.
- Pope T., Ender P., Woelk W., Koroscil M., Koroscil T. 2002. Bacterial Contamination of Paper Currency. *South. Med. J.*, 95: 1408-1410.
- Sjollema J., Rustema-Abbing M., van der Mei H., Busscher H. 2011. Generalized Relationship between Numbers of Bacteria and Their Viability in Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 5027-5029.
- Stephens B., Azimi P., Thoemmes M., Heidarinejad M., Allen J., Gilbert J. 2019. Microbial Exchange via Fomites and Implications for Human Health. *Curr. Pollut. Reports.*, 5: 198-213.
- Sucilathangam G., Reventh A., Velvizhi G., Revathy C. 2016. Assessment of Microbial Contamination of Paper Currency Notes in Circulation. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, 5: 735-741.

- Taylor J., Davies M., Canales M., Lai K. 2013. The Persistence of Flood-borne Pathogens on Building Surfaces under Drying Conditions. *Int. J. Hyg. Environ. Health.*, 216: 91-99.
- Wilson B., El Chakhtoura N., Patel S., Saade E., Donskey C., Bonomo R., Perez F. 2017. Carbapenem-resistant *Enterobacter Cloacae* in Patients from the US Veterans Health Administration, 2006–2015. *Emerg. Infect. Dis.*, 23: 5.

ABSTRACT

WHERE EVIL LURKS – MICROBIOLOGICAL CONDITIONS OF CASHIER TERMINALS IN EATING PLACES

Terminal keyboard can be a factor in the transmission of bacteria from human to human.

The purpose of the work was to determine the microbiological contamination of terminals in local catering establishment. The study took samples from 10 terminals and determined the number of aerobic bacteria and the presence of coliforms, enterococci, staphylococci and pathogenic bacteria, and their identification using MALDI-TOF technique.

The total number of aerobic bacteria on the terminal surface ranged from 2.51×10^3 to $< 1.5 \times 10^5$ cfu/m². Coliforms were found in 50% of the samples, while *Enterococcus* sp. and pathogens, were found in none of the examined surface. *Staphylococcus* sp. were found on most of the tested terminal's surfaces, which is disturbing by the dominant species of this genus being *S. aureus*.

Examination of the microbiological state of terminals has shown the presence of pathogenic microorganisms such as *S. aureus* and other potentially pathogenic species.

Slowa kluczowe: terminale, patogeny, kontaminacja

Keywords: cashier terminals, pathogens, contamination

Dane do kontaktu z autorem:

mgr inż. Arkadiusz Zakrzewski

e-mail: arkadiusz.zakrzewski@uwm.edu.pl

Kinga Zarębska

Uniwersytet Morski w Gdyni

Wydział Przedsiębiorczości i Towaroznawstwa

Naukowe Koło Towaroznawstwa „CARGO”

Opiekun: dr hab. inż. Przemysław Dmowski

Opiekun naukowy: dr inż. Jadwiga Stankiewicz

WYBRANA MIKROFLORA DESERÓW PRZEZNACZONYCH DLA NIEMOWLĄT I DZIECI

Wstęp

Właściwe żywienie ma kluczowy wpływ na rozwój fizyczny, psychiczny oraz motoryczny dziecka, w szczególności w początkowych etapach życia. Dzięki prawidłowym nawykom żywieniowym zwiększona zostaje odporność oraz zdolności poznawcze, a choroby takie jak cukrzyca, miażdżyca, alergię czy otyłość są w dużym stopniu minimalizowane (Bona 2011). Według danych światowych niedożywienie jest w pewien sposób odpowiedzialne za 60% z 10,9 mln zgonów dzieci do 5. roku życia w ciągu roku. Około 75% tych zgonów, które bardzo często powiązane są z niewłaściwym żywieniem, na przykład stosowaniem diety monotematycznej, następuje do pierwszego roku życia (Weke i Barańska 2014). Problem ten szczególnie często pojawia się w krajach rozwijających się, w momencie wprowadzania posiłków stałych i częściowej rezygnacji z mleka w diecie dzieci. Przyczyną tych działań są między innymi tradycje rodziców, przekonania religijne czy tło społeczno-polityczne (Jarosz 2014).

Od wielu lat na rynku dostępne są produkty gotowe dla niemowląt i dzieci należące według Rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 609/2013 z dnia 12 czerwca 2013 do grupy środków spożywczych dla dzieci. Mimo że rynek obfituje w coraz nowsze rozwiązania, produkty dla niemowląt i dzieci możemy kategoryzować następująco: kaszki, mleka modyfikowane, dania obiadowe i zupki, desery i musy owocowe, soki i herbatki, ciasteczka i chrupaczki. Ugruntowaną pozycją na rynku i szerokim zainteresowaniem wśród konsumentów cieszą się desery i musy owocowe. Różnice między produktami dla dzieci a produktami przeznaczonymi dla dorosłych dotyczą ich składu,

sposobu wytwarzania oraz pakowania. Muszą one spełniać określone, często rygorystyczne wymagania prawne dotyczące między innymi jakości produktu (Kołodrub 2009). Do najbardziej niebezpiecznych zagrożeń żywności można zaliczyć występowanie mikroflory chorobotwórczej. Do najczęściej stosowanych i najbardziej efektywnych sposobów zmniejszenia ryzyka zatruc należą między innymi pasteryzacja, sterylizacja oraz zamrażanie. Ryzyko zakażenia bakteriami chorobotwórczymi może powstawać na każdym etapie od pozyskania surowca, poprzez niewłaściwą higienę sprzętu lub pracowników, niewłaściwą temperaturę utrwalania, produkcję, przechowywanie, transport, aż do uzyskania finalnego produktu gotowego na półkach sklepowych (Socha i in. 2015).

Prawodawstwo na świecie nie określa wielu wskaźników mikrobiologicznych, zapewniających bezpieczeństwo deserów owocowych dla dzieci i niemowląt. Komisja Naukowa ds. Zagrożeń Biologicznych Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności wydała opinię dotyczącą zagrożeń mikrobiologicznych w preparatach dla niemowląt i preparatach pochodnych. Za największe zagrożenie ww. Komisja uznała występowanie oraz objawy chorobowe powodowane przez dwa mikroorganizmy – *Salmonella* i *Cronobacter sakazakii*. Najczęstszym źródłem zatruc *Salmonellą* są surowe jaja, ale również produkty mięsne oraz słodocze. W krajach Unii Europejskiej od wielu lat salmonellozy znajdują się na drugim miejscu po kamylobakteriozie wśród zakażeń pokarmowych. W 2016 roku zaobserwowano znaczący wzrost zachorowań na salmonellozy w Polsce. Według analiz oraz raportów światowych zauważyć można zwiększenie liczby zgłoszeń wynikających z obecności *Salmonella* w mięsie drobiowym (Maćkiw i in. 2017). *Cronobacter sakazakii* należy do rodziny *Enterobacteriaceae*. Jest względnie beztlenową, Gram-ujemną, nieprzetrawialną pałeczką. *Cronobacter sakazakii* to patogen szczególnie niebezpieczny dla niemowląt. Jest przyczyną nekrotycznych zapaleń jelita i okrężnicy, sepsy oraz zapalenia opon mózgowych. Wywołuje infekcje prowadzące do ciężkich powikłań neurologicznych, na przykład wodogłowia oraz opóźnień w rozwoju układu nerwowego, co powoduje śmiertelność od 40% do 80% dzieci. Źródłem zakażenia niemowląt przez *Cronobacter sakazakii* jest mleko w proszku, kaszki oraz preparaty przeznaczone do żywienia niemowląt (Stasiak-Róžańska i in. 2010). Jako wskaźniki podczas badań częściej wykorzystywane są mikroorganizmy z rodziny *Enterobacteriaceae*, które powinny być monitorowane podczas produkcji, jak i w produkcie gotowym. *Enterobacteriaceae* to również gatunki bakterii środowiskowych, które nie stanowią zagrożenia dla zdrowia i życia ludzi. Występowanie tej rodziny bakterii w produktach żywnościowych jest wskazaniem do przeprowadzenia dalszych badań w celu wykrycia ewentualnych patogenów chorobotwórczych (Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005).

Gronkowiec wykazuje obecność w mikroflorze przejściowej rąk i błon śluzowych u 20–40% zdrowych ludzi. Do niebezpiecznych drobnoustrojów, występujących w produktach dla najmłodszych należy *Staphylococcus aureus*. Największym zagrożeniem dla organizmu ludzkiego są enterotoksyny gronkowcowe, które zaliczyć można do toksyn pirogennych, powodujących między innymi występowanie zatruc pokarmowych oraz zespół wstrząsu toksycznego (Podkowik i in. 2013). Enterotoksyny gronkowcowe biorą udział w patogenezie alergii i chorób autoimmunologicznych. Białka te mają wysoce stabilną strukturę, charakteryzując się odpornością na działanie niskiego pH oraz enzymów proteolitycznych, tj. pepsyny, trypsyny, renniny (chymozyny) i papainy, co sprawia, że zachowują aktywność biologiczną, przechodząc przez układ pokarmowy. Enterotoksyny gronkowcowe nie ulegają inaktywacji podczas obróbki cieplnej żywności, ponieważ cechują się wysoką termoopornością dzięki czwartorzędowej strukturze białek. Dotychczas opisano 23 enterotoksyny gronkowcowe, zaliczane do grupy superantygenów. Te, które zostały odkryte najwcześniej, określono jako klasyczne (Schubert i in. 2018). Wyżej wymieniona mikroflora stanowi znaczne ryzyko dla zdrowia niemowląt, w szczególności jeśli warunki bytowe po przygotowaniu umożliwiają swobodne rozmnażanie. Dlatego należy podjąć refleksję na temat, czy oferowane przez producentów desery nie zawierają szkodliwej dla zdrowia najmłodszych niepożądananej mikroflory?

Cel pracy

Celem pracy jest określenie liczby wybranych mikroorganizmów w deserach owocowych przeznaczonych dla niemowląt i dzieci. Sformułowano następujące hipotezy badawcze:

1. Skład produktu oraz producent mają wpływ na liczbę mikroorganizmów w deserach owocowych.
2. Desery owocowe nie zawierają niepożądananej mikroflory.

Cel pracy zrealizowano przy pomocy dostępnych źródeł literaturowych oraz na podstawie własnych badań mikrobiologicznych. Badania mikrobiologiczne przeprowadzono na wybranych deserach owocowych dostępnych na trójmiejskim rynku.

Materiały i metody

Materiał badawczy stanowiło 20 próbek deserów owocowych pochodzących od różnych producentów. Szczegółową charakterystykę materiału badawczego przedstawiono w Tab. 1. Wszystkie badane produkty przechowywane były na półkach sklepowych w temperaturze otoczenia.

Tab. 1. Charakterystyka badanych deserów.

Symbol	Nazwa	Wytwórca	Skład
A	Kubuś Mus	Maspex	Banan, jabłko, witamina C
B	Babydream	Rossmann SDP	Jabłko, banan, koncentrat soku z cytryny, kwas askorbinowy
C	Bobovita	NUTRICIA Polska	Jabłko, banan, witamina C
D	Gerber	Nestle	Gruszka, woda, banan, malina, musli, mąka owsiana, sok winogronowy zagęszczony, sok cytrynowy, witamina C
E	Gerber	Nestle	Jabłko, marchew, mango, sok z cytryny, witamina C
F	Gerber	Nestle	Jabłko, jagoda, banan, witamina C
G	HiPPiS	HIPP	Gruszka, jabłko, mango, sok z marakui
H	HiPPiS	HIPP	Jabłko, brzoskwinie, czarne jagody, maliny
I	HiPPiS	HIPP	Jabłko, banan, sok jabłkowy, truskawki, sok z czerwonych winogron, czarne porzeczki
J	Bobovita	NUTRICIA Polska	Jabłko, gruszka, morela, witamina C
K	Bobovita	NUTRICIA Polska	Jabłko, truskawka, burak, wiśnie
L	Bobovita	NUTRICIA Polska	Jabłko, mango, pomarańcza, burak
Ł	Gerber	Nestle	Jabłko, gruszka, malina, jagoda, witamina C
M	VitalFreshkids	Sokpol – Koncentraty	Jabłko, banan, truskawka, sok jabłkowy, witamina C
N	VitalFreshkids	Sokpol – Koncentraty	Jabłko, banan, gruszka, brzoskwinia, sok jabłkowy, witamina C
O	VitalFreshkids	Sokpol – Koncentraty	Jabłko, banan, sok jabłkowy, witamina C
P	Babydream	Rossmann SDP	Gruszka, banan, marchew karotka, mango, sok z cytryny, kwas askorbinowy
R	Babydream	Rossmann SDP	Jabłko, brzoskwinia, banan, mąka jaglana, sok z cytryny, kwas askorbinowy
S	Kubuś Mus + Jogurt	Maspex	Brzoskwinia, jabłko, banan, jogurt naturalny, kaszka ryżowa, zagęszczony sok jabłkowy
T	Kubuś Mus	Maspex	Banan, jabłko, truskawka, zagęszczony sok z jabłka i marchwi

Źródło: Opracowanie własne na podstawie etykiet produktów

Metodykę badawczą stanowiło oznaczenie liczebności mikroflory metodą płytkową przy użyciu pożywek stałych za pomocą posiewu zalewowego. W badanych próbach dokonano oznaczenia ogólnej liczby drobnoustrojów, bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, gronkowca oraz grzybów. Badania przeprowadzono w miesiącach maj – czerwiec w 2019 roku. Zastosowano następujące podłoża wzrostu:

- A. Agar z glukozą i ekstraktem drożdżowym dla ogólnej liczby bakterii mezofilnych tlenowych – czas inkubacji wynosił 48 h w temperaturze 30°C.
- B. Podłoże VRBG – agarowe z żółcią, czerwienią obojętną i fioletem krystalicznym (dla bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* – czas inkubacji wynosił 24 h w temperaturze 37°C (PN-EN ISO 21528-2:2017-08).
- C. Baird – Parker RPF firmy bioMérieux – do określenia liczebności populacji gronkowców potencjalnie chorobotwórczych (*Staphylococcus aureus*) na podłożu selektywnym. Czas inkubacji wynosił 48 h w temperaturze 37°C.
- D. Pożywka selektywna z chloramfenikolem YGC dla określenia liczby pleśni i drożdży metodą płytkową – czas inkubacji wynosił 120 h w temperaturze 25°C (PN-A-86034-07:1993).

Wyniki badań

W żadnej spośród 20 próbek nie wykryto obecności grzybów oraz bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*. W Tab. 2 zaprezentowano wyniki badań przedstawiające ogólną liczbę drobnoustrojów mezofilnych tlenowych.

Próbki „R” Babydream o składzie: jabłko, brzoskwinia, banan, mąka jaglana, sok z cytryny, kwas askorbinowy oraz „P” o składzie: gruszka, banan, marchew karotka, mango, sok z cytryny, kwas askorbinowy – charakteryzowały się liczbą bakterii mezofilnych tlenowych na poziomie 5×10^0 jtk/cm³. W Tab. 3 przedstawiono wyniki badań dotyczące liczby gronkowca w deserach owocowych.

Liczebność populacji *Staphylococcus aureus* w badanych próbkach kształtowała się na poziomie od 0 do $3,6 \times 10^2$ jtk/cm³, przy czym 75% badanych próbek charakteryzowało się obecnością < 10 jtk/cm³. Najwyższe zanieczyszczenie stwierdzono w próbce „D” Gerber o składzie gruszka, woda, banan, malina, musli, mąka owsiana, sok winogronowy zagęszczony, sok cytrynowy, witamina C. Natomiast w próbce „E” firmy Gerber o składzie jabłko, marchew, mango, sok z cytryny, witamina C liczebność gronkowca wyniosła $1,9 \times 10^2$ jtk/cm³. Próbka „F” tego samego producenta o składzie jabłko, jagoda, banan, witamina C zawierała $3,4 \times 10^2$ jtk/cm³ gronkowca. W próbce „I” HiPPiS o składzie: jabłko, banan, sok jabłkowy, truskawki, sok z czerwonych winogron, czarne porzeczki liczebność tych mikroorganizmów oscylowała na poziomie $7,5 \times 10^1$ jtk/cm³. W próbce „T”

Tab. 2. Ogólna liczba drobnoustrojów w badanych próbkach.

