

Sposób wykrywania bakterii *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp. oraz *Listeria monocytogenes* w żywności

OPIS

DZIEDZINA TECHNIKI

Przedmiotem wynalazku jest sposób wykrywania bakterii z rodzaju *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp. oraz *Listeria monocytogenes* w żywności, w tym sposób odróżniania *L. monocytogenes* od *L. ivanovii* poprzez sprzężenie zmodyfikowanych metod hodowlanych ze wzmacnioną powierzchniowo spektroskopią Ramana (ang. Surface-enhanced Raman Spectroscopy, SERS).

STAN TECHNIKI

Jednym z podstawowych kryteriów bezpieczeństwa żywności jest jej jakość mikrobiologiczna. Badania określające poziom zanieczyszczeń mikrobiologicznych, zarówno surowców jak i gotowych produktów żywnościowych, dostarczają informacji o higienie procesu produkcyjnego jak i jakości produktów wprowadzonych na rynek.

W badaniach mikrobiologicznych żywności i pasz istotną rolę odgrywają metodyczne normy międzynarodowe (ISO) i europejskie (EN), które w zdecydowanej większości są przyjmowane w Polsce jako normy polskie (PN) i zharmonizowane z wymienionymi normami. Te konwencjonalne procedury oparte są o metody hodowlane oraz analizę właściwości biochemicznych czy serologicznych mikroorganizmów. Kontrolowanie obecności drobnoustrojów chorobotwórczych metodami tradycyjnymi wymaga wykonania wielu czasochłonnych analiz przez wykwalifikowany personel, dlatego też procedury te są obecnie uzupełniane o nowoczesne metody analityczne lub, w miarę możliwości, są przez nie zastępowane. Do tych metod zaliczamy m.in.: spektrometrię masową MALDI-TOF, metody

oparte na replikacji DNA *in vitro* (PCR i RT-PCR) czy metody immunochemiczne. Niestety, jak dotąd nie opracowano procedury, która umożliwia szybką detekcję pojedynczych komórek bakteryjnych w dużej objętości badanej próbki. Z tego powodu wszystkie procedury identyfikacyjne muszą być poprzedzone czasochłonnym procesem namnażania. Nie inaczej dzieje się w przypadku detekcji bakterii w żywności. Obecność w żywności określonych rodzajów czy gatunków bakterii, w tym *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* czy *Cronobacter sakazakii* (wg wcześniejszej nomenklatury: *Enterobacter sakazakii*) jest regulowana przez odpowiednie rozporządzenia Komisji Wspólnot Europejskich (WE). Według tych regulacji, bakterie z gatunków *L. monocytogenes* i *C. sakazakii* oraz z rodzaju *Salmonella* nie powinny być obecne w określonych środkach spożywczych (*L. monocytogenes*: nieobecne w 25 g żywności gotowej do spożycia przeznaczonej dla niemowląt oraz gotowej do spożycia żywności specjalnego medycznego przeznaczenia, *Salmonella* spp.: nieobecne w 25 g różnych rodzajów żywności, *C. sakazakii*: nieobecne w 10 g preparatu w proszku do początkowego żywienia niemowląt i żywności dietetycznej w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego przeznaczonej dla niemowląt w wieku do 6 miesięcy). Opracowane zostały metodyczne normy międzynarodowe wykrywania oraz identyfikacji tych bakterii w żywności. Dla trzech wymienionych wyżej rodzajów i/lub gatunków bakterii opracowano następujące normy: 1) PN-EN ISO 6579:2003 - Mikrobiologia żywności i pasz; Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella* spp., 2) PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 - Mikrobiologia żywności i pasz; Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* - część I: Metoda wykrywania obecności oraz 3) PKN-ISO/TS 22964: 2008 - Mleko i przetwory mleczne - Wykrywanie *Enterobacter sakazakii*.

Każda z tych norm przewiduje zastosowanie procedur opartych o hodowlę mikroorganizmów na specyficznych podłożach selektywnych, a następnie identyfikację bakterii na podstawie właściwości metabolicznych. Przeprowadzenie pełnego badania, z potwierdzeniem obecności

określonego rodzaju czy gatunku bakterii w badanej próbce może zająć nawet do siedmiu dni. Z tego powodu poszukuje się nowych metod, które umożliwią skrócenie czasu analizy.

Spektroskopia Ramana to technika polegająca na pomiarze promieniowania rozproszenia Ramana, czyli nieelastycznego rozpraszania fotonów w wyniku ich oddziaływania z badanymi molekułami. Wykorzystując spektrometr Ramana oraz bazę widm istniejących związków chemicznych możliwe jest dokonanie identyfikacji nieznanej substancji. Ma ona jednak zasadniczą wadę, a mianowicie, jest efektem relatywnie słabym - zaledwie jeden na 10^6 fotonów ulega rozproszeniu nieelastycznemu. Udoskonalona technika pomiarów, która została nazwana wzmocnioną powierzchniowo spektroskopią Ramana (ang. Surface-enhanced Raman spectroscopy, SERS), opiera się na pomiarze intensywności promieniowania nadfioletowego, widzialnego lub podczerwonego rozproszonego w sposób nieelastyczny na molekułach znajdujących się na powierzchni nanocząstek odpowiedniego metalu (K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R. R. Dasari, M. S. Feld, (1997) Physical Review Letters, 78, 1667; S. Nie, S. R. Emory (1997) Science, 275, 1102). Wielkość wzmocnienia sygnału Ramana nie zależy tylko od obecności metalu jako podłoża. Na efekt SERS wpływają również czynniki takie jak: częstość wzbudzająca wiązki laserowej, efektywny ramanowski przekrój czynny, czas ekspozycji na promieniowanie oraz rodzaj badanej substancji.

Skład podłoża i wielkość nanostruktur je pokrywających mogą się zasadniczo różnić w zależności od rodzaju podłoża SERS. Średnica tych struktur nie powinna przekraczać zakresu kilkudziesięciu - kilkuset nanometrów, a w skład powinien wchodzić przynajmniej jeden z trzech metali: złoto, srebro lub miedź. Omówione wyżej parametry wpływają na późniejsze zastosowanie platformy SERS. W celu uzyskiwania takich podłoży wykorzystuje się wiele różnych materiałów i metod, m. in.: koloidy metali, cykle reakcji redoks, trawienie chemiczne, ablację laserową, napyłanie. Jednak nie wszystkie rodzaje platform SERS opisane w literaturze naukowej można wykorzystać w celu detekcji i/lub identyfikacji mikroorganizmów, takich jak

bakterie. Okazuje się, że tylko niektóre powierzchnie wzmacniające umożliwiają otrzymanie obrazu spektralnego badanych bakterii. Podłoża, które są odpowiednie do badań bakterii dają powtarzalne widma charakterystyczne dla danego gatunku. Identyfikacja opiera się wówczas na dopasowaniu otrzymanego obrazu spektralnego do widm znajdujących się w bazie stworzonej dla konkretnego rodzaju platformy SERS.

Dotychczas opublikowano kilka prac na temat identyfikacji mikroorganizmów metodą SERS, jednak żadna z nich nie przedstawia bezpośredniego sposobu wykrywania bakterii patogennych z żywności, a ponadto nie łączy ze sobą metody SERS ze standardami ISO. Znany jest jedynie sposób wykrywania bakterii z rodzaju *Salmonella* w żywności metodą spektroskopii Ramana połączonej ze standardami ISO (A. Assaf, C.B.Y. Cordella, G. Thouand, (2014). Analytical Bioanalytical Chemistry, 406, 4899-4910). Jednak w opisanej metodzie normalny sygnał ramanowski pochodzący od bakterii był na tyle słaby, że analiza chemometryczna nie pozwoliła na jednoznaczną identyfikację tych bakterii.

Technika SERS, choć została już poznana pod względem możliwości detekcji oraz identyfikacji bakterii, jako metoda niezwykle czuła wymaga specjalnego sposobu obróbki i przygotowania próbki do badań. W przeciwnym razie uzyskane wyniki są niepowtarzalne i obarczone znacznym błędem, a przez to niewiarygodne.

Nie są znane metody szybkiej detekcji i identyfikacji bakterii rodzaju *Salmonella*, *Cronobacter* oraz *L. monocytogenes* w żywności wykorzystujące wzmocnioną powierzchniowo metodę Ramana (SERS) połączoną ze standardami ISO i umożliwiające rzeczywiste wykorzystanie tej metody do badania jakości mikrobiologicznej żywności.

UJAWNIE NIE WYNAŁAZKU

W świetle opisanego stanu techniki celem niniejszego wynalazku jest przezwyciężenie wskazanych niedogodności i dostarczenie szybkiego sposobu detekcji i identyfikacji komórek

bakteryjnych w żywności z uwzględnieniem pierwszych etapów namnażania bakterii natomiast umożliwiające pominięcie testów biochemicznych.