Symbol	Nazwa	OLD (ogólna liczba drobnoustrojów) [jtk/cm ³]
A	Kubuś Mus	< 10
B	Babydream	< 10
C	Bobovita	< 10
D	Gerber	< 10
E	Gerber	< 10
F	Gerber	< 10
G	HiPPiS	< 10
H	HiPPiS	< 10
I	HiPPiS	< 10
J	Bobovita	< 10
K	Bobovita	< 10
L	Bobovita	< 10
Ł	Gerber	< 10
M	VitalFreshkids	< 10
N	VitalFreshkids	< 10
O	VitalFreshkids	< 10
P	Babydream	5 x 10 ⁰
R	Babydream	5 x 10 ⁰
S	Kubuś Mus + Jogurt	< 10
T	Kubuś Mus	< 10

Źródło: Opracowanie własne

Kubuś o składzie banan, jabłko, truskawka, zagęszczony sok z jabłka i marchwi stwierdzono zanieczyszczenie gronkowcem na poziomie 1 x 10¹ jtk/cm³.

Dyskusja

W aktualnych wymaganiach prawnych nie określono maksymalnych obecności bakterii gronkowca w produktach owocowych przeznaczonych dla niemowląt i dzieci, dlatego uzyskane wyniki odniesiono do Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 13 stycznia 2003 r. w sprawie maksymalnych poziomów zanieczyszczeń chemicznych i biologicznych, które mogą znajdować się w żywności, składnikach żywności, dozwolonych substancjach dodatkowych, substancjach pomagających w przetwarzaniu albo na powierzchni żywności, dla półproduktów owocowych informuje, iż gronkowiec nie powinien być obecny w 0,1 g produktu. Pięć badanych prób charakteryzowało się liczbą na poziomie od 1 x 10¹ jtk/cm³ do 3,6 x 10² jtk/cm³. Dawka konieczna do wytworzenia tok-

Tab. 3. Liczba gronkowca w badanych próbach.

Symbol	Nazwa	Liczebność gronkowca [jtk/cm ³]
A	Kubuś Mus	< 10
B	Babydream	< 10
C	Bobovita	< 10
D	Gerber	3,6 x 10 ²
E	Gerber	1,9 x 10 ²
F	Gerber	3,4 x 10 ²
G	HiPPiS	< 10
H	HiPPiS	< 10
I	HiPPiS	7,5 x 10 ¹
J	Bobovita	< 10
K	Bobovita	< 10
L	Bobovita	< 10
Ł	Gerber	< 10
M	VitalFreshkids	< 10
N	VitalFreshkids	< 10
O	VitalFreshkids	< 10
P	Babydream	< 10
R	Babydream	< 10
S	Kubuś Mus + Jogurt	< 10
T	Kubuś Mus	1 x 10 ¹

Źródło: Opracowanie własne

syn, wywołujących objawy chorobowe wynosi 5×10^6 jtk/cm³. Zatem wykryte ilości w powyższych próbach nie stanowią zagrożenia. Część danych literaturowych informuje, że nawet mniejsze koncentracje toksyn *Staphylococcus aureus* mogą wywoływać poważne zmiany chorobowe, szczególnie dotyczy to mleka w proszku przeznaczonego dla niemowląt i małych dzieci (Stankiewicz 2009). Do żywności szczególnie narażonej na obecność gronkowca zaliczyć można mięso czerwone, mięso drobiowe i jego przetwory, ciasta, sałatki i produkty mleczne, ale także produkty garmażeryjne, narażone ze względu na kontakt z odkrytą powierzchnią ciała pracowników w czasie przygotowania oraz sprzedaży. Okres inkubacji podczas zatrucia gronkowcem wynosi od 30 min. do 8 h, wiąże się także z gwałtownym przebiegiem (Schubert i in. 2018). Objawy zatrucia gronkowcem to przede wszystkim wymioty, nudności, silne bóle brzucha oraz przewodu pokarmowego, ale także biegunka, podwyższona temperatura czy ogólne osłabienie. Zatrucia pokarmowe wywołane przez gronkowca od lat stanowią podstawowe zagrożenie w bakteryjnych zatruciach w Europie oraz

Stanach Zjednoczonych. Według nieoficjalnych danych, przypadków zarażenia gronkowcem jest jeszcze więcej, jednak ze względu na krótki czas trwania choroby duży odsetek chorych nie jest diagnozowanych. Objawy ustępują zazwyczaj po 24–48 h, natomiast hospitalizacji wymaga około 10% chorych, śmiertelność wśród nich oscyluje na poziomie 0,03%. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (European Food Safety Authority – EFSA) co roku publikuje dane na temat zatruc pokarmowych, opierając się na informacjach dostarczanych przez państwa Unii Europejskiej (Podkowik i in. 2015).

Biorąc pod uwagę wpływ producenta na liczebność mikroorganizmów, w 3 spośród 4 próbek firmy Gerber stwierdzono występowanie niepożądanego mikroflory. Za taki stan zanieczyszczenia odpowiadać może niezachowanie odpowiednich zasad higieny i bezpieczeństwa podczas procesu produkcyjnego, niewłaściwa higiena pracowników, sprzętu czy niezachowanie parametrów temperaturowych. Niektóre ze składników wykorzystanych w procesie produkcyjnym również mogły negatywnie wpłynąć na zwiększoną liczebność gronkowca. Jedną z próbek Gerber „D” zawierała w swoim składzie musli oraz mąkę owsianą. Są to produkty wysoko przetworzone, charakteryzujące się większą różnorodnością procesów manipulacyjnych w trakcie produkcji. Im większa liczba produktów dodana do produktu wyjściowego, tym większe zagrożenie zakażenia niepożądaną mikroflorą między innymi ze względu na właściwości indywidualne produktu. Według badań przeprowadzonych na 42 próbach deserów w słoiczkach przeznaczonych dla niemowląt po 4 m. ż., liczebność gronkowca kształtowała się na poziomie 0–1 x 10² jtk/cm³. W 19% prób stwierdzono skażenie gronkowcem na poziomie 1 x 10¹ jtk/cm³, natomiast 5% charakteryzowało się liczebnością wynoszącą 1 x 10² jtk/cm³. Były to desery zawierające owoce, mleko w proszku, mleko pełne w ilości 50%, skrobię ryżową oraz ryż w ilości 10% (Stankiewicz 2009).

Podsumowanie

Liczba *Staphylococcus aureus* w badanych deserach owocowych wynosiła od 0 do 3,6 x 10² jtk/cm³. Pięć spośród nich charakteryzowało się liczebnością *Staphylococcus aureus* na poziomie od 1 x 10¹ jtk/cm³ do 3,6 x 10² jtk/cm³. Ogólna liczba drobnoustrojów kształtowała się na poziomie od 0 do 5 x 10⁰ jtk/cm³. Dwie spośród nich charakteryzowały się liczebnością na poziomie 5 x 10⁰ jtk/cm³. W żadnej z badanych próbek nie stwierdzono obecności bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz grzybów.

Hipoteza dotycząca zawartości niepożądanego mikroflory została zweryfikowana negatywnie, ponieważ 5 spośród 20 badanych próbek charakteryzowało się

liczbą gronkowca na poziomie 1×10^1 jtk/cm³ do $3,6 \times 10^2$ jtk/cm³. Niebezpieczeństwo objawów chorobowych występuje w momencie przekroczenia dawki 5×10^6 jtk/cm³, a żadna z badanych prób nie charakteryzowała się tak wysokim stężeniem toksyn *Staphylococcus aureus*.

Hipoteza, która brzmiała, że skład produktu oraz producent wpływają na obecność mikroorganizmów w deserach owocowych została zweryfikowana pozytywnie. Dodatek w jednej z prób produktu wysoko przetworzonego pochodzenia zbożowego wpłynął na większą liczbę gronkowca, co mogło mieć związek z cechami indywidualnymi produktu. Biorąc pod uwagę liczbę gronkowca w zależności od producenta, 75% prób firmy Gerber charakteryzowało się liczbą gronkowca na poziomie od 1×10^1 jtk/cm³ do $3,6 \times 10^2$ jtk/cm³, co może być wynikiem niezachowania higieny, zasad bhp czy zaleceń podczas procesu produkcyjnego.

Literatura:

- Bona A. 2011. Jakość dań gotowych dla niemowląt oraz przyrządzanych samodzielnie w opinii matek i w świetle badań laboratoryjnych. Praca doktorska. Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu, Poznań.
- Jarosz M. 2014. Żywnienie wpływ na zdrowie człowieka. PZWL, Warszawa.
- Kołodrub M. 2009. Raport o polskim rynku żywności dla niemowląt i dzieci w okresie czerwiec 2007 – maj 2008, www.nutricia.com.pl/cliparts/press_ro (dostęp 12.05.2019 r.).
- Maćkiw E., Kowalska J., Stasiak M., Kucharek K. 2017. Pałeczki Salmonella – aktualne zagrożenia żywności. *Przemysł Spożywczy*, 71(10): 44–47.
- PN-EN ISO 21528-2:2017-08. Mikrobiologia łańcucha żywnościowego – Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby Enterobacteriaceae – Część 2: Metoda liczenia kolonii.
- PN-A-86034-07:1993. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Pleśnie i drożdże - oznaczanie liczby metodą płytkową w temperaturze 25°C.
- Podkowik M., Park J. Y., Seo K. S., Bystroń J., Bania J. 2013. Enterotoxigenic Potential of Coagulase-negative Staphylococci. *Int J Food Microbiol.*, 163(1): 34-40.
- Podkowik M., Schubert J., Bania J., Bystroń J. 2015. Enterotoksyny gronkowcowe w żywności – nowe zagrożenia. *Higiena żywności i pasz. Życie Weterynaryjne*, 90(5): 310-313.
- Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych (Tekst mający znaczenie dla EOG).

- Schubert J., Krakowiak S., Bania J. 2018. Wytwarzanie enterotoksyn gronkowcowych w żywności. *Med. Weter.*, 74(1): 16-22.
- Socha P., Mojska H., Stoś K., Przygoda B. 2015. Bezpieczeństwo żywności a potrzeby żywieniowe niemowląt i małych dzieci. Stowarzyszenie „Zdrowe Pokolenia”, Warszawa.
- Stankiewicz J. 2009. Występowanie gronkowców w żywności specjalnego przeznaczenia żywieniowego. *Akademia Morska w Gdyni, Bromat. Chem. Toksykol.*, 42(3): 578-582.
- Stasiak-Różańska L., Garbowska M., Berthold A., Molska I., Ciepielewska-Janus J. 2010. Jakość mikrobiologiczna preparatów do żywienia niemowląt i małych dzieci ze szczególnym uwzględnieniem Enterobacteriaceae i *E. sakazakii*, *Medycyna Wet.*, 66(9): 622-625.
- Weker H., Barańska M. 2014. Żywnienie niemowląt i małych dzieci. Instytut Matki i Dziecka, Warszawa.

ABSTRACT

SELECTED MICROFLORA OF DESSERTS INTENDED FOR BABIES AND CHILDREN

The aim of the study was to determine the levels of selected microorganisms in fruit desserts most common on the Polish market. The research material was 20 fruit desserts. The article formulates two research hypotheses. The first of these regarding the effect of product composition and type of producer on the presence of microorganisms has been positively verified. In the sample characterized by the increased presence of staph, there were muesli and oat flour belonging to the group of processed products, which could negatively affect the purity of the starting product. Considering the manufacturer, 75% of one manufacturer's samples were characterized by the highest number of *Staphylococcus aureus* bacteria, which may indicate that hygiene was not maintained during the production process. The second hypothesis, which said that fruit desserts do not contain undesirable microflora, was verified negatively. In five trials, the number of *Staphylococcus aureus* ranged from 1×10^1 CFU/cm³ to 3.6×10^2 .

Słowa kluczowe: mikrobiologia, badania, desery owocowe, niemowlęta i dzieci

Keywords: microbiology, research, fruit desserts, babies and children

Dane do kontaktu z autorem:

Kinga Zarębska

e-mail: kinga.zarebska@onet.pl

Urszula Zarzecka

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Wydział Nauki o Żywności

Naukowe Koło Mikrobiologii

Opiekun: dr inż. Wioleta Chajęcka-Wierzchowska

WYSTĘPOWANIE OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI I CZYNNIKÓW WIRULENCJI U SZCZEPÓW *ENTEROCOCCUS* IZOLOWANYCH Z ŻYWNOŚCI POCHODZENIA ZWIERZĘCEGO

Wstęp

Paciorkowce z rodzaju *Enterococcus* są naturalnymi komensalami przewodu pokarmowego zwierząt stałocieplnych. Są mikroorganizmami szeroko rozpowszechnionymi w środowisku naturalnym, gdzie przedostają się na skutek zanieczyszczenia fekalnego (Byappanahalli i in. 2012). Ich obecność w przewodzie pokarmowym zwierząt wiąże się z ryzykiem zanieczyszczenia mięsa w czasie uboju treścią jelitową, jeśli jest on prowadzony przy niedotrzymaniu zasad higieny. Dlatego też żywność pochodzenia zwierzęcego jest jednym z najczęstszych źródeł bakterii z rodzaju *Enterococcus*. Podaje się, że ze względu na odporność na zamrażanie, niskie pH i umiarkowaną obróbkę cieplną, enterokoki są powszechne na każdym etapie łańcucha pokarmowego (Fisher, Phillips 2009). Mogą kolonizować zarówno żywność surową, jak i gotową do spożycia. Często są przyczyną psucia się gotowanej żywności ze względu na ich zdolność do przetrwania obróbki cieplnej, szczególnie jeśli początkowo występowały w dużej liczbie (Giraffa 2002; Rouger i in. 2017). Przez dekady drobnoustroje te były uważane za niepatogenne. W ciągu ostatnich kilkunastu lat odnotowano jednak znaczny wzrost częstości zakażeń wywoływanych przez enterokoki, przede wszystkim w środowisku szpitalnym. Odpowiada za to wiele różnych czynników wirulencji, związanych ze zdolnością kolonizacji, właściwościami hemolitycznymi oraz agregacją do komórek gospodarza, za co odpowiadają kolejno: adhezyny, cytolizyna oraz białka Asa1 i Esp. Wykazano, że czynniki wirulencji mogą

występować nie tylko u szczepów klinicznych, ale także izolowanych z innych źródeł, na przykład żywności (Chajęcka-Wierzchowska i in. 2017).

Dane literaturowe wskazują, że enterokoki występujące w żywności są także często odporne na antybiotyki, przez co stają się ważnym środowiskowym rezerwuarem genów oporności na antybiotyki. Wykazują naturalną oporność na cefalosporyny, linkozamidy i aminoglikozydy w niskich stężeniach (Miller i in. 2014). Rodzaj *Enterococcus* charakteryzuje się także zdolnością do wymiany materiału genetycznego na drodze horyzontalnego transferu genów, zwłaszcza koniugacji (Chajęcka-Wierzchowska i in. 2019). Szczególnym zagrożeniem jest wzrost częstości występowania szczepów opornych na ampicylinę, wysoki poziom aminoglikozydów i glikopeptydy (Hollenbeck i Rice 2012). Determinanty oporności, a także czynniki wirulencji często są zlokalizowane na ruchomych elementach genetycznych. Te drobnoustroje, które wykazują zdolność nabywania dodatkowej informacji genetycznej, mają większe szanse na adaptację do zmiennych warunków środowiska. Tym samym przyczyniają się do rozpowszechniania w środowisku genów, które, jeśli zostaną pobrane przez drobnoustroje patogenne, mogą stanowić bezpośrednie zagrożenie życia i zdrowia ludzi (Peterson i Kaur 2018).

Cel pracy

Celem tego badania jest fenotypowe oznaczenie oporności na antybiotyki szczepów *Enterococcus* wyizolowanych z żywności pochodzenia zwierzęcego oraz określenie częstotliwości wybranych genów oporności dla tetracyklin, makrolidów i aminoglikozydów. Ponadto określono występowanie czynników wirulencji: żelatynazy, czynnika agregującego, białka powierzchniowego oraz cytolizyny poprzez analizę występowania genów kodujących te czynniki wirulencji: *gelE*, *asa1*, *esp* i *cytA*.