Nieoczekiwanie okazało się, że w sposobie wykrywania obecności w żywności bakterii wybranych spośród *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp. albo *L. monocytogenes* według wynalazku łącząc metody hodowlane z techniką SERS, możliwe jest skrócenie całkowitego czasu wykrywania i identyfikacji bakterii w żywności do zaledwie około 48 godz. z około 7 dni potrzebnych dla obecnie stosowanych metod. Sama metoda pomiaru SERS stosowana w sposobie wykrywania obecności bakterii w żywności nie wymaga zastosowania żadnych odczynników i trwa zaledwie kilkadziesiąt sekund. Podłoża SERS, które są tu wykorzystywane, mogą być w niektórych przypadkach odnawialne, dzięki czemu koszt detekcji i identyfikacji bakterii nie jest wysoki. Ponadto okazało się, że sposób według wynalazku gwarantuje powtarzalność uzyskiwanych wyników i pewność rezultatu.

W związku z powyższym okazało się, że istnieje możliwość szybkiej detekcji i identyfikacji pojedynczych bakterii, szczególnie bakterii z rodzaju *Salmonella*, *Cronobacter* oraz *L. monocytogenes*, z próbek żywności przy wykorzystaniu sposobu według wynalazku opierającego się na wstępnej hodowli połączonej z analizą techniką SERS.

Ponadto okazało się, że stosując sposób według wynalazku można odróżnić od siebie dwa gatunki patogenne z rodzaju *Listeria*: *L. monocytogenes* i *L. ivanovii* bez prowadzenia dodatkowych testów biochemicznych. Te dwa gatunki można odróżnić od gatunków niepatogennych (np. *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*) stosując agarowe podłoże wybiórczo-różnicujące wg Ottaviani i Agosti zgodne z normą PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005. Bakterie z rodzaju *Listeria* na podłożu agarowym wg Ottaviani i Agosti tworzą kolonie w kolorze turkusowym, natomiast kolonie gatunków patogennych dodatkowo otoczone są mleczną strefą, co jest wynikiem aktywności enzymu, fosfolipazy C (ang. PI-PLC - phosphatidylinositol-specific phospholipase C). Jednak odróżnienie od siebie dwóch gatunków patogennych wymaga

przeprowadzenia dodatkowych testów biochemicznych (testu na hemolizę, testu CAMP i testu na zdolność fermentacji ramnozy i ksylozy). Zastosowanie sposobu wykrywania w żywności bakterii przy wykorzystaniu metody SERS według wynalazku daje możliwość szybkiego odróżnienia *L. ivanovii* od *L. monocytogenes*, ponieważ bakterie te hodowane na tym samym
5 podłożu i w tych samych warunkach, dają różne widma.

Zgodnie z wynalazkiem sposób wykrywania bakterii *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp. oraz *L. monocytogenes* w żywności, zwłaszcza gotowej do spożycia, przy wykorzystaniu metod hodowlanych sprzężonych z powierzchniowo wzmocnioną spektroskopią Ramana, oparty jest na jednolitym ogólnym schemacie postępowania i obejmuje etapy korzystne różniące się między
10 sobą w szczegółach wykonania w zależności od gatunku/rodzaju wykrywanej bakterii:

Przedmiotem wynalazku jest więc sposób wykrywania w żywności bakterii *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp. albo *L. monocytogenes*, który obejmuje następujące etapy:

a) umieszcza się próbkę badanej żywności w płynnej pożywce namnażającej odpowiedniej dla danego rodzaju/gatunku bakterii i wstępnie namnaża się w warunkach
15 zbliżonych do optimum dla danej bakterii;

b) pobiera się mieszaninę uzyskaną w pkt. a) z jednoczesnym przeniesieniem na zestalone podłoże wybiórczo – różnicujące odpowiednie dla danego rodzaju/gatunku bakterii i prowadzi dalszą hodowlę na tym podłożu w warunkach zbliżonych do optimum dla danego rodzaju/gatunku bakterii przez czas umożliwiający wyrośnięcie pojedynczych kolonii bakterii;

20 c) przenosi się odpowiednią pojedynczą kolonię bakteryjną z podłoża wybiórczo – różnicującego z pkt b) do płynu, korzystnie soli fizjologicznej z jednoczesnym zawieszeniem bakterii w płynie;

d) przenosi się uzyskaną w pkt c) zawiesinę na odpowiednie podłoże SERS;

e) wykonuje się pomiar wzmocnioną powierzchniowo spektroskopią Ramana;

f) analizuje się uzyskany wynik w odniesieniu do wyznaczonego standardu dla określonego rodzaju/gatunku bakterii i określa się występowanie lub brak występowania określonego rodzaju/gatunku bakterii w badanej żywności, przy czym korzystny wyznaczony standard jest przedstawiony na Fig.2.

5

W sposobie wykrywania w żywności bakterii *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp. albo *L. monocytogenes* w etapie f) korzystnie uzyskany wynik porównuje się wobec standardów wyznaczonych i przedstawionych na widmach (A) dla *Salmonella* spp., (B) dla *Cronobacter* spp. albo (C) dla *L. monocytogenes* jak przedstawionych na Fig.2. Standardy w bazie danych, których

10 wyniki przedstawione są na Fig.2 zostały uzyskane przez pomiary SERS bakterii znanych gatunków, które zostały sztucznie wprowadzone do próbek żywności i dalej hodowane, umieszczane i analizowane na podłożach SERS według sposobów opisanych w dalej przedstawionych przykładach wykonania.

Uzyskane widmo porównuje się z widmami różnych gatunków bakterii znajdującymi się

15 w bazie widm uzyskanej według Przykładu 1 przy zastosowaniu metody PCA (ang. Principal Component Analysis). Analiza porównawcza PCA umożliwia określenie przynależności rodzajowej/gatunkowej analizowanych bakterii z dokładnością 98%.

Stąd korzystny jest sposób wykrywania występowania w żywności bakterii, w którym w etapie d) stosuje się podłoże SERS, zawierające tlenek indowo-cynowy (ITO) oraz nanocząstki

20 srebra.

W korzystnym sposobie wykrywania występowania w żywności bakterii pomiar wzmocnioną powierzchniowo spektroskopią Ramana w etapie e) wykonuje się przy długości fali 785 nm, mocy lasera 5 mW i czasie pojedynczego pomiaru około 60 s.

Równie korzystnie w sposobie wykrywania występowania w żywności bakterii w etapie

25 c) pojedynczą kolonię przepłukuje się co najmniej jednokrotnie, korzystniej co najmniej

dwukrotnie, korzystniej 3-krotnie w tym płynie, a następnie zawiesza się bakterie w czystej porcji płynu, korzystnie w płynie fizjologicznym, przy czym korzystnie uzyskany przepłukany osad ostatecznie zawiesza się 10 µl płynu.

W korzystnym sposobie wykrywania występowania w żywności bakterii gdy
5 wykrywanie jest prowadzone w kierunku bakterii z rodzaju *Salmonella* spp.

w etapie a) umieszcza się próbkę badanej żywności, korzystnie 25 g próbki badanej żywności, w płynnej pożywce namnażającej, korzystnie w 225 ml pożywki namnażającej, przy czym korzystną pożywką namnażającą jest woda peptonowa; i przy czym wstępne namnażanie prowadzi się przez około 20 godz. w temperaturze około 37 °C; i

10 w etapie b) pobiera się dwie próbki mieszaniny uzyskanej w pkt. a); korzystnie pobiera się dwukrotnie po 10 µl mieszaniny uzyskanej w pkt. a), którą przenosi się na co najmniej dwa różne zestalone podłoża wybiórczo –selektywne odpowiednie dla *Salmonella* spp. i prowadzi dalszą hodowlę przez około 24 godz. w temperaturze około 37 °C; i

w etapie c) przenosi się do płynu odpowiednią pojedynczą kolonię bakteryjną z podłoża
15 wybiórczo – selektywnego odpowiedniego dla *Salmonella* spp. o cechach właściwych dla *Salmonella* spp. na tym z podłożu wybiórczo – selektywnym; i

w etapie f) analizuje się uzyskany wynik w odniesieniu do standardu przedstawionego na krzywej (A) na Fig.2.

Równie korzystnie w sposobie wykrywania występowania w żywności bakterii, gdy
20 wykrywanie jest prowadzone w kierunku bakterii z rodzaju *Salmonella* spp. podłożem wybiórczo – selektywnym w etapie b) jest stałe podłoże chromogenne, korzystnie podłoże zawierające 5-bromo-4-chloro-3-indolo-galaktopiranozyd (X-gal) i kaprylan 5-bromo-6-chloro-3-indolu i/lub podłoże z ksylozą i lizyną, korzystnie podłoże Xylose-Lysine-Desoxycholate.

W korzystnym sposobie wykrywania występowania w żywności bakterii gdy wykrywanie jest - w kierunku bakterii *Listeria monocytogenes*

w etapie a) umieszcza się próbkę badanej żywności, korzystanie 25 g próbki badanej żywności, w płynnej pożywce namnażającej, korzystnie w 225 ml pożywki namnażającej, przy
5 czym korzystną pożywką namnażającą jest pożywka pół-Frasera i przy czym wstępne namnażanie prowadzi się około 24 godz. w temperaturze około 30 °C, i

w etapie b) pobiera się próbkę mieszaniny uzyskanej w pkt. a), korzystnie pobiera się 10 µl mieszaniny uzyskanej w pkt. a), które przenosi się na podłoże wybiórczo – selektywne odpowiednie dla *Listeria* i prowadzi dalszą hodowlę przez około 24 godz. w temperaturze
10 około 37°C; i