Materiały i metody

Izolacja i identyfikacja szczepów Enterococcus

Szczepy wyizolowane zostały z 20 próbek żywności pochodzenia zwierzęcego surowej i gotowej do spożycia (n = 10). Próbkę zakupiono w supermarketach na terenie Olsztyna i przetransportowano do laboratorium. Następnie próbki żywności (10 g) zhomogenizowano w 90 ml zbuforowanej wody peptonowej (Merck, Niemcy), inkubowano w 37°C/24 h i posiano izolacyjnie na selektywne podłoże Slanetz – Bartley (Merck, Niemcy). Inkubację prowadzono w 37°C przez 24 h. Następnie wybrano wszystkie kolonie o morfologii typowej dla

Enterococcus i kontynuowano izolacje do momentu uzyskania czystych kolonii. Wstępna identyfikacja przeprowadzona była przy pomocy barwienia metodą Grama, testu na obecność oksydazy cytochromowej i katalazy.

Identyfikację uzyskanych izolatów przeprowadzono za pomocą automatycznego systemu identyfikacji drobnoustrojów opartego na technologii MALDI TOF – VITEK MS (bioMérieux), a uzyskane widma porównywano z bazą danych VITEK MS SARAMIS do celów badawczych (Research Use Only – RUO). Identyfikacja została uznana za ostateczną, gdy podane prawdopodobieństwo było większe niż 90%. W celu analizy MALDI-TOF MS izolaty przesiano na agar tryptonowo-sojowy (Tryptic Soy Agar – TSA) (Merck, Niemcy), inkubowano przez 24 h w 37°C, a następnie jedną kolonię naniesiono na jedno pole płytki testowej za pomocą jednorazowej ezy, w celu zniszczenia ściany komórkowej naniesiono 0,5 µl kwasu mrówkowego, a następnie 1 µl roztworu matrycy (kwas α -cyjano-4-hydroksy-cynamonowy) i wysuszono na powietrzu. Szczep referencyjny *Escherichia coli* ATCC 8739 zastosowano jako kontrolę pozytywną do walidacji metody. Wszystkie izolaty testowano w dwóch powtórzeniach.

Oporność na antybiotyki

Antybiogramy wykonano metodą dyfuzyjno-krażkową na agarze Mueller-Hinton (Merck, Niemcy). Do analizy wybrano trzynaście antybiotyków rekomendowanych przez Krajowy Ośrodek Referencyjny ds. Lekowrażliwości Drobnoustrojów: ampicylina 10 µg (AMP), gentamycyna 120 µg (CN), streptomycyna 300 µg (S), teikoplanina 30 µg (TEC), wankomycyna 30 µg (VAN), erytromycyna 15 µg (E), chinuprystyna/dalfoprystyna 15 µg (QD), tetracyklina 30 µg (TE), tigecyklina 30 µg (TGC), chloramfenikol 30 µg (C), rifampicylina 5 µg (RD), linezolid 30 µg (LZD) i nitrofurantoina 300 µg (F). Po inkubacji przez 24 h w 37°C zmierzono średnice stref zahamowania wzrostu i odniesiono je do wytycznych Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2018).

Izolacja genomowego DNA

Izolacji DNA poddano wszystkie analizowane szczepy *Enterococcus*. Namnożono je na podłożu TSA (Merck, Niemcy) w temperaturze 37°C przez 24 h. Izolację DNA poprzedzono wstępnym trawieniem ściany komórkowej roztworem lizozymu w temperaturze 37°C przez 20 min. Właściwą izolację genomowego DNA przeprowadzono za pomocą zestawu do izolacji i oczyszczania genomowego DNA – Genomic Mini DNA (A&A Biotechnology, Polska), zgodnie z instrukcjami producenta. Otrzymane DNA zawieszono w 200 µl buforu Tris-HCl (10 mM, pH 8,5) i przechowywano w temperaturze –20°C do dalszej analizy.

Występowanie genów oporności na antybiotyki oraz czynników wirulencji

Obecność genów odpowiedzialnych za występowanie czynników wirulencji oznaczano u wszystkich izolatów. Wybrano geny kodujące następujące czynniki: żelatynaza (*gelE*), enterokokowe białko powierzchniowe (*esp*), substancja agregująca (*asa1*) oraz operon cytolizyny (*cylA*). Geny te amplifikowano za pomocą reakcji Multiplex PCR wykorzystując opublikowane specyficzne startery i warunki reakcji (Shafeek i in. 2018). Geny oporności na antybiotyki oznaczano jedynie dla izolatów wykazujących fenotypową oporność na dany antybiotyk. U wszystkich izolatów opornych na tetracyklinę sprawdzono obecność genów *tet(L)* i *tet(M)*. Obecność genów *tet(M)* i *tet(L)* określono metodą Multiplex PCR zgodnie ze starterami i warunkami opisanymi przez Roberts (1994). Dla wszystkich izolatów opornych na aminoglikozydy określono obecność genów

Tab. 1. Primery wykorzystane w badaniu.

Gen	Sekwencja primera 5'-3'	Wielk. prod. (bp)	Źródło
<i>tet(M)</i>	F: GTGGACAAAGGTACAACGAG R: CGGTAAAGTTCGTACACAC	406	Roberts 1994
<i>tet(L)</i>	F: TGGTGAATGATAGCCCATT R: CAGGAATGACAGCACGCTAA	229	
<i>aac-Ie-aph(2'')-Ia</i>	F: CAGGAATTTATCGAAAATGGTAGAAAAG R: CACAATCGACTAAAGAGTACCAAT	369	Padmasini i in. 2014
<i>aph(3'')-IIIa</i>	F: GGCTAAAATGAGAARARCACCGG R: CTTTAAAAAATCATAACAGATCGCG	523	
<i>erm(A)</i>	F: TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA R: CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	645	Młynarczyk i in. 2006
<i>erm(B)</i>	F: TGGTATTCCAAATGCGTAATG R: CTGTGGTATGGCGGGTAAGT	745	
<i>erm(C)</i>	F: TCAAACATAATATAGATAAA R: GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT	642	
<i>msr(A/B)</i>	F: GCAAATGGTGTAGGTAAGACAAC R: ATCATGTGATGTAAACAAAAT	399	
<i>gelE</i>	F: TATGACAATGCTTTTTGGGAT R: AGATGCACCCGAAATAATATA	213	Shafeek i in. 2018
<i>asa1</i>	F: GCACGCTATTACGAACTATGA R: TAAGAAAGAACATCACCACGA	375	
<i>esp</i>	F: AGATTTCATCTTTGATTCTTGG R: AATTGATTCTTTAGCATCTGG	510	
<i>cylA</i>	F: ACTCGGGGATTGATAGGC R: GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688	

Źródło: Opracowanie własne

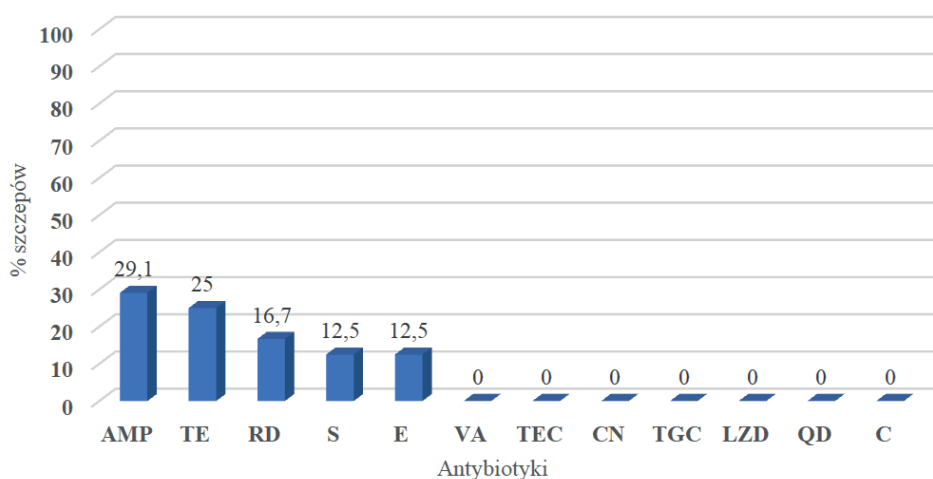
aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia i *aph(3')-IIIa* według Padmasini i in. (2014). Wszystkie izolaty odporne na makrolidy sprawdzono pod kątem obecności genów *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)* i *msr(A/B)* zgodnie z procedurą przedstawioną przez Młynarczyk i in. (2006). Informacje o primerach wykorzystanych w badaniu zestawiono w tabeli (Tab. 1). Wyniki reakcji PCR oceniano za pomocą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny (0,5 mg/ml) (Sigma-Aldrich) i wizualizowano w systemie do dokumentacji żeli Gbox (Syngene).

Wyniki

Z 20 próbek żywności wyizolowano 24 szczepy enterokoków. Najwięcej szczepów (n = 20, 83,3%) wyizolowano z próbek surowego mięsa, 75% izolatów została zidentyfikowana jako *Enterococcus faecalis*, 25% szczepów należało do gatunku *Enterococcus faecium*.

Oporność na co najmniej jeden antybiotyk zaobserwowano w 11 izolatach (45,8%). Najczęściej obserwowano oporność na ampicylinę (29,1%); 25% izolatów było opornych na tetracyklinę. Żaden ze szczepów nie wykazywał oporności na wankomycynę, teikoplaninę, gentamycynę, tigececyklinę, linezolid, chinuprystynę/dalfoprystynę i chloramfenikol (Ryc. 1).

Ryc. 1. Antybiotykooporność analizowanych szczepów z rodzaju *Enterococcus*.

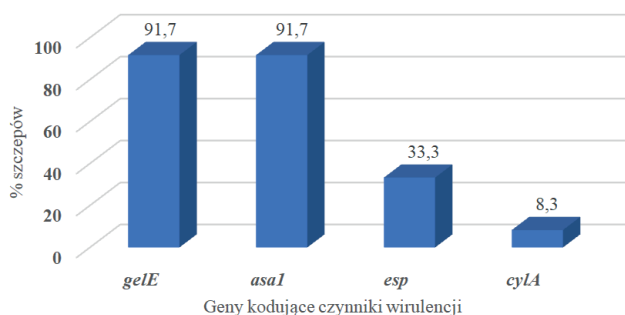


AMP – ampicylina, TE – tetracyklina, RD – rifampicyna, S – streptomycyna, E – erytromycyna, VA – wankomycyna, TEC – teikoplanina, CN – gentamycyna, TGC – tigececyklina, LZD – linezolid, QD – chinuprystyna/dalfoprystyna, C – chloramfenikol.

Źródło: Opracowanie własne

U badanych szczepów najczęściej stwierdzano obecność żelatynazy kodowanej przez gen *gelE* oraz substancji agregującej kodowanej przez gen *asa1*, które stwierdzono u 22 szczepów (91,7%). U 8 szczepów (33,3%) stwierdzono obecność genu *esp* odpowiedzialnego za występowanie białka powierzchniowego enterokoków, z kolei 2 szczepy (8,3%) posiadały gen *cytA* kodujący aktywator cytolizyny. Jedynie 2 szczepy nie były nosicielami żadnego z analizowanych czynników wirulencji (Ryc. 2).

Ryc. 2. Częstość występowania u badanych szczepów genów kodujących czynniki wirulencji.



Źródło: Opracowanie własne

Spośród wszystkich analizowanych genów oporności najczęściej występowały geny oporności na tetracykliny *tet(M)* i *tet(L)* obecne we wszystkich

Tab. 2. Wyniki analizy antybiotykooporności i występowania genów oporności u analizowanych szczepów.

Gatunek (liczba izolatów)	Oporność na antybiotyki	Geny oporności	Liczba izolatów	Źródło izolacji (liczba izolatów)
<i>E. faecalis</i> (10)	TE	<i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i>	3	Surowe mięso (2), wędlina (1)
	S, E, TE	<i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>erm(B)</i>	1	Surowe mięso (1)
	AMP, RD	–	3	Surowe mięso (3)
	AMP, S, RD	<i>aph(3')</i> -IIIa	1	Surowe mięso (1)
	AMP, E, TE	<i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>erm(B)</i>	1	Surowe mięso (1)
	AMP, S, E, TE	<i>tet(M)</i> , <i>tet(L)</i> , <i>erm(B)</i>	1	Surowe mięso (1)
<i>E. faecium</i> (1)	AMP	–	1	Wędlina (1)

Źródło: Opracowanie własne

izolatów opornych na tetracyklinę. Gen *tet(K)* nie był obecny w żadnym z nich. W jednym izolacie fenotypowo opornym na streptomycynę znaleziono tylko jeden gen determinujący oporność na aminoglikozydy – *aph(3')-IIIa*. Wyniki analizy oporności fenotypowej wraz z genami determinującymi oporność wymieniono w Tab. 2.

Dyskusja

W dostępnych badaniach dotyczących żywności pochodzenia zwierzęcego autorzy sugerują, że często jest ona źródłem szczepów należących do rodzaju *Enterococcus*, najczęściej stanowiących mikroflorę surowej oraz minimalnie przetworzonej żywności. W niniejszym badaniu bakterie z rodzaju *Enterococcus* były obecne we wszystkich badanych próbkach surowego mięsa i w 40% próbek wędlin. Szczepy wyizolowane z badanych próbek żywności zidentyfikowano jako należące do gatunków *E. faecalis* i *E. faecium*. Yılmaz i in. (2016) wykazali, że gatunkami najczęściej izolowanymi z mięsa były *E. faecalis*, *E. faecium*, a następnie *E. hirae*, podobne wyniki uzyskali Liu i in. (2012). Z kolei Demirgül i Tuncer (2017) podali, że zdecydowana większość izolatów uzyskanych przez nich z mięsa i wędlin została zidentyfikowana jako *E. faecium*.

Dane dotyczące antybiotykooporności *Enterococcus* spp. pochodzących z żywności pochodzenia zwierzęcego wskazują, że większość szczepów izolowanych z tego źródła jest oporna na erytromycynę, tetracyklinę i wysokie stężenia aminoglikozydów, oporność na wankomycynę jest rzadko obserwowana, co częściowo jest zgodne z wynikami uzyskanymi w tej pracy (Chajęcka-Wierzchowska i in. 2016; Pesavento i in. 2014). Najwyższy odsetek szczepów wykazał oporność na ampicylinę (29,1%). Ten wynik nie znajduje odzwierciedlenia w wynikach uzyskanych przez innych badaczy, którzy rzadko stwierdzali oporność na antybiotyki β -laktamowe (Chajęcka-Wierzchowska i in. 2012). Spośród 24 szczepów 6 (25%) wykazało oporność na tetracyklinę. Może to wynikać z tego, że tetracykliny są grupą antybiotyków powszechnie stosowanych w medycynie weterynaryjnej w leczeniu zakażeń zwierząt, co jest przyczyną presji selekcyjnej prowadzącej do indukcji oporności (Chopra i Roberts 2001).

Ponieważ wyizolowano znacznie większą liczbę szczepów należących do gatunku *E. faecalis* niż *E. faecium*, nie można przeprowadzić wiarygodnej analizy statystycznej, aby stwierdzić, czy występowały istotne statystycznie różnice w częstości występowania genów oporności na antybiotyki u szczepów z różnych gatunków. Inne badania dotyczące enterokoków izolowanych

z żywności pochodzenia zwierzęcego wykazały, że częstość występowania oporności wśród *E. faecium* i *E. faecalis*, a także innych gatunków była podobna (Chajęcka-Wierzchowska i in. 2016). Na podstawie uzyskanych wyników można jednak stwierdzić, że szczepy izolowane z próbek surowej żywności wykazały szerszy zakres oporności niż szczepy izolowane z przetworzonej żywności. Podobny związek wykazali w swoich badaniach Pesavento i in. (2014). Badane szczepy były nosicielami 5 różnych determinant oporności. Najczęściej stwierdzano obecność genów *tet(M)* i *tet(L)*, które obecne były we wszystkich izolatach wykazujących fenotypową oporność na tetracyklinę. Z wysoką częstością oznaczany był też gen kodujący oporność na makrolidy – *erm(B)*. Uzyskane wyniki znajdują odzwierciedlenie w pracach innych badaczy (Igbinsa i Beshiru 2019; Yilmaz i in. 2016).

Częstość występowania czynników wirulencji u analizowanych szczepów była wysoka – 91,7% izolatów było nosicielem genu *gelE* i/lub *asa1*. Igbinsa i Beshiru uzyskali odmienne wyniki – najczęściej występującym czynnikiem wirulencji w ich badaniu był gen *esp*, zaś *gelE* był jednym z najrzadziej oznaczanych. Barbosa i in. (2010) jako najczęściej występujący gen kodujący czynniki wirulencji wskazali gen *agg*. Z kolei podobne wyniki do przedstawionych w niniejszym badaniu uzyskali Jahan i Holley (2014).