przy czym korzystnym podłożem wybiórczo – selektywnym jest podłoże chromogenne, korzystnie podłoże zawierające 5-bromo-4-chloro-3-indoksyloglukozyd, korzystnie jest nim Chromogenic *Listeria* Lab Agar;

w etapie c) przenosi się do płynu odpowiednią pojedynczą kolonię bakteryjną z podłoża
15 wybiórczo – selektywnego odpowiedniego dla *L. monocytogenes* i/lub *L. ivanovii*, o cechach właściwych dla tych dwóch gatunków *Listeria* na tym podłożu wybiórczo – selektywnym; i

w etapie f) analizuje się uzyskany wynik w odniesieniu do standardu przedstawionego na krzywej (B) na Fig.2.

Równie korzystnie w sposobie wykrywania występowania w żywności bakterii gdy
20 wykrywanie jest prowadzone w kierunku bakterii *Cronobacter* spp., korzystniej *C. sakazakii*

w etapie a) umieszcza się próbkę badanej żywności, korzystnie umieszcza się 10 g badanej żywności w płynnej pożywce namnażającej, korzystnie w 90 ml płynnej pożywki namnażającej, przy czym korzystną pożywką namnażającą jest woda peptonowa; i przy czym wstępne namnażanie prowadzi się około 20 godz. w temperaturze około 37 °C; i

w etapie b) pobiera się mieszaninę uzyskaną w pkt. a), korzystnie pobiera się 10 µl mieszaniny uzyskanej w pkt. a), i przenosi się na podłoże wybiórczo –selektywne odpowiednie dla *Cronobacter* spp., korzystniej *C. sakazakii*, korzystnie na podłoże zawierające X-alfa-glukopiranozyd, korzystniej jest nim podłoże ESIA Lab Agar, i korzystnie prowadzi dalszą

5 hodowlę przez około 24 godz. w temperaturze około 44 °C, i

w etapie c) przenosi się do płynu odpowiednią pojedynczą kolonię bakteryjną z podłoża wybiórczo – selektywnego odpowiedniego dla *Cronobacter* spp., korzystniej *C. sakazakii* o cechach właściwych dla *Cronobacter* spp., korzystniej *C. sakazakii* na tym z podłożu wybiórczo – selektywnym; i

10 w etapie f) analizuje się uzyskany wynik w odniesieniu do standardu przedstawionego na krzywej (C) na Fig.2.

Cytowane w opisie publikacje oraz podane w nich odniesienia są również niniejszym włączone jako referencje.

15 KRÓTKI OPIS FIGUR

Dla lepszego zrozumienia wynalazku, został on zilustrowany w przykładach wykonania oraz na załączonych figurach rysunku, na których:

Fig. 1 przedstawia dwa obrazy SEM podłoża ITO/Ag z zaadsorbowanymi do ich powierzchni bakteriami *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium

20 (*S. Typhimurium*)

Fig. 2 przedstawia widma SERS bakterii: (A) *S. Typhimurium* (B) *L. monocytogenes* i (C) *C. sakazakii* zaadsorbowanych na podłożu ITO/Ag.

Fig. 3 przedstawia analizę chemometryczną PCA dla otrzymanych widm bakterii (do analizy każdego z gatunków wykorzystano 30 widm)

25 SPOSOBY WYKONANIA WYNALAZKU

Poniższe przykłady umieszczono jedynie w celu zilustrowania wynalazku oraz wyjaśnienia poszczególnych jego aspektów, a nie w celu jego ograniczenia i nie powinny być utożsamiane z całym jego zakresem, który zdefiniowano w załączonych zastrzeżeniach.

W poniższych przykładach, jeśli nie wskazano inaczej stosowano standardowe materiały i metody stosowane w dziedzinie lub postępowano zgodnie z zaleceniami producentów dla określonych materiałów i metod.

Podłoża płynne: (a) zbuforowana woda peptonowa wykorzystywane do hodowli bakterii z rodzaju *Salmonella* i *Cronobacter*, (b) MKTTn, RVS wykorzystywane do hodowli bakterii *Salmonella*, (c) podłoże pół-Frazer i Frazer wykorzystywane do hodowli *L. monocytogenes*, (d) mLST wykorzystywane do hodowli bakterii z rodzaju *Cronobacter* pochodziły z firmy Biocorp a ich skład jest opisany w normach PN-EN ISO 6579:2003, PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 oraz 3) PKN-ISO/TS 22964: 2008.