Żywność będąca nośnikiem opornych na antybiotyki, wirulentnych bakterii może stać się bardzo ważnym wektorem oporności na antybiotyki w środowisku. Chociaż rola bakterii z rodzaju *Enterococcus* w wywoływaniu infekcji u ludzi wzrosła w ostatnich latach, jest nadal stosunkowo niska. Ich wysoka zdolność do pozyskiwania i przekazywania materiału genetycznego wiąże się jednak z niebezpieczeństwem pozyskania genów kodujących oporność na antybiotyki oraz czynniki wirulencji. Może to mieć bezpośredni wpływ na zdrowie ludzi, ponieważ wiąże się z utrudnioną lub nawet niemożliwą skuteczną terapią antybiotykową (Ventola 2015).

Podsumowanie

Analiza wyników uzyskanych w tym badaniu wskazuje na wysoką częstość występowania opornych na antybiotyki i wirulentnych szczepów *Enterococcus* w żywności pochodzenia zwierzęcego. Częstość występowania analizowanych determinantów oporności i wirulencji była wysoka, w badanych izolatach znaleziono szereg różnych genów. Uzyskane wyniki wskazują na potrzebę monitorowania żywności pochodzenia zwierzęcego pod kątem obecności szczepów *Enterococcus* opornych na antybiotyki oraz posiadających czynniki wirulencji, a także ich zdolności do przekazywania posiadanych genów. Ze względu na

to, że obecność enterokoków w żywności jest wynikiem zanieczyszczenia fekalnego, szczególnie ważne jest monitorowanie higieny osób zaangażowanych w produkcję żywności i łańcuch dostaw.

Literatura:

- Barbosa J., Gibbs P. A., Teixeira P. 2010. Virulence Factors among Enterococci Isolated from Traditional Fermented Meat Products Produced in the North of Portugal. *Food Cont.*, 21(5): 651-656.
- Byappanahalli M. N., Nevers M. B., Korajkic A., Staley Z. R., Harwood V. J. 2012. Enterococci in the Environment. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 76(4): 685-706.
- Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Łaniewska-Trokenheim Ł. 2016. Diversity of Antibiotic Resistance Genes in *Enterococcus* Strains Isolated from Ready-to-Eat Meat Products. *J. Food Sci.*, 81(11): M2799-M2807.
- Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Łaniewska-Trokenheim Ł. 2017. Virulence Factors of *Enterococcus* spp. Presented in Food. *LWT – Food Sci. Tech.*, 75: 670-676.
- Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Nalepa B., Łaniewska-Trokenheim Ł. 2012. Occurrence and Antibiotic Resistance of Enterococci in Ready-to-eat food of Animal Origin. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 6(39): 6773-6780.
- Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Zarzecka U., Zakrzewski A., Gajewska J. 2019. Enterococci from Ready-to-eat food – Horizontal Gene Transfer of Antibiotic Resistance Genes and Genotypic Characterization by PCR Melting Profile. *J. Sci. Food Agric.*, 99(3): 1172-1179.
- Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 65(2): 232-260.
- Demirgül F., Tuncer Y. 2017. Detection of Antibiotic Resistance and Resistance Genes in Enterococci Isolated from Sucuk, a Traditional Turkish Dry-Fermented Sausage. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, 37(5): 670-681.
- Fisher K., Phillips C. 2009. The Ecology, Epidemiology and Virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155(6): 1749-1757.
- Giraffa G. 2002. Enterococci from Foods. *FEMS Microbiol. Rev.*, 26(2): 163–171.
- Hollenbeck B. L., Rice L. B. 2012. Intrinsic and Acquired Resistance Mechanisms in *Enterococcus*. *Virulence*, 3(5): 421-433.
- Igbinosa E. O., Beshiru A. 2019. Antimicrobial Resistance, Virulence Determinants, and Biofilm Formation of Enterococcus Species From Ready-to-Eat Seafood. *Front microbiol.*, 10: 728.

- Jahan M., Holley R. A. 2014. Incidence of Virulence Factors in Enterococci from Raw and Fermented Meat and Biofilm Forming Capacity at 25°C and 37°C. *Int. J. Food Microbiol.*, 170: 65-69.
- Liu Y., Liu K., Lai J., Wu C., Shen J., Wang Y. 2012. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus species* of Food Animal Origin from Beijing and Shandong Province, China. *J. Appl. Microbiol.*, 114: 555-563.
- Miller W. R., Munita J. M., Arias C. A. 2014. Mechanisms of Antibiotic Resistance in Enterococci. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 12(10): 1221-1236.
- Młynarczyk G., Młynarczyk A., Szymanek K., Łuczak M. 2006. Częstość występowania genów *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *msr(A/B)* u metycyliny-opornych klinicznych szczepów *Staphylococcus aureus* opornych na erytromycynę izolowanych w Polsce. *Med. Dośw. Mikrobiol.*, 58: 183-190.
- Padmasini E., Padmaraj R., Ramesh S. S. 2014. High Level Aminoglycoside Resistance and Distribution of Aminoglycoside Resistant Genes among Clinical Isolates of *Enterococcus Species* in Chennai, India. *The Scientific World Journal*, 2014(1): 329157.
- Pesavento G., Calonico C., Ducci B., Magnanini A., Lo Nostro A. 2014. Prevalence and Antibiotic Resistance of *Enterococcus spp.* Isolated from Retail Cheese, Ready-to-eat salads, Ham, and Raw Meat. *Food Microbiol.*, 41: 1-7.
- Peterson E., Kaur P. 2018. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Front. microbiol.*, 9: 2928.
- Roberts M. C. 1994. Epidemiology of Tetracycline Resistance Determinants. *Trends Microbiol.*, 2: 353-357.
- Rouger A., Tresse O., Zagorec M. 2017. Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. *Microorganisms*, 5(3): 50.
- Shafeek M., El-Malt L., Abdel Hameed K., El-Zamkan M. 2018. Some Virulence Genes of Pathogenic Enterococci Isolated from Raw Milk and Some Milk Products. *SVU-IJVS*, 1(1): 102-113.
- Ventola C. L. 2015. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *P T*, 40(4): 277-283.
- Yilmaz E. S., Aslantas Ö., Pehlivanlar Önen S., Türkyilmaz S., Kürekci C. 2016. Prevalence, Antimicrobial Resistance and Virulence Traits in Enterococci from Food of Animal Origin in Turkey. *LTW-Food Sci. Technol.*, 66: 20-26.

ABSTRACT

OCCURRENCE OF ANTIBIOTIC RESISTANCE AND VIRULENCE FACTORS IN *ENTEROCOCCUS* STRAINS ISOLATED FROM FOOD OF ANIMAL ORIGIN

The aim of the study was to determine the antibiotic resistance of enterococci isolated from food of animal origin, frequency of resistance and virulence genes. Twenty four *Enterococcus* strains were isolated of which 11 (45.8%) were resistant to at least one antibiotic. Most of them were resistant to ampicillin – 29.1% and tetracycline – 25%. The *tet(M)*, *tet(L)* and *erm(B)* genes were the most frequent. The *gelE* and *asaI* genes were present in 91.7% of the strains, 33.3% of the strains had *esp* gene and 8.3% – *cylA*. Obtained results indicate that food of animal origin can be an important source of antibiotic resistant and virulent *Enterococcus* strains so there is need for strict hygiene measures to eliminate these bacteria from food, thereby reducing the risk of transmission from food to humans.

Słowa kluczowe: *Enterococcus*, antybiotykooporność, czynniki wirulencji, żywność pochodzenia zwierzęcego

Keywords: *Enterococcus*, antibiotic resistance, virulence factors, food of animal origin

Dane do kontaktu z autorem:

Urszula Zarzecka

E-mail: urszula.zarzecka@uwm.edu.pl

Julia Ziajka

Uniwersytet Morski w Gdyni

Wydział Przedsiębiorczości i Towaroznawstwa

Naukowe Koło Towaroznawstwa „Cargo”

Opiekun: dr hab. inż. Przemysław Dmowski, prof. UMG

MLEKO MODYFIKOWANE DLA NIEMOWLĄT – ŚWIADOMY WYBÓR CZY MODEL KARMIENIA POWIELANY PRZEZ POKOLENIA?

Wstęp

Mleko modyfikowane od kilkadziesiąt lat stanowi zamiennik mleka kobiecego. Trendy w karmieniu zmieniały się na przestrzeni dziesięcioleci. W wyniku kampanii popularyzujących karmienie piersią można zauważyć rosnącą liczbę matek karmiących naturalnie. Pomimo takiego zjawiska modyfikowane mleko w proszku dla niemowląt wciąż jest powszechnie stosowane. Głównym powodem wyboru mleka dla niemowląt jest brak pokarmu. Matki czasami świadomie rezygnują z karmienia naturalnego kolejnego dziecka ze względu na złe doświadczenia podczas karmienia piersią pierwszego. Częstym powodem jest również niechęć lub obrzydzenie w stosunku do karmienia naturalnego. Modyfikowane mleko w proszku należy do koncentratów mlecznych, które uzyskuje się z mleka krowiego w wyniku częściowego lub prawie całkowitego odparowania wody. Zostało ono opracowane przez niemiecko-szwajcarskiego farmaceutę Henriego Nestle wraz z jego przyjacielem, szwajcarskim naukowcem, zajmującym się żywieniem człowieka Jeanem Balthasarem Schnetzlerem. Było ono jednym z pierwszych pełnowartościowych posiłków stworzonych dla niemowląt. Powstało z alpejskiego mleka i ziaren pszenicy.

Proces produkcji mleka w proszku, ze względu na różnice występujące między mlekiem kobiecym a krowim, należy do procesów skomplikowanych. Pierwszym etapem obróbki surowca jest jego oczyszczenie oraz normalizacja stężenia tłuszczu zwierzęcego do 6,4%. Następnie mleko jest pasteryzowane i zagęszczane do wzrostu zawartości suchej masy w produkcji z 9–12% do

25–50%. Na kolejnym poziomie produkcji dodaje się tłuszcz roślinny oraz witaminy E i A (Ziajka 1997; Gawęcki 2010). Ze względu na wysoką zawartość węglowodanów w mleku kobiecym istnieje konieczność uzupełnienia ilości laktozy w mleku dla niemowląt. Przedostatnim etapem obróbki jest wyrównanie stosunku wapnia do potasu oraz zredukowanie stężenia sodu i chloru. W produkcji zwiększa się również stężenie żelaza i cynku. Gdy mleko zagęszczone zostanie wysuszone do zawartości suchej masy wynoszącej od 95–97%, produkt jest gotowy do pakowania (Ziajka 1997).

Cel pracy

Celem badania jest ocena stopienia akceptacji mleka modyfikowanego dla niemowląt jako sposobu karmienia niemowląt oraz przyczyn jego stosowania. W badaniu poruszono również konsekwencje stosowania mleka niemodyfikowanego jako sposób karmienia niemowląt. W toku badań sformułowano hipotezę badawczą traktującą, że matki były świadome swoich wyborów.

Materiał i metody

Badanie przeprowadzono na podstawie metody ankietowej (internetowa ankieta pośrednia) wśród losowo wybranych matek w przedziale wiekowym 18–40 z 16 województw Polski. W badaniu wzięło udział odpowiednio: w grupie wiekowej 18–20 (10 osób), 21–25 (30 osób), 26–30 (20 osób), 31–35 (20 osób) oraz 36–40 (również 20 osób). Czynnikiem różnicującym ankietowane był wiek, w którym urodziły pierwsze dziecko. Łącznie w badaniu wzięło udział 100 kobiet.

Formularz ankiety zawierał łącznie 11 pytań (w tym pytania otwarte oraz zamknięte jednokrotnego wyboru). Pierwsze cztery pytania dotyczyły znajomości rodzajów mleka w proszku (rozdzielenia mleka modyfikowanego i niemodyfikowanego). Zapytano również o sposób karmienia niemowląt, a także, w przypadku uzupełniania diety dziecka o mleko modyfikowane – o przyczynę stosowania. Ankieta zawierała także pytania dotyczące wiedzy na temat konsekwencji stosowania mleka niemodyfikowanego jako uzupełnienia mleka modyfikowanego.

Wyniki badań

Wstęp kwestionariusza miał na celu ustalenie zdolności ankietowanych kobiet do rozróżniania rodzajów mleka w proszku (mleka modyfikowanego od niemodyfikowanego).

W Tab. 1 przedstawiono wyniki dotyczące umiejętności rozpoznawania rodzajów mleka w proszku przez respondentki. Ankietywane deklarowały wiedzę na temat rodzajów mleka w proszku (modyfikowanego i niemodyfikowanego).

Tab. 1. Znajomość rodzajów mleka w proszku.

Grupa respondentów	Kryterium cechy	Procent odpowiedzi dotyczącej znajomości rodzajów mleka w proszku	
		Modyfikowane mleko w proszku	Niemodyfikowane mleko w proszku
18–20	Odpowiedź pozytywna	60	60
	Odpowiedź negatywna	40	40
21–25	Odpowiedź pozytywna	87	80
	Odpowiedź negatywna	13	20
26–30	Odpowiedź pozytywna	80	80
	Odpowiedź negatywna	20	20
31–35	Odpowiedź pozytywna	60	60
	Odpowiedź negatywna	40	40
36–40	Odpowiedź pozytywna	80	80
	Odpowiedź negatywna	20	20

Źródło: Opracowanie własne

Większość ankietowanych odpowiedziała, że jest w stanie wyróżnić poszczególne rodzaje mleka w proszku. Największy odsetek odpowiedzi pozytywnych można zauważyć w grupie matek, które urodziły swoje pierwsze dziecko w wieku 21–25 (87%), 26–30 (80%) oraz 36–40 (80%). Z kolei najmniej odpowiedzi pozytywnych zostało udzielonych w grupie 18–20 (60%) oraz 31–35 (60%).

Tab. 2. Weryfikacja opinii badanych z Tab. 1

Wyniki zaprezentowane w Tab. 2 znacząco różnią się od wartości przedstawionych w Tab. 1. Osoby ankietowane, które były w grupie osób, które urodziły swoje pierwsze dziecko w wieku 18–20 prawidłowo wskazały zdjęcia przedstawiające mleko modyfikowane i niemodyfikowane. Taka sama sytuacja miała miejsce w grupie wiekowej 31–35 oraz 36–40. Matki, które urodziły pierwsze dziecko w wieku 21–25 lat, jako jedyna grupa, zadeklarowały znajomość mleka modyfikowanego i odpowiednio wskazały mleko modyfikowane na zdjęciu (87%). Otrzymały one jednak wyższy wynik podczas rozpoznawania mleka niemodyfikowanego (aż 87% w porównaniu z 80% podczas deklarowania umiejętności rozpoznawania rodzajów mleka). Dużą zdolnością do rozróżniania mleka modyfikowanego wykazały się mamy, które urodziły pierwsze dziecko w przedziale wiekowym 26–30. Osiągnęły one wynik 90% prawidłowych wska-

Tab. 2. Weryfikacja wiedzy ankietowanych na temat rodzajów mleka w proszku.

Grupa respondentów	Kryterium cechy	Procent wskazań wybranego zdjęcia reprezentującego dany rodzaj mleka w proszku	
		Modyfikowane mleko w proszku	Niemodyfikowane mleko w proszku
18–20	Odpowiedź prawidłowa	100	100
	Odpowiedź negatywna	0	0
21–25	Odpowiedź prawidłowa	87	87
	Odpowiedź negatywna	13	13
26–30	Odpowiedź prawidłowa	90	80
	Odpowiedź negatywna	10	20
31–35	Odpowiedź prawidłowa	100	100
	Odpowiedź negatywna	0	0
36–40	Odpowiedź prawidłowa	100	100
	Odpowiedź negatywna	0	0

Respondentki zostały poproszone o wskazanie zdjęcia przedstawiającego odpowiedni rodzaj mleka w proszku.

Źródło: Opracowanie własne

zań dla mleka modyfikowanego, przy deklarowaniu zdolności do rozpoznawania rodzajów mleka w proszku na poziomie 80%. W przypadku rozpoznania niemodyfikowanego mleka w proszku osiągnięto wynik 80% prawidłowych wskazań, który był proporcjonalny do wyniku otrzymanego podczas deklaracji umiejętności odróżniania mleka modyfikowanego od niemodyfikowanego (Tab. 1).

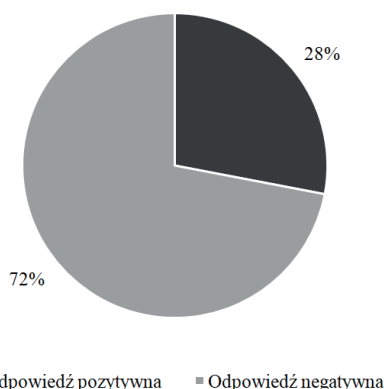
Na Rys. 1 przedstawiono rozkład procentowy respondentek, które odpowiedziały na pytanie dotyczące wyłączności karmienia mlekiem kobiecym.

Wśród ankietowanych kobiet 28% zadeklarowało, że karmiło dziecko wyłącznie mlekiem kobiecym, podczas gdy 72% matek stosowało również mleko w proszku. Rozkład danych procentowych dla poszczególnych przedziałów wiekowych dotyczący karmienia naturalnego oraz sztucznego został zaprezentowany w Tab. 3.

Tylko 10% kobiet, które urodziły pierwsze dziecko w wieku 36–40 karmiło wyłącznie naturalnie. Był to najniższy wynik uzyskany pośród wszystkich grup wiekowych w odniesieniu do karmienia mlekiem kobiecym. Wyższymi wynikami charakteryzowały się grupy wiekowe 18–20 i 21–25 odpowiednio 20% oraz 26%. Przedziały wiekowe 26–30 i 31–35 osiągnęły wynik wynoszący 40%.

Około $\frac{3}{4}$ (72%) ankietowanych potwierdziło stosowanie modyfikowanego mleka w proszku dla niemowląt jako zamiennik lub uzupełnienie karmienia piersią podczas żywienia dzieci. Podczas, gdy 28% procent respondentek nigdy

Rys. 1. Czy podczas karmienia niemowlęcia stosowała Pani wyłącznie mleko kobiece?



Źródło: Opracowanie własne

Tab. 3. Popularność karmienia mlekiem kobiecym (karmienie naturalne) i mlekiem w proszku (karmienie sztuczne) w wybranych grupach wiekowych.

Grupa respondentów	Kryterium cechy	Wartość (%)
18–20	Karmienie naturalne	20
	Karmienie sztuczne	80
21–25	Karmienie naturalne	26
	Karmienie sztuczne	74
26–30	Karmienie naturalne	40
	Karmienie sztuczne	60
31–35	Karmienie naturalne	40
	Karmienie sztuczne	60
36–40	Karmienie naturalne	10
	Karmienie sztuczne	90

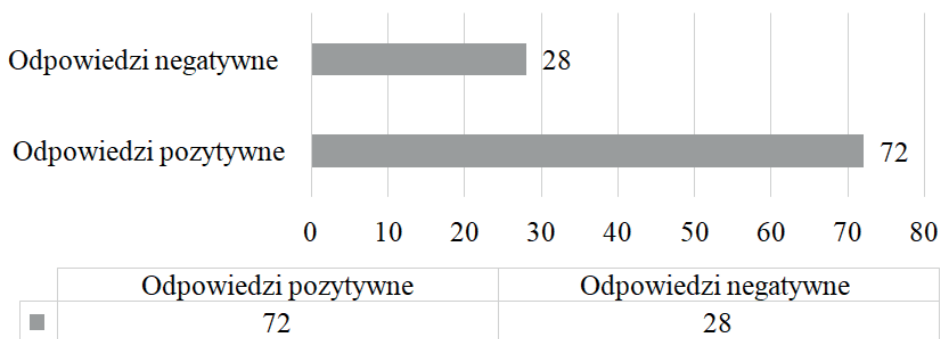
Źródło: Opracowanie własne

nie stosowało modyfikowanego mleka w proszku dla niemowląt. Stosowały niemodyfikowane mleko w proszku bądź karmiły naturalnie.

W Tab. 4 zaprezentowane zostały wyniki procentowe dotyczące karmienia niemowląt przez ankietowane modyfikowanym mlekiem w proszku, zarówno początkowym, jak i następnym.

Najwyższa wartość procentowa otrzymana w wyniku odpowiedzi na to pytanie dotyczyła matek, które urodziły swoje pierwsze dziecko w wieku 36–40. Osiągnięta wartość to 90%. Niewiele niższą wartość osiągnęły matki w przedziale 18–20 oraz 21–25, wyniosła ona odpowiednio 80% i 74% kobiet stosujących

Rys. 2. Czy podczas żywienia dziecka (dzieci) stosowała Pani modyfikowane mleko w proszku dla niemowląt jako uzupełnienie lub zamiennik mleka kobiecego?



Źródło: Opracowanie własne

Tab. 4. Odsetek matek stosujących modyfikowane mleko w proszku dla niemowląt jako uzupełnienie lub zamiennik mleka kobiecego.

Grupa respondentów	Kryterium cechy	Wartość (%)
18–20	Odpowiedź pozytywna	80
	Odpowiedź negatywna	20
21–25	Odpowiedź pozytywna	74
	Odpowiedź negatywna	26
26–30	Odpowiedź pozytywna	60
	Odpowiedź negatywna	40
31–35	Odpowiedź pozytywna	60
	Odpowiedź negatywna	40
36–40	Odpowiedź pozytywna	90
	Odpowiedź negatywna	10

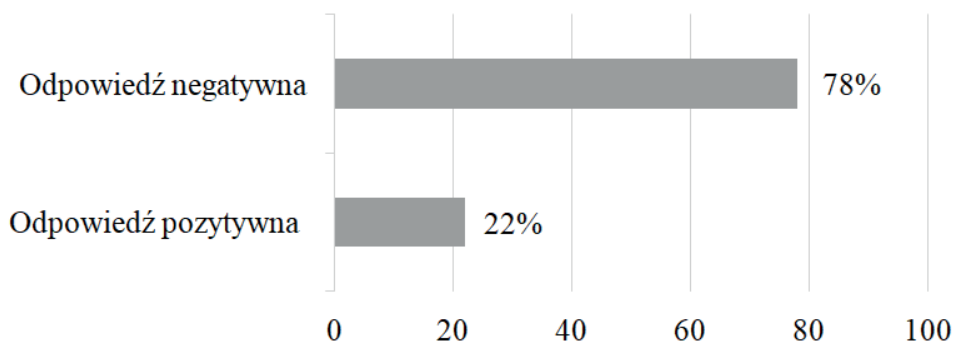
Źródło: Opracowanie własne

mleko modyfikowane. W grupach wiekowych 26–30 i 31–40 tylko 60% ankietowanych wskazało, że stosowało mleko modyfikowane w diecie niemowlęcia.

Na Rys. 3 przedstawiono stosunek odpowiedzi twierdzących do negatywnych udzielonych na pytanie „Czy podczas żywienia dziecka (dzieci) stosowała Pani niemodyfikowane mleko w proszku jako uzupełnienie lub zamiennik mleka kobiecego?”

Po przeanalizowaniu wyników odnotowano, że 78% ankietowanych matek nie karmiło niemowlęcia niemodyfikowanym mlekiem w proszku, a 22% ankietowanych stosowało mleko niemodyfikowane jako uzupełnienie lub zamiennik mleka kobiecego.

Rys. 3. Czy podczas żywienia dziecka (dzieci) stosowała Pani niemodyfikowane mleko w proszku jako uzupełnienie lub zamiennik mleka kobiecego?



Źródło: Opracowanie własne

W Tab. 5 przedstawiono udział procentowy w grupie ankietowanych wykorzystania niemodyfikowanego mleka podczas karmienia niemowląt (jako zamiennik lub uzupełnienie mleka modyfikowanego) w poszczególnych grupach wiekowych.

Tab. 5. Popularność mleka niemodyfikowanego jako uzupełnienie lub zamiennik mleka modyfikowanego.

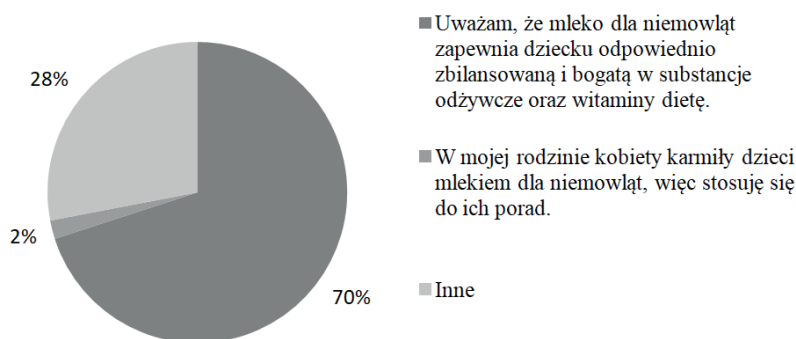
Grupa respondentów	Kryterium cechy	Wartość (%)
18–20	Odpowiedź pozytywna	20
	Odpowiedź negatywna	80
21–25	Odpowiedź pozytywna	13
	Odpowiedź negatywna	87
26–30	Odpowiedź pozytywna	100
	Odpowiedź negatywna	0
31–35	Odpowiedź pozytywna	40
	Odpowiedź negatywna	60
36–40	Odpowiedź pozytywna	40
	Odpowiedź negatywna	60

Źródło: Opracowanie własne

Najwyższy wynik (100%) odnotowano dla przedziału wiekowego kobiet, które urodziły pierwsze dziecko w wieku 26–30 lat. Dużo niższe wartości odpowiedzi pozytywnych 40% zaobserwowano w przedziale wiekowym 31–35 oraz 36–40 lat. Najniższe wartości były uzyskane w przypadku kobiet, które urodziły w wieku 18–20 (20%), a także w 21–25 (13%).

Na Rys. 4 przedstawiono szczegółowe dane dotyczące przyczyn stosowania modyfikowanego mleka w proszku jako pokarmu zastępczego. Wśród wskazanych w ankiecie przyczyn znajdowały się: „Uważam, że modyfikowane mleko w proszku dla niemowląt zapewnia dziecku odpowiednio zbilansowaną i bogatą w substancje odżywcze oraz witaminy diety”, a także „W mojej rodzinie kobiety karmiły niemowlęta modyfikowanym mlekiem w proszku, dlatego stosuję się do ich rad oraz doświadczenia”. Respondentki miały również możliwość dopisania własnego powodu.

Rys. 4. Przyczyny, dla których matki karmią modyfikowanym mlekiem dla niemowląt.



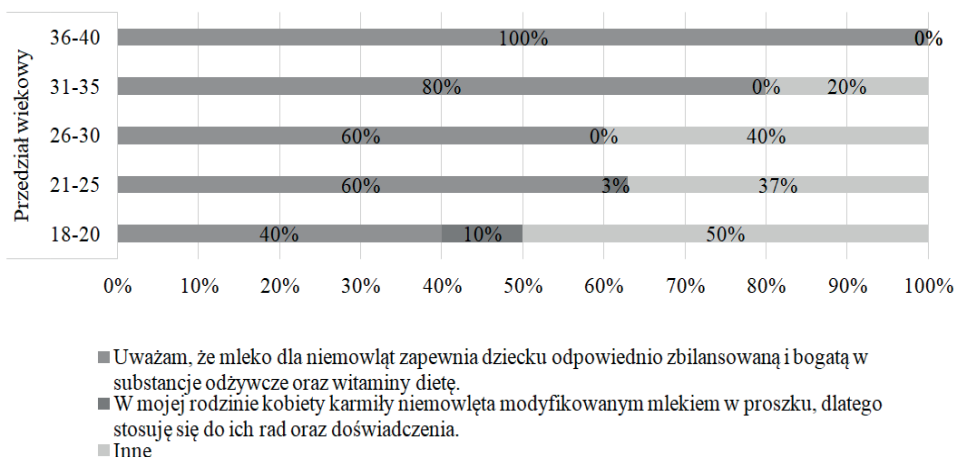
Źródło: Opracowanie własne

70% badanych matek zadeklarowało, że podczas karmienia stosowały mleko modyfikowane, ponieważ uważały, że modyfikowane mleko w proszku dla niemowląt zapewnia dziecku odpowiednio zbilansowaną i bogatą w substancje odżywcze oraz witaminy diety. 28% procent ankietowanych wybrało odpowiedź „inne” jako powód stosowania modyfikowanego mleka w proszku jako zastępczy sposób karmienia. Tylko 2% respondentek stwierdziło, że korzystała z modyfikowanego mleka dla niemowląt, ponieważ kobiety w ich rodzinach karmiły w taki sposób.

Na Rys. 5 przedstawiono procentowy rozkład powodów, dla których matki wybierały mleko w proszku jako uzupełnienie lub zamiennik karmienia naturalnego, podzielony według grup wiekowych.

40% ankietowanych, które urodziły swoje pierwsze dziecko w wieku 18–20, 60% w wieku 21–25, 60% w wieku 26–30, 80% w wieku 31–35 oraz 100% w wieku 36–40 karmiło swoje dziecko modyfikowanym mlekiem dla niemowląt, ponieważ uważały, że zapewnia ono zbilansowaną oraz bogatą w składniki odżywcze i witaminy diety. 10% kobiet, które urodziły swoje pierwsze dziecko

Rys. 5. Powody, dla których matki w wybranych grupach wiekowych karmią mlekiem w proszku jako uzupełnienie lub zamiennik karmienia naturalnego



Źródło: Opracowanie własne

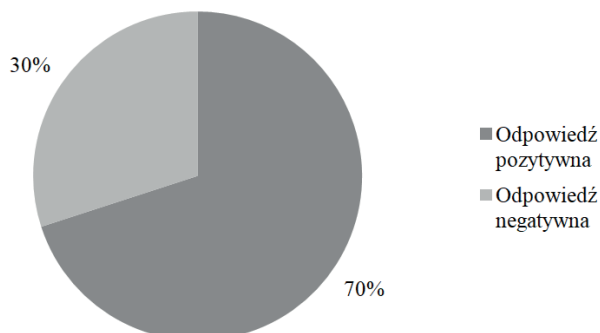
w wieku 18–20 stosowało się do rad starszych kobiet ze swojej rodziny, które również stosowały modyfikowane mleko dla niemowląt. Tę samą przyczynę podało 3% ankietowanych, które zostały matkami w wieku 21–25. Kobiety, które znajdowały się w innych przedziałach wiekowych nie stosowały modyfikowanego mleka w proszku ze względów rodzinnych. Pozostałe ankietowane (50% w przedziale 18–20 lat, 37% w przedziale wiekowym 21–25, 40% w przedziale 26–30 oraz 20% w przedziale 31–35) karmiły modyfikowanym mlekiem w proszku dla niemowląt z innych powodów takich jak: brak pokarmu, szybszy powrót do pracy zawodowej wykonywanej poza domem, a co za tym idzie brak możliwości karmienia dziecka mlekiem matki z butelki na życzenie, spowodowany dyskomfortem użytkowania laktatorów podczas odciągania pokarmu.

Ankietowane zostały zapytane o to, czy zdawały sobie sprawę, że niemodyfikowane mleko w proszku nie może być stosowane jako uzupełnienie lub zamiennik mleka modyfikowanego dla niemowląt. Wyniki dla całej grupy badanych zostały zaprezentowane na Rys. 6.

Analizując dane przedstawione na Rys. 6 zaobserwowano, że 70% badanych matek zdawało sobie sprawę, że niemodyfikowane mleko w proszku nie może być stosowane jako uzupełnienie lub zamiennik mleka modyfikowanego dla niemowląt; 30% respondentek nie zdawało sobie z tego sprawy.

Wyniki indywidualnych grup wiekowych zostały przedstawione w Tab. 6.

Rys. 6. Świadomość matek dotycząca stosowania niemodyfikowanego mleka w proszku jako uzupełnienie lub zamiennik mleka modyfikowanego dla niemowląt.



Źródło: Opracowanie własne

Tab. 6. Świadomość matek dotycząca stosowania niemodyfikowanego mleka w proszku jako uzupełnienie lub zamiennik mleka modyfikowanego dla niemowląt w poszczególnych grupach wiekowych.