Podłoża agarowe: (a) Chromogenic Salmonella Lab Agar i XLD wykorzystywane do hodowli bakterii z rodzaju *Salmonella*, (b) Chromogenic Listeria Lab Agar i Palcam wykorzystywane do hodowli *L. monocytogenes* i *L. ivanovii* oraz ESIA Lab Agar wykorzystywane do hodowli bakterii z rodzaju *Cronobacter* pochodziły z firmy Biocorp. Skład podłoży XLD, Chromogenic Listeria Lab Agar, Palcam oraz ESIA Lab Agar jest opisany w normach PN-EN ISO 6579:2003, PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 oraz PKN-ISO/TS 22964: 2008. Skład podłoża Chromogenic Salmonella Lab Agar opisany przez producenta.

PRZYKŁADY

Przykład 1 - uzyskanie standardów poprzez wyznaczenie widm SERS dla poszczególnych rodzajów/gatunków bakterii

Początkowo produkty spożywcze umieszczono w kolbie z odpowiednią pożywką namnażającą płynną (dla *S. Typhimurium* i *C. sakazakii* - zbuforowana woda peptonowa, dla *L. monocytogenes* – pożywka pół-Frasera) oraz zaszczepiono je 100 jtk danego gatunku bakterii. W

przypadku wykrywania bakterii *S. Typhimurium* matrycą były jaja kurze w ilości 25 g, w przypadku *L. monocytogenes* - szynka gotowana w ilości 25 g, a w przypadku *C. sakazakii* - 10 g mleka w proszku dla niemowląt. Hodowlę prowadzono przez 20 godz. w temperaturze 37 °C w przypadku *S. Typhimurium* i *C. sakazakii* oraz przez 24 godz. w temperaturze 30 °C w

5 przypadku *L. monocytogenes*.

Następnie, pożywki płynne namnażające z namnożonym materiałem biologicznym przeszczepiono zarówno na pożywki selektywne płynne jak i stałe. Pożywki z *S. Typhimurium* w ilości 1 ml zostały przeszczepione do 10 ml pożywek RVS (hodowla przez 24 godz. w temperaturze 41,5 °C) i MKTTn (hodowla przez 24 godz. w temperaturze 37 °C) oraz w ilości

10 10 µl na pożywki Chromogenic Salmonella Lab Agar i XLD (w obydwu przypadkach hodowla przez 24 godz. w temperaturze 37 °C), pożywki z *L. monocytogenes* w ilości 0,1 ml zostały przeszczepione do 10 ml pożywki Frasera (hodowla przez 48 godz. w temperaturze 37 °C) oraz w ilości 10 µl na pożywki Chromogenic Listeria Lab Agar i Palcam (w obydwu przypadkach hodowla przez 24 godz. w temperaturze 37 °C), a pożywki z *C. sakazakii* w ilości 0,1 ml zostały

15 przeszczepione do 10 ml pożywki mLST (hodowla przez 24 godz. w temperaturze 44 °C) oraz w ilości 10 µl na pożywkę ESIA Lab Agar (hodowla przez 24 godz. w temperaturze 44 °C). Po odpowiednim czasie hodowli pobrano materiał tylko z pożywek wybiórczo-różnicujących stałych i przeniesiono do probówek typu eppendorf zawierających 10 µl płynu fizjologicznego. Materiał ze wszystkich pożywek płynnych przeniesiono w ilości 10 µl na następujące podłoża

20 stałe: Chromogenic Salmonella Lab Agar i XLD w przypadku *S. Typhimurium* (w obydwu przypadkach hodowla przez 24 godz. w temperaturze 37 °C), Chromogenic Listeria Lab Agar i Palcam w przypadku *L. monocytogenes* (w obydwu przypadkach hodowla przez 24 godz. w temperaturze 37 °C oraz ESIA Lab Agar w przypadku *C. sakazakii* (hodowla przez 24 godz. w temperaturze 44 °C). Po odpowiednim czasie hodowli pobrano materiał z tych pożywek i

25 przeniesiono do probówek typu eppendorf zawierających 10 µl płynu fizjologicznego. Dwa

warianty hodowli w przypadku każdego z gatunków bakterii miały na celu sprawdzenie, czy między widmami SERS będą występowały różnice.

Wszystkie ww. typy hodowli prowadzono również z dłuższym wariantem czasu hodowli tj. łącznie 72 godz. wraz z pomiarem SERS. Zastosowanie dodatkowego, dłuższego wariantu hodowli nie wpłynęło na zmiany w widmach bakterii badanych SERS, w związku z czym możliwe jest zastosowanie tylko wariantów krótszych czasowo, co pozwala przyspieszyć czas do uzyskania końcowego wyniku analizy.