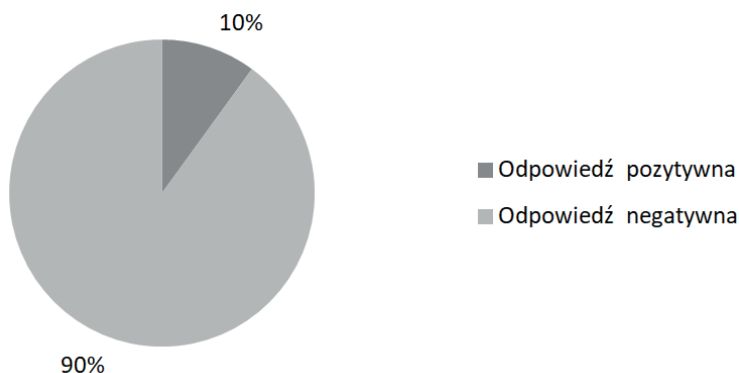
Grupa respondentów	Kryterium cechy	Wartość (%)
18–20	Odpowiedź pozytywna	80
	Odpowiedź negatywna	20
21–25	Odpowiedź pozytywna	73
	Odpowiedź negatywna	27
26–30	Odpowiedź pozytywna	90
	Odpowiedź negatywna	10
31–35	Odpowiedź pozytywna	50
	Odpowiedź negatywna	50
36–40	Odpowiedź pozytywna	60
	Odpowiedź negatywna	40

Źródło: Opracowanie własne

Najwyższa wartość (90% pozytywnych odpowiedzi) została uzyskana w grupie, które urodziły w wieku 26–30. Poziom aż 80% odpowiedzi potwierdzających został zaobserwowany w grupie kobiet, które urodziły swoje pierwsze dziecko w granicach wieku 18–20 lat. Prawie 3/4 (73%) odpowiedzi udzielonych przez kobiety z przedziału wiekowego 21–25 było pozytywnych. Poziom odpowiedzi pozytywnych był najniższy w dwóch najstarszych grupach wiekowych 31–35, a także 36–40 i wynosił odpowiednio 50% oraz 60%.

Respondentki zostały zapytane o konsekwencje stosowania niemodyfikowanego mleka w proszku w dziecie niemowląt. Wyniki ankietowanych zostały przedstawione na Rys. 7.

Rys. 7. Znajomość konsekwencji stosowania niemodyfikowanego mleka w proszku w dziecie niemowląt



Źródło: Opracowanie własne

Zdecydowana większość ankietowanych nie знаła konsekwencji stosowania niemodyfikowanego mleka w proszku (90%). Tylko 10% badanych matek wiedziało, jakie są konsekwencje stosowania niemodyfikowanego mleka w proszku.

Rozkład odpowiedzi procentowych w poszczególnych grupach wiekowych został przedstawiony w Tab. 7.

Tab. 7. Znajomość konsekwencji stosowania niemodyfikowanego mleka w proszku w dziecie niemowląt w poszczególnych grupach wiekowych.

Grupa respondentów	Kryterium cechy	Wartość (%)
18–20	Odpowiedź pozytywna	0
	Odpowiedź negatywna	100
21–25	Odpowiedź pozytywna	20
	Odpowiedź negatywna	80
26–30	Odpowiedź pozytywna	0
	Odpowiedź negatywna	100
31–35	Odpowiedź pozytywna	0
	Odpowiedź negatywna	100
36–40	Odpowiedź pozytywna	20
	Odpowiedź negatywna	80

Źródło: Opracowanie własne

Wszystkie ankietowane matki, które urodziły swoje pierwsze dziecko w przedziale wiekowym 18–20, 26–30 i 31–35 nie były świadome konsekwencji stosowania niemodyfikowanego mleka w proszku w diecie niemowląt. Tylko 20% ankietowanych, które urodziły swoje pierwsze dziecko w wieku 21–25 i 36–40 zdawało sobie sprawę, jakie skutki niesie za sobą karmienie niemowląt niemodyfikowanym mlekiem w proszku. Stwierdziły one, że niemodyfikowane mleko w proszku może powodować alergię oraz nie zapewnia odpowiedniej ilości witamin.

Dyskusja

Pomimo popularyzacji karmienia naturalnego przez fundacje zajmujące się badaniami o tematyce dotyczącej żywienia niemowląt oraz rodziny matek, a także personel medyczny po porodzie nie każda kobieta chciała lub mogła karmić piersią. Centrum Zdrowia Dziecka, Instytut Matki i Dziecka oraz Fundacja NUTRICIA przeprowadziły badania pod nazwą „Wyzwanie żywieniowe w trakcie 1000 pierwszych dni życia”. Pokazują one, że 95% kobiet karmiło w szpitalu nowonarodzone dziecko, lecz do 6. miesiąca życia tylko 54%. (http://www.czd.pl/index.php?option=com_content&view=article&id=2335:wyzwania-ywienie-w-w-trakcie-1000-pierwszych-dni-ycia&catid=27:wane&Itemid=420)

Modyfikowane mleko w proszku dla niemowląt było szeroko stosowane w karmieniu niemowląt ze względu na jego przeznaczenie. Zaskakującym zjawiskiem okazała się praktyka stosowania niemodyfikowanego mleka w proszku jako jego zamiennika lub uzupełnienia. Matki, które karmiły mlekiem niemodyfikowanym nie zdawały sobie sprawy z konsekwencji takiego postępowania. W grupie niemowląt często zdarzała się przemijająca alergja na białka mleka krowiego, w którym ilość żelaza i witamin jest zbyt mała, by zapewnić młodemu organizmowi odpowiednie warunki do rozwoju. W procesie produkcji na etapie suszenia dochodzi do utlenienia cholesterolu. W wyniku reakcji powstają oksysterole. Według badań Loma Linda University (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2678267>) zaburzają one funkcjonowanie naczyń krwionośnych i śródbłónka, powodując miażdżycę i nowotwory piersi. Z powodu zbyt wysokiego poziomu sodu, dzieci karmione niemodyfikowanym mlekiem w proszku cierpiały na nadciśnienie tętnicze.

Podsumowanie

W toku przeprowadzonych badań i analizy wyników ankietowanych w podziale na poszczególne grupy wiekowe sformułowano wniosek, że matki odróżniały modyfikowane mleko w proszku dla niemowląt od niemodyfikowanego,

pomimo braku wiedzy o nazewnictwie poszczególnych rodzajów. Podczas analizowania wyników ankiety zaobserwowano duży odsetek karmienia sztucznego z użyciem mleka w proszku.

Hipoteza sformułowana na początku badania została zweryfikowana pozytywnie. Matki karmią swoje dzieci modyfikowanym mlekiem dla niemowląt, ponieważ uważają, że jest ono najlepszym sposobem na zapewnienie im prawidłowej diety. Dane pozyskane w wyniku przeprowadzonych badań zgadzają się z danymi pochodzącymi ze stron instytucji zajmujących się wyznaczaniem norm żywieniowych, zasad oraz zaleceń prawidłowego żywienia, a także szerzeniem wiedzy na ten temat, takich jak Centrum Zdrowia Dziecka, Instytut Matki i Dziecka oraz Fundacja NUTRICIA. Zaobserwowano również brak zainteresowania matek karmiących niemodyfikowanym mlekiem w proszku skutkami wprowadzenia tego rodzaju mleka jako zamiennika mleka modyfikowanego w karmieniu niemowląt.

Literatura

- Gawęcki J. 2010. Żywienie człowieka zdrowego i chorego. PWN, Warszawa, s. 15-19.
- Gawęcki J. 2017. Żywienie człowieka. Podstawy żywienia. PWN, Warszawa, s. 313.
- Nowy Portal Mleczarski <http://nowypm.pl/index.php/artykuly/technologie/8823-prof-dr-hab-inz-stefan-ziajka-o-mleku-w-proszku> (dostęp 01.12.2019)
- Opis Patentowy PL 158291 B1 1988.
- Internetowa encyklopedia https://en.wikipedia.org/wiki/Henri_Nestlé (dostęp 11.03.2020).
- Internetowa encyklopedia https://en.wikipedia.org/wiki/Justus_von_Liebig (dostęp 11.03.2020).
- Strona Internetowa Nestle https://www.nestle.pl/aboutus/nasza_historia (dostęp 11.03.2020).
- Portal Kierunek Spożywczy <https://www.kierunekspozywczy.pl/artikul,31888,z-mlekiem-w-proszku-w-swiat.html> (dostęp 01.12.2019).
- United States National Library Of Medicine National Institute Of Health <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2678267> (dostęp 20.12.2019).
- Ziajka S. 1997. Mleczarstwo. Zagadnienia wybrane. Wydawnictwo ART, Olsztyn, s. 264-292.

ABSTRACT**MODIFIED BABY FORMULA – DELIBERATE CHOICE OR A FEEDING MODEL THAT HAS BEEN REPLICATED FOR GENERATIONS?**

Along with the change of traditional family model during decades, the increase of pro-health, fast and affordable way of nourishing new-born's with the substitute milk was observed. In Poland, two kinds of powdered infant formula milk are used: initial milk for new-born's (between 0-6 month) and milk dedicated children older than 6 months.

The aim of the study is to determine mothers' preferences for modified powdered milk as a substitute for breast milk in the nourishing of new-born's. The survey was conducted among 100 mothers from the 16 voivodeships. The age at which the respondents gave birth to their first child was a differentiating factor.

The survey contained 11 questions regarding knowledge about milk powder types. Respondents were also asked about the consequences of using powdered milk as substitute of infant formula and also about the reasons for using the modified powdered milk.

Słowa kluczowe: mleko dla niemowląt, mleko w proszku

Keywords: milk for babies, powdered infant formula milk

Dane do kontaktu z autorem:

Julia Ziajka

E-mail: julia.ziajka1999@gmail.com

Tel.: 602 528 531

Karina Zywar, Bartłomiej Bielawa, Michał Fiejdasz

Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im Stanisława Pigonia w Krośnie

Instytut Zdrowia i Gospodarki

Studenckie Koło Naukowe Ekonomistów

Opiekun: dr inż. Małgorzata Górka, mgr Elżbieta Brągiel

POSTRZEGANIE ŻYWNOŚCI WYGODNEJ I FUNKCJONALNEJ PRZEZ REGIONALNYCH KONSUMENTÓW

Wstęp

Ciągle zmieniające się preferencje konsumentów wymuszają na producentach aktualizację produktów żywnościowych. Konsument, dzięki dużej dostępności artykułów spożywczych, ma możliwość świadomego wyboru tego, co chce aktualnie spożyć. Dodatkowo może on zdecydować, czy dany produkt spełni jego oczekiwania nie tylko smakowe, ale również, czy będzie on zadowolony z wyboru akurat tego produktu spożywczego. Dzięki rozwojowi żywności wygodnej i funkcjonalnej przed konsumentem otwiera się nowa możliwość wyboru innej żywności, której do tej pory nie posiadał i nie spożywał.

Zgodnie z najczęściej przytaczaną definicją żywność wygodna to produkty, które wymagają mało nakładów pracy i czasu przy przygotowaniu do spożycia. Jak dotąd autorzy zajmujący się problematyką żywności wygodnej przyjmują różnorodne jej rozumienie (Makała 2013). Żywność wygodna to produkty gotowe do bezpośredniego spożycia lub wymagające niewielkiej obróbki kulinarnej, tak by maksymalnie skrócić czas przygotowania posiłku przez konsumenta. Stosowanie żywności wygodnej z jednej strony pozwala zaoszczędzić czas przygotowania posiłku, a z drugiej charakteryzuje się ona wysokim stopniem przetworzenia, co nie pozostaje bez wpływu na jej wartość odżywczą. Wiadomo, że produkty wysoko przetworzone charakteryzują się obniżoną zawartością składników odżywczych, a przecież żywność powinna dostarczać w optymalnej ilości wszystkich składników budulcowych, witamin oraz makro- i mikrośladników, których brak może prowadzić do awitaminoz i niedoborów składników mineralnych w organizmie (Gawęcki 2002).

Innym rodzajem tzw. nowej żywności jest żywność funkcjonalna. Żywność funkcjonalna ma swoje korzenie w tradycjach filozoficznych Wschodu, gdzie to konsumenci nie wyróżniali szczególnych różnic pomiędzy żywnością a lekami. Aktualnie Japonia jest pionierem żywności funkcjonalnej, gdyż w połowie lat 80. zapoczątkowała ona badania tej żywności, następnie wprowadziła odpowiednie regulacje prawne i rozpoczęła produkcję tej żywności. W wysoko rozwiniętych krajach żywność funkcjonalna rozwija się w bardziej gwałtowny sposób niż pozostałe rodzaje żywności. Dzięki większemu zainteresowaniu żywnością funkcjonalną, powstają wyspecjalizowane firmy produkujące nowe rodzaje żywności funkcjonalnej, które współpracują z jednostkami naukowymi w celu wdrażania i projektowania lepszej żywności (Świdzki 2018). Żywność funkcjonalna może być tak nazywana dzięki obecności w swoim składzie składników odżywczych, które w pozytywny sposób oddziałują na zdrowie człowieka. Należą do nich napoje i produkty spożywcze, które wykazują korzystny i udokumentowany wpływ na organizm konsumenta.

W 1998 roku opis żywności funkcjonalnej ukazał się w Konsensusie Naukowej Koncepcji Żywności Funkcjonalnej. Powstał on w wyniku pracy Europejskiej Komisji „Functional Food Science in Europe” (FUFOSE), nadzorowanej przez organizację mieszczącą się w Waszyngtonie, International Life Science Institute (ILSI). Zgodnie z ILSI żywność funkcjonalna to żywność, która dzięki fizjologicznie aktywnym składnikom umożliwia zapewnienie korzyści zdrowotnych, niezależnie od swej funkcji, *tzn. prawidłowego odżywiania* (Błaszczak i Grześkiewicz 2014).

Cel pracy

Celem pracy jest przedstawienie postaw konsumentów wobec innowacji produktowych na rynku żywności wygodnej i funkcjonalnej z uwzględnieniem znajomości tego typu produktów, jak również poglądów w stosunku do tej formy żywienia, oceny korzyści i ryzyka wynikających z wprowadzenia jej do jadłospisu oraz częstotliwości spożycia.

Material i metody

Narzędzie badawcze stanowił kwestionariusz ankiety na temat postaw konsumentów wobec żywności wygodnej i funkcjonalnej. Ankieta składała się z 13 pytań i metryczki. Pytania były zarówno pojedynczego, jak i wielokrotnego wyboru. Dotyczyły między innymi znajomości pojęcia produktów innowacyjnych, konsumpcji nowych produktów, częstotliwości spożycia czy rodzaju

wybieranych produktów. Badanie zostało przeprowadzone w lipcu i sierpniu 2019 roku wśród mieszkańców powiatu krośnieńskiego i brzozowskiego. W badaniu wzięło udział 150 osób zróżnicowanych pod względem płci, wieku oraz miejsca zamieszkania. Ankieta została przeprowadzona w sposób anonimowy.

Metodologia badań zachowań żywieniowych konsumentów skupiała się na uzyskaniu wtórnych i pierwotnych informacji, potrzebnych do rozpoznania procesów i zjawisk powiązanych z dokonaniem określonych wyborów rynkowych oraz ustanowionymi decyzjami zakupowymi. Sam aspekt zakupu jest przyczyną zróżnicowanych i zmiennych czynników oddziałujących w długim okresie, poprzedzających zakup i konsumpcję związaną z badaniem zachowań konsumentów.

Wyniki badań

W badaniu ankietowym wzięło udział 150 osób, z których 63% stanowiły kobiety, zaś 37% mężczyźni. Większość respondentów, bo aż 47% stanowiły osoby w wieku 18–25 lat, następną grupę stanowiły osoby w wieku 26–35 lat (27%), zaś najmniejsze grono badanych stanowiły osoby w wieku 46–54 lata i powyżej 55 lat, bo tylko po 2%. Ponad połowa ankietowanych, bo 64%, pochodziła ze wsi, a pozostali z miasta 36%. Najliczniejszą grupą badanych stanowiły osoby z wykształceniem średnim (47%), następną z wykształceniem wyższym (30%) (Tab. 1).

Pierwszym pytaniem, na jakie odpowiadali ankietowani, było wybranie stwierdzeń, które według nich najlepiej określają produkty innowacyjne. Najliczniejsza grupa ankietowanych wskazała odpowiedzi „efekt wykorzystania nowej wiedzy i technologii” oraz „wdrożenie produktu, który jest nowy lub ulepszony”, które uzyskały po 28%. Następnymi odpowiedziami, które uzyskały po 12%, były „pozyskanie dotąd nieznanymi surowców”, „produkt, który zyskał nowe zastosowanie” oraz „kombinacja istniejącej już wiedzy i technologii”. Najmniej odpowiedzi, bo 8% uzyskało stwierdzenie „nieznaczne udoskonalenie pod względem materiałów, łatwości obsługi lub innych cech” (Wyk. 1). W badaniach Gutkowskiej i in. (2014) niecała połowa respondentów (47%) spotkała się z określeniem produkty innowacyjne, przy czym określenie najczęściej było przez nich kojarzone z naturalnymi i ekologicznymi (23%), a także bezpiecznymi i zdrowymi produktami (29%).

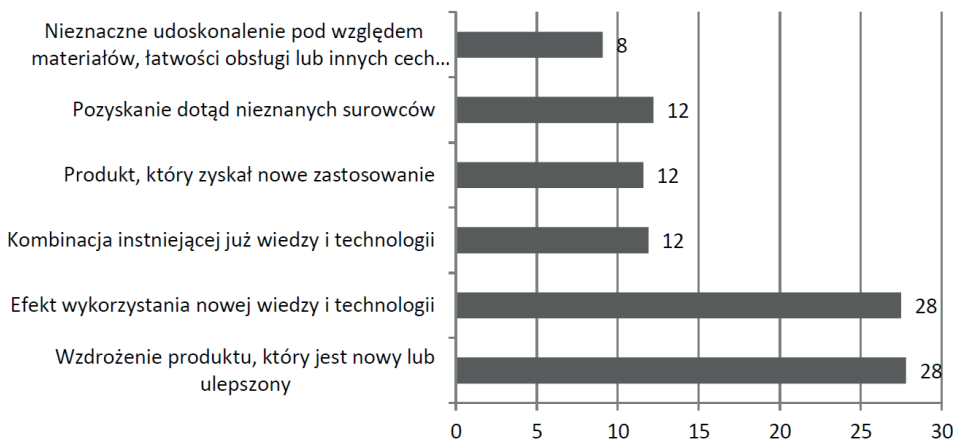
Na pytanie dotyczące postrzegania innowacyjnych produktów na rynku żywnościowym najwięcej osób odpowiadało, że żywnościowy produkt innowacyjny obejmuje „wprowadzenie produktów o dodatkowych walorach – nowy smak, konsystencja, forma” (25%), następną była odpowiedź „wprowadzenie produktu

Tab. 1. Charakterystyka respondentów.

Cechy populacji	Grupy	Respondenci	
		Liczba	Odsetek (%)
Ogółem		150	100
Płeć	Kobiety	95	63
	Mężczyźni	55	37
Wiek	Do 18 lat	14	9
	18–25 lat	71	47
	26–35 lat	41	27
	36–45 lat	20	13
	46–54 lata	2	2
	Powyżej 55 lat	2	2
Miejsce zamieszkania	Wieś	96	64
	Miasto	54	36
Wykształcenie	Podstawowe	2	1
	Gimnazjalne	10	7
	Zawodowe	22	15
	Średnie	71	47
	Wyższe	45	30

Źródło: Opracowanie własne

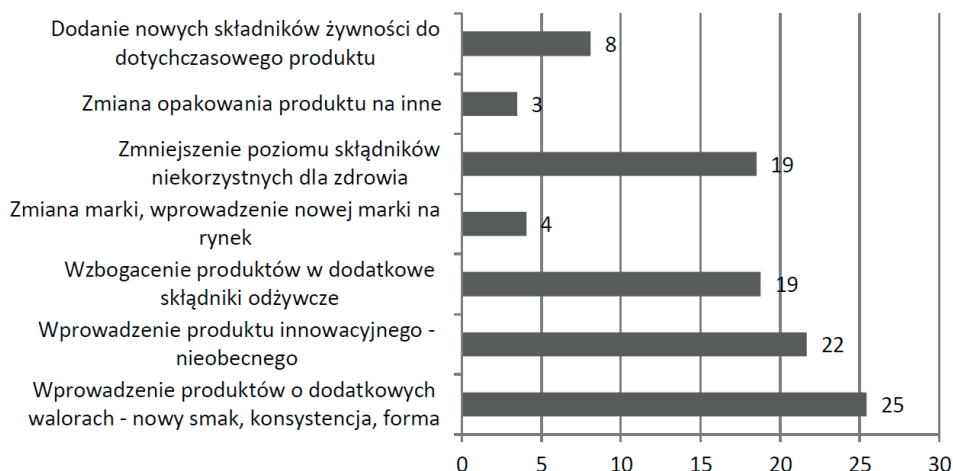
Wyk. 1. Wybór stwierdzeń określających produkty innowacyjne (%).



Źródło: Opracowanie własne

innowacyjnego – nieobecnego na rynku” (22%). Najmniej odpowiedzi uzyskały „zmiana opakowania produktu na inne” oraz „zmiana marki, wprowadzenie nowej marki na rynek”, kolejno 3% i 4% (Wyk. 2). W badaniach Białoskurskiego (2016) podobny wynik uzyskała odpowiedź „wzbogacony produkt w dodatkowe składniki” (16,5%), jak również „zmiana opakowania produktu na inne” (5%).

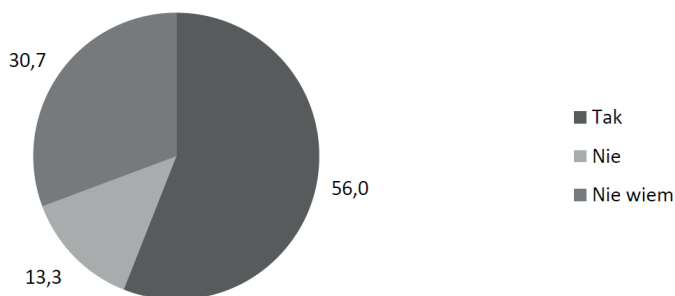
Wyk. 2. Postrzeganie innowacji produktowych na rynku żywnościowym (%).



Źródło: Opracowanie własne

Ponad połowa badanych respondentów (56%) potrafi rozpoznać produkty innowacyjne, 13% twierdziło, że nie potrafi jej rozpoznać, zaś pozostali, tj. 31% nie wiedziało czy potrafi takową rozpoznać (Wyk. 3).

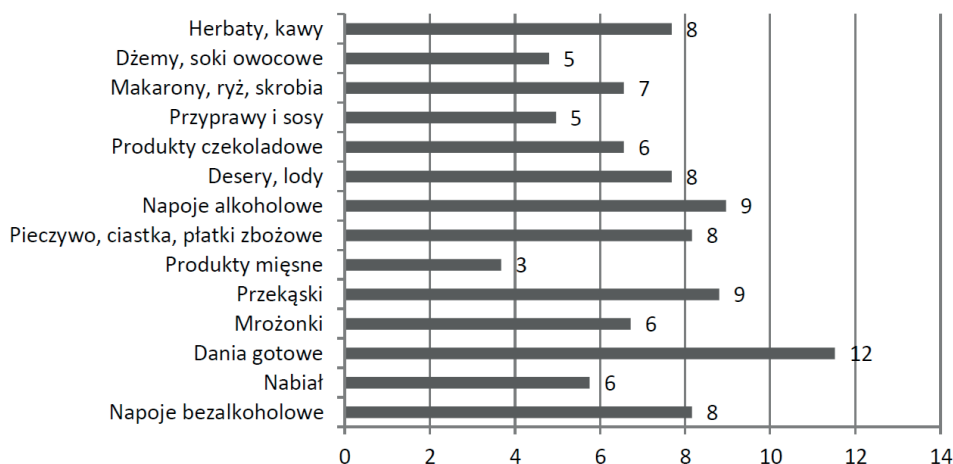
Wyk. 3. Rozpoznawanie produktów innowacyjnych przez konsumentów (%).



Źródło: Opracowanie własne

Pytając o znajomość rodzajów spożywczych produktów innowacyjnych, najczęściej respondentów przyznało, że zna i spożywa: dania gotowe (12%), przekąski i napoje alkoholowe (po 9%). Herbaty, kawy, desery, lody, pieczywo, ciastka, płatki zbożowe, napoje bezalkoholowe wszystkie te odpowiedzi uzyskały 8%. Najrzadziej wskazywanym produktem były produkty mięsne, które wskazało 3% respondentów (Wyk. 4).

Wyk. 4. Znajomość przez konsumentów innowacji w konkretnych produktach (%).

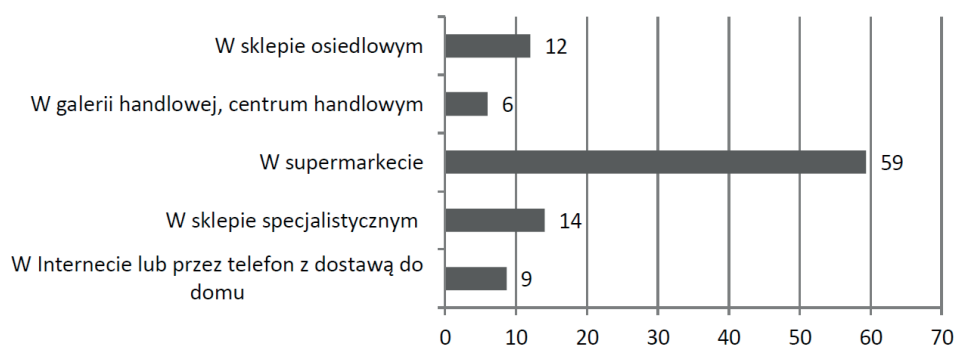


Źródło: Opracowanie własne

Najczęściej wybieranym miejscem zakupu produktów innowacyjnych przez konsumentów był supermarket (59%), w następnej kolejności wybierali oni sklep specjalistyczny (14%), zaś najrzadziej tego typu żywność kupowali w galerii handlowej oraz centrum handlowym (6%) (Wyk. 5). Z badań Filipiak-Florkiewicz i in. (2015) wynika, że ankietowani najczęściej zakupują produkty innowacyjne w sklepach specjalistycznych – nastawionych na sprzedaż dużej ilości asortymentu w ramach wąskiej linii produktów, np. zdrowa żywność, produkty dla sportowców; (83%), a także w tego typu produkty zaopatrują się w sklepach dyskontowych (53%).

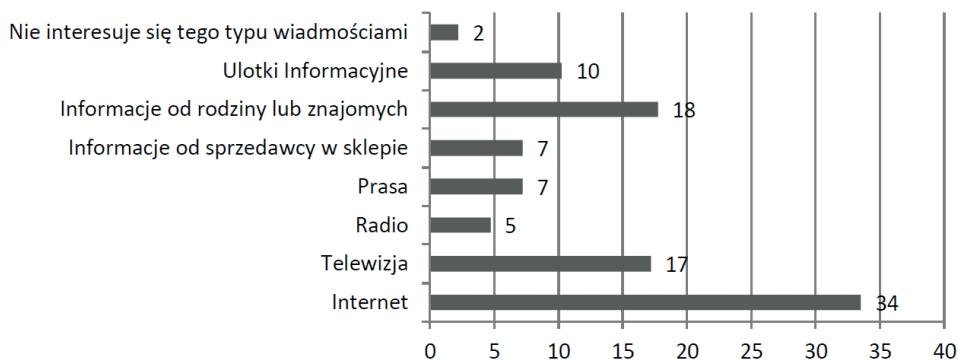
Respondenci zapytani o sposób uzyskiwania informacji na temat innowacji produktowych deklarowali, że czerpali ją głównie z internetu (34%), następnie dowiadywali się o informacjach od rodziny lub znajomych (18%). Najrzadziej wybraną odpowiedzią było radio (5%) (Wyk. 6). Odnośnie do tego aspektu w badaniach Sojkina (2009) najczęściej respondentów za źródło pozyskiwania informacji na temat innowacyjnych produktów uznało „Reklamy TV oraz prasę” 71%, zaś internet wskazało tylko 10% respondentów.

Wyk. 5. Miejsca zakupu produktów innowacyjnych (%).



Źródło: Opracowanie własne

Wyk. 6. Miejsca pozyskiwania informacji na temat innowacji produktowych (%).

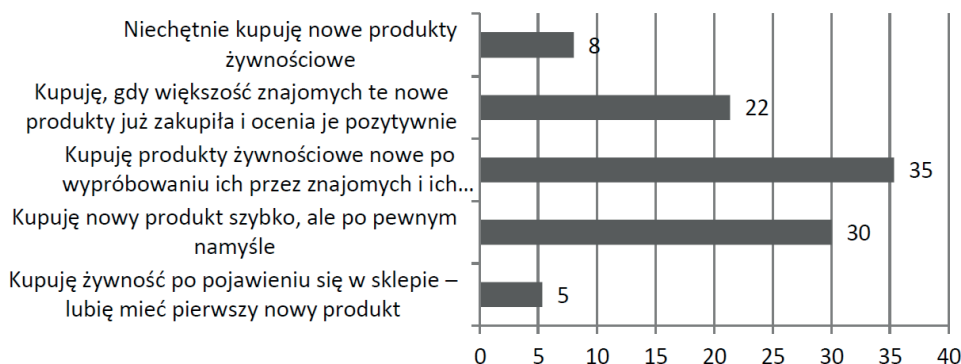


Źródło: Opracowanie własne

W przypadku pytania o postawę konsumentów wobec nowości na rynku żywnościowym 35% respondentów deklarowało, że kupują produkty żywnościowe nowe po wypróbowaniu ich przez znajomych i ich pozytywnych opiniach. Następną odpowiedzią było „kupuję nowe produkty szybko, ale po pewnym namyśle” (30%), najmniej odpowiedzi, bo tylko 5% uzyskało stwierdzenie „kupuję żywność po pojawieniu się w sklepie – lubię mieć pierwszy nowy produkt” (Wyk. 7). Potwierdzeniem tego mogą być badania Maciejewskiej (2015), w których 76,8% badanych respondentów było skłonnych poszukiwać więcej informacji na temat nowego produktu i dopiero wtedy podejmować decyzję o jego zakupie. W niewielkim stopniu są oni skłonni kupić nowy produkt lub wolą wybrać dotychczasowy, sprawdzony – odpowiednio 11,5% i 11,7%.

Największa grupa respondentów (49%) nie potrafiła jednoznacznie określić, które produkty można zaliczyć do żywności wygodnej albo też nie spotkała

Wyk. 7. Postawa konsumentów wobec nowości na rynku żywnościowym (%).

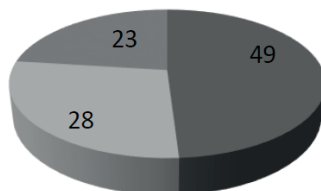


Źródło: Opracowanie własne

się z tym pojęciem. Prawie co trzeci badany (28%) wskazywał na najprostsze skojarzenie – produkty, które można szybko przygotować do konsumpcji, a 23% badanych postrzega żywność wygodną jako produkty dostępne w ofercie rynkowej, które są wygodne do przygotowania i konsumpcji. Nieco mniejsza grupa konsumentów uważa, że są to produkty przygotowane i przeznaczone do drobnej obróbki kulinarnej (Wyk. 8).

Wyk. 8. Definicja żywności wygodnej w opinii konsumentów (%).

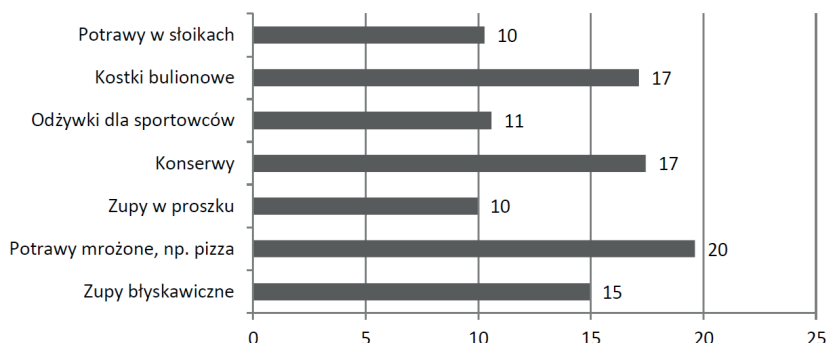
- Nie wiem – nie słyszałem, nie spotkałem się z pojęciem
- Szybko przygotowana, coś co można zrobić w krótkim czasie
- Łatwa do przygotowania i konsumpcji – wygodna do zrobienia



Źródło: Opracowanie własne

Ankietowani zapytani o najczęściej kupowane produkty żywności wygodnej, wskazywali kolejno: potrawy mrożone, np. pizza i frytki (20%) oraz konserwy, które uzyskały 17% odpowiedzi. Najrzadziej kupowanymi produktami żywności wygodnej były odżywki dla sportowców (11%) oraz potrawy w słoikach i zupy w proszku (10%) (Wyk. 9).