W każdym przypadku do trzech oddzielnych probówek typu eppendorf z płynem fizjologicznym pobrano po jednej kolonii danego rodzaju/gatunku bakterii (w przypadku *S. Typhimurium* kolonie fioletowe na Chromogenic Salmonella Lab Agar i czarne na XLD, w przypadku *L. monocytogenes* kolonie turkusowe z białym „halo” wokół kolonii na Chromogenic Listeria Lab Agar i szaro-zielone na Palcam oraz w przypadku *C. sakazakii* kolonie zielone na ESIA Lab Agar). Probówki zwirowano przy obrotach 4000 rpm, Płyn znad kolonii zlano, a probówki zalano 20 µl płynu fizjologicznego i ponownie zwirowano. Procedurę powtórzono 3 razy. Ostatecznie pelety zawieszono w objętości 10 µl i w ilości 5 µl przeniesiono na podłoże SERS ITO/Ag. Pomiary SERS prowadzono od razu po naniesieniu peletu, w temperaturze pokojowej, mocy lasera 5 mW, czasie pojedynczego pomiaru 60 s i długości fali lasera 785 nm. Uzyskane widma z każdej próbki uśredniono w obrębie tego samego gatunku. Widma te służą jako standardy odniesienia i zostały przedstawione na Fig.2.

Przykład 2 – określenie występowania bakterii w produktach spożywczych

Produkty spożywcze umieszczono w kolbie z odpowiednią pożywką hodowlaną płynną. W przypadku detekcji i identyfikacji bakterii *S. Typhimurium* w oddzielnych kolbach umieszczono 25 g jaj kurzych i 25 g wędzonego łososia w 225 ml wody peptonowej, w przypadku *L. monocytogenes*- 25 g szynki gotowanej i 25 g wędzonego łososia w 225 ml pożywki pół-Frazera a w przypadku *C. sakazakii*- 10 g ziół prowansalskich i 10 g mleka w

proszku dla niemowląt w 90 ml wody peptonowej. Hodowlę prowadzono przez 20 godz. w temperaturze 37 °C w przypadku *S. Typhimurium* i *C. sakazakii* oraz przez 24 godz. w temperaturze 30 °C w przypadku *L. monocytogenes*.

Wszystkie hodowle prowadzono w trzech wariantach: wariant kontrolny – do pożywki
 5 dodano jedynie próbkę żywności w odpowiedniej ilości, wariant eksperymentalny I - do pożywki
 dodano próbkę żywności w odpowiedniej ilości oraz ok. 100 jednostek tworzących kolonię (jtk
 (ang. cfu)), wariant eksperymentalny II - do pożywki dodano próbkę żywności w odpowiedniej
 ilości oraz ok. 10 jednostek tworzących kolonię (jtk). W celu dodania odpowiedniej ilości
 bakterii do pożywek płynnych, w przypadku obydwu wariantów eksperymentalnych,
 10 skorzystano z densytometru (skala McFarlanda). Miało to na celu sprawdzenie granicy detekcji
 bakterii metodą według wynalazku.

Następnie, pożywki płynne namnażające z namnożonym materiałem biologicznym
 przeszczepiono na pożywki selektywne stałe. Pożywki z *S. Typhimurium* w ilości 10 µl na
 pożywki Chromogenic Salmonella Lab Agar i XLD (w obydwu przypadkach hodowla przez 24
 15 godz. w temperaturze 37 °C), pożywki z *L. monocytogenes* w ilości 10 µl na pożywki
 Chromogenic Listeria Lab Agar i Palcam (w obydwu przypadkach hodowla przez 24 godz. w
 temperaturze 37 °C), a pożywki z *C. sakazakii* w ilości 10 µl na pożywkę ESIA Lab Agar
 (hodowla przez 24 godz. w temperaturze 44 °C). Po odpowiednim czasie hodowli pobrano
 materiał z pożywek selektywnych stałych i przeniesiono do probówek typu eppendorf
 20 zawierających 10 µl płynu fizjologicznego. W każdym przypadku do trzech oddzielnych
 probówek typu eppendorf z płynem fizjologicznym pobrano po jednej kolonii danego
 rodzaju/gatunku bakterii (w przypadku *Salmonella*: kolonie fioletowe na Chromogenic
 Salmonella Lab Agar i czarne na XLD, w przypadku *L. monocytogenes* kolonie turkusowe z
 białym „halo” wokół kolonii na Chromogenic Listeria Lab Agar i szaro-zielone na Palcam oraz
 25 w przypadku *C. sakazakii* kolonie zielone na ESIA Lab Agar).