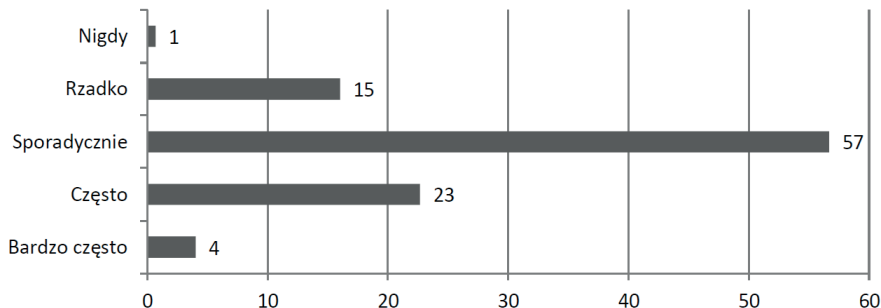
Wyk. 9. Najczęściej kupowane produkty żywności wygodnej (%).



Źródło: Opracowanie własne

Respondenci pytani o częstotliwość zakupu żywności wygodnej odpowiedzieli, że sporadycznie wybierają tego typu produkty (57%), po takie produkty 23% ankieterowanych sięga często (Wyk. 10). W przypadku badań Sojkin (2009) konsumenci rzadko sięgali po nowości produktowe (47,3%), sporadycznie z nowych produktów żywnościowych korzystało 39,2% konsumentów.

Wyk. 10. Częstotliwość zakupu żywności wygodnej (%).



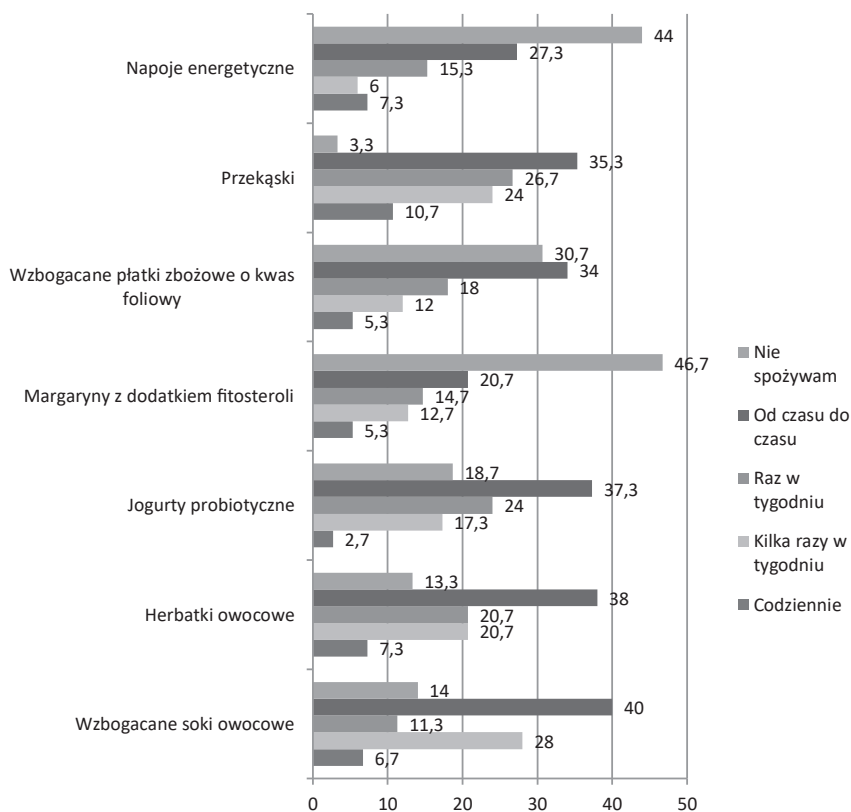
Źródło: Opracowanie własne

Ankieterowani zapytani o częstotliwość spożywania konkretnych grup żywności funkcjonalnej odpowiedzieli, że codziennie 10,7% spożywa przekąski, na drugim miejscu znalazły się wzbogacane soki owocowe (6,7%), najmniej konsumentów codziennie spożywało jogurty probiotyczne (2,7%). Kilka razy w tygodniu wzbogacane soki owocowe spożywało 28%, następnie przekąski – 24%, zaś najmniej ankieterowanych kilka razy w tygodniu spożywało napoje energetyczne (6%). Konsumenci raz w tygodniu sięgali po przekąski (26,7%), następnie jogurty probiotyczne (24%), a najmniej po wzbogacane soki owocowe

(11,3%). Od czasu do czasu respondenci sięgali po wzbogacone soki owocowe (40%), herbatki owocowe (38%), a najmniej ankietowanych sięgało po margaryny z dodatkiem fitosteroli (20,7%). 46,7% ankietowanych deklarowało, że nie spożywa margaryn z dodatkiem fitosteroli, następnie 44% – napojów energetycznych, a 13,3% deklarowało, że nie spożywa herbatek owocowych (Wyk. 11). W przypadku częstotliwości spożywania wybranych grup żywności funkcjonalnej w badaniach Sojnik (2009) odpowiedzi pokrywają się w niewielkim stopniu. Wzbogacone soki owocowe codziennie spożywane przez konsumentów były w 16,9%, a herbatki owocowe w 16,8%. W przypadku spożywania kilka razy w tygodniu poniższych grup żywności funkcjonalnej wyniki w większym stopniu się pokrywają. Wynikiem takich rozbieżności może być różnica 10 lat w przeprowadzonych badaniach.

Na pytanie, czego konsument oczekuje od żywności funkcjonalnej najwięcej respondentów odpowiadało, że obniżenia ryzyka występowania chorób cywili-

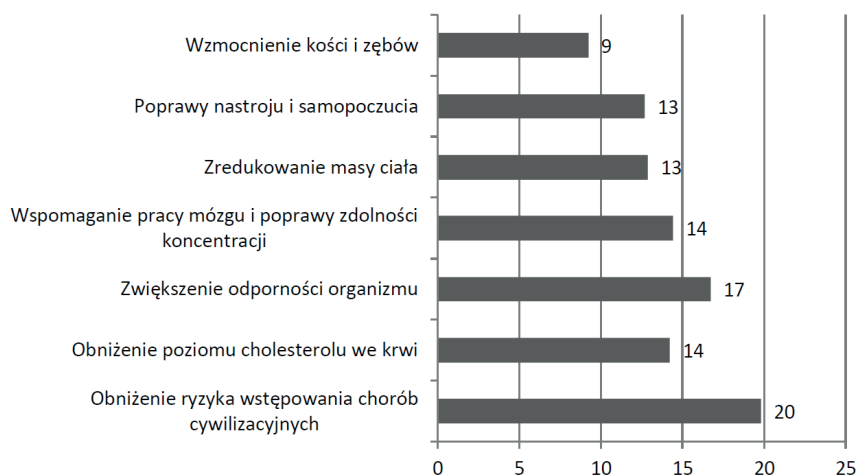
Wyk. 11. Częstość spożywania produktów żywności funkcjonalnej (%).



Źródło: Opracowanie własne

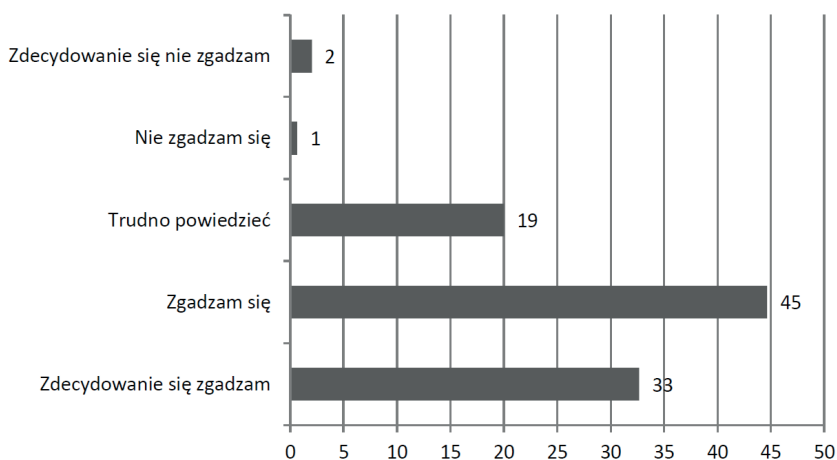
zacyjnych (20%), kolejną odpowiedzią było zwiększenie odporności organizmu (17%), najmniej odpowiedzi uzyskało wzmocnienie kości i zębów (9%) (Wyk. 12). Również na podstawie badań Sojkina (2009) można zauważyć, że konsumentom zależy na swoim zdrowiu. W badaniach 30,2% ankietowanych oczekuje od żywności funkcjonalnej obniżenia ryzyka występowania chorób cywilizacyjnych,

Wyk. 12. Oczekiwania konsumentów spowodowane spożywaniem żywności funkcjonalnej (%).



Źródło: Opracowanie własne

Wyk. 13. Stwierdzenie konsumentów na temat znakowania żywności funkcjonalnej specjalnymi deklaracjami żywieniowo-zdrowotnymi (%).



Źródło: Opracowanie własne

następnie w 26,7% konsumenci oczekują obniżenia poziomu cholesterolu we krwi. Najmniej odpowiedzi uzyskało wzmocnienie kości i zębów (7,2%).

Najczęściej wybieraną odpowiedzią w pytaniu o znakowanie specjalnymi deklaracjami żywieniowo-zdrowotnymi żywność funkcjonalną, 45% ankietowanych uważa, że powinna być ona znakowana, zaś 33% twierdzi, że zdecydowanie się z tym zgadza (Wyk. 13). Porównywalne wyniki uzyskał Sojnik (2009), pytając respondentów, czy żywność funkcjonalna powinna być znakowana specjalnymi deklaracjami żywieniowo-zdrowotnymi. Zdecydowanie zgadza się i zgadza się z tym odpowiednio 29,7% i 48,7%.

Podsumowanie

Bogactwo oferty produktów żywnościowych oraz zmieniające się preferencje konsumentów determinują istotne zmiany w zachowaniach konsumpcyjnych gospodarstw domowych. Pochodną zachodzących przemian ekonomicznych, społecznych i kulturowych jest zmiana stylu życia, ale także i jakości życia. Efektem dążenia do zaspokojenia potrzeb konsumenta wyznaczonych przez wygodę użycia, charakteryzujących się szybkością przygotowania do spożycia, łatwością przyrządzenia i przechowywania, funkcjonalnością opakowania (możliwość np. użycia opakowania do podgrzania produktu), jest bardzo szeroki asortyment żywności wygodnej na światowym rynku żywnościowym.

Obecny styl życia oraz postawy konsumentów wobec oferowanej żywności pozwalają na stwierdzenie, że współczesnemu człowiekowi nie wystarcza już tylko łatwy dostęp do żywności i samo jej posiadanie, ale coraz większą rolę zaczyna odgrywać jakość, funkcjonalność, różnorodność i atrakcyjność oferowanych produktów żywnościowych. Poza tym istotnym czynnikiem kształtującym postawy konsumentów wobec żywności funkcjonalnej jest panująca moda i szeroko pojęta reklama, promująca żywność funkcjonalną jako taką, która poprawia wydolność fizyczną i umysłową organizmu, a także łagodzi skutki stresu związanego ze stylem życia.

Rozwój żywności wygodnej i funkcjonalnej stwarza realne skutki częstszej chęci sięgania po tę żywność, gdyż na rynku żywnościowym coraz więcej producentów wprowadza tego typu produkty, co jest odpowiedzią na zachowania konsumentów płynące z rynku.

Z przeprowadzonych badań można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Dynamiczny rozwój produktów segmentu żywności wygodnej powoduje, że konsumenci są bardzo podzieleni w sposobie postrzegania tej kategorii żywności. Znaczna grupa respondentów (49%) nie potrafi jednoznacznie określić, jakie produkty można zaliczyć do żywności wygodnej albo też

nie spotkała się z tym pojęciem. Wiedząc co to za produkty, konsumenci najczęściej sięgają po potrawy mrożone, na przykład pizzę i frytki (20%), konserwy (17%) oraz zupy błyskawiczne (15%).

2. Z badań wynika, że część respondentów oczekuje od żywności funkcjonalnej obniżenia ryzyka występowania chorób cywilizacyjnych, co świadczy o dbaniu przez konsumentów o swoje zdrowie. Zdecydowana większość badanych (78%) zgadza się z tym, że żywność funkcjonalna powinna być znakowana specjalnymi deklaracjami żywieniowo-zdrowotnymi. Potrzebne jest rozpowszechnianie wiedzy na temat żywności funkcjonalnej, dzięki której konsument będzie mógł świadomie wybierać zdrowszą i bogatszą w składniki odżywcze żywność.
3. Dla 18% ankietowanych bardzo pozytywnym wymiarem innowacyjności w ramach innowacji żywnościowych jest zmniejszenie poziomu składników niekorzystnych dla zdrowia.
4. 34% badanych respondentów czerpało informacje na temat innowacji produktowych z internetu, co świadczy o dużej dostępności informacji o tzw. nowej żywności. Zaledwie 35% kupowało produkty żywnościowe dopiero po wypróbowaniu ich przez znajomych, od których mogą uzyskać pozytywną opinię na temat danego produktu. Wynika z tego, że konsument pomimo dostępności dużej ilości informacji w internecie, nadal czuje lęk i niechęć do wypróbowania nowości produktowych.

Problematyka przedstawiona w niniejszej pracy oczywiście nie wyczerpuje tematu, a jedynie nakreśla jej zarys. Potrzeby i oczekiwania konsumentów wobec innowacji produktowych na rynku żywności funkcjonalnej i wygodnej wskazują na konieczność poszerzania ich wiedzy w tym zakresie i potrzebę prowadzenia dalszych badań naukowych.

Literatura:

- Białoskurski S. 2016. Postrzeganie wybranych kryteriów innowacyjności produktów spożywczych przez konsumentów. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 5(108): 145.
- Błaszczak A., Grześkiewicz W. 2014. Żywność funkcjonalna – szansa czy zagrożenia dla zdrowia? *Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu*, 2: 214-215.
- Filipiak-Florkiewicz A., Florkiewicz A., Topolska K., Cabała A. 2015. Żywność funkcjonalna (prozdrowotna) w opinii klientów specjalistycznych sklepów z żywnością. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2: 166-175.
- Gawęcki J. 2002. *Żywność nowej generacji a racjonalne żywienie*. *Żywność, Nauka, Technologia*, 4: 6.

- Gutkowska K., Kowalczyk I., Sajdakowska M., Żakowska-Biemans S., Kozłowska A., Olewnik-Mikołajewska A. 2014. Postawy konsumentów wobec innowacji na rynku żywności. *Handel Wewnętrzny*, 4(351): 80-93.
- Maciejewski G. 2015. Konsument wobec innowacji produktowych. Uniwersytet Ekonomiczny, Wydział Ekonomii, Katedra Rynku i Konsumpcji, *Logistyka*, 2: 953-960.
- Makała H. 2013. Trendy w produkcji żywności wygodnej i przykłady jej zastosowania w turystyce – wybrane aspekty. *Wyższa Szkoła Turystyki i Języków Obcych w Warszawie*, s. 107.
- Sojkin B., Małecka M., Olejniczak T., Bakalarska M. 2009. Konsument wobec innowacji produktowych na rynku żywności. Wydawnictwo Uniwersytetu Ekonomicznego w Poznaniu, s. 11-37.
- Świdorski F. 2018. *Żywność wygodna i żywność funkcjonalna*. Wydawnictwo PWN, 16-28.

ABSTRACT

PERCEPTION OF CONVENIENT AND FUNCTIONAL FOOD BY THE REGIONAL CONSUMERS

The purpose of the thesis was to determine consumers preferences regarding innovational products available on the market of convenience and functional food, determined by 150 deliberately selected consumers from Krosno and Brzozowski country.

The research tool was a questionnaire of consumers' attitudes towards convenient and functional food. The survey contained 13 questions and a metric. The questions were both single and multiple choice. The survey was anonymous.

The methodology of research of consumer nutritional behavior focused on obtaining secondary and primary information needed to recognize processes and occurrences relative with making specific market choices and decisions taken during the shopping.

The development of convenient and functional food creates real effects of a more frequent need to reach for these foods, as more and more producers are introducing such products to the food market, what is a response to consumer behavior coming from the market.

Słowa kluczowe: żywność funkcjonalna, żywność wygodna, żywność innowacyjna, konsument

Keywords: functional food, convenience food, innovational food, consumer

Dane do kontaktu z autorem:

Karina Zywar

E-mail: karina.zywar@onet.pl, tel.: 665-088-954