Probówki wirowano przy obrotach 4000 rpm. Płyn usunięto, a osad zalano 20 µl płynu fizjologicznego i ponownie zwirowano. Procedurę płukania powtórzono 3 razy. Ostatecznie pelety zawieszono w objętości 10 µl i w ilości 5 µl przeniesiono na podłoże SERS ITO/Ag. Pomiar SERS prowadzono od razu po naniesieniu peletu, w temperaturze pokojowej, przy 5 mocy lasera 5 mW, czasie pojedynczego pomiaru 60 s i długości fali lasera 785 nm. Otrzymane wyniki, dla wariantów eksperymentalnych I i II pokrywały się z widmami uzyskanymi według standardu (Przykład 1). Co więcej wykazano, że możliwa jest detekcja nawet pojedynczych komórek bakteryjnych w żywności. W wariantach kontrolnych nie otrzymano kolonii bakteryjnych szukanych gatunków. W ramach potwierdzenia jednoznaczności otrzymanych 10 rezultatów, przeanalizowano pod względem spektrometrycznym pozostałe kolonie bakterii, które różniły się kolorem od bakterii szukanych, lecz współwystępowały z nimi na podłożach wybiórczo-różnicujących. Ich widma różniły się od widm bakterii szukanych, co potwierdziła analiza chemometryczna (PCA).

15 **Przykład 3** – korzystne przykłady sposobu wykrywania bakterii w żywności dla poszczególnych grup bakterii

Poniżej przedstawione są przeprowadzone szczególnie korzystne warianty sposobu wykrywania bakterii w żywności według wynalazku dla poszczególnych grup bakterii: Sposób wykrywania bakterii w żywności dla poszczególnych grup bakterii prowadzony był zgodnie z 20 procedurą opisaną w przykładzie 1 i 2 z następującymi modyfikacjami

Salmonella spp.

- a) Hodowlę prowadzono z 25 g żywności w 225 ml pożywki namnażającej;
- b) Prowadzono równocześnie hodowlę 10 µl uzyskanej mieszaniny na dwóch różnych podłożach wybiórczo-selektywnych przez 24 godz. w temperaturze 37 °C;
- 25 c) Przeniesiono pojedynczą kolonię bakterii z rodzaju *Salmonella* (o odpowiedniej barwie wskazanej przez producenta) do płynu fizjologicznego (0,9% NaCl), trzykrotnie

odpłukano w płynie fizjologicznym i ostateczne zawieszono w czystej porcji płynu fizjologicznego;

- d) Przeniesiono uzyskaną zawiesinę na podłoże SERS;
- e) Przeprowadzono pomiar ramanowski i analizę PCA w odniesieniu do standardu przedstawionego na krzywej (A) na Fig.2.

Listeria monocytogenes

- f) Hodowlę prowadzono z 25 g żywności w 225 ml pożywki namnażającej;
- g) Prowadzono hodowlę 10 µl uzyskanej mieszaniny na podłożu wybiórczo-selektywnym przez 24 godz. w temperaturze 37 °C;
- h) Przeniesiono pojedynczą kolonię *Listeria* (o odpowiedniej barwie wskazanej przez producenta) do płynu fizjologicznego (0,9% NaCl), trzykrotnie odpłukano w płynie fizjologicznym i ostateczne zawieszono w czystej porcji płynu fizjologicznego;
- i) Przeniesiono uzyskaną zawiesinę na podłoże SERS;
- j) Przeprowadzono pomiar ramanowski i analizę PCA w odniesieniu do standardu, przedstawionego na krzywej (B) na Fig.2.

Cronobacter sakazakii (wg poprzedniej nomenklatury: *Enterobacter sakazakii*)

- k) Hodowlę prowadzono z 10 g żywności w 90 ml pożywki namnażającej;
- l) Hodowano 10 µl uzyskanej mieszaniny na podłożu wybiórczo-selektywnym;
- m) Przeniesiono pojedynczą kolonię bakterii z rodzaju *Cronobacter* (o odpowiedniej barwie wskazanej przez producenta) do płynu fizjologicznego (0,9% NaCl), trzykrotnie odpłukano w płynie fizjologicznym i ostateczne zawieszono w czystej porcji płynu fizjologicznego.
- n) Przeniesiono uzyskaną zawiesinę na podłoże SERS;

o) Prowadzono pomiar ramanowski i analizę PCA w odniesieniu do standardu przedstawionego na krzywej (C) na Fig.2.

Korzystnie w innym wykonaniu, w etapie a) i k) jako pożywkę namnażającą zastosowano wodę peptonową (skład: pepton 10.0 g/L, NaCl 5.0 g/L, Na₂HPO₄ 3.5 g/L, KH₂PO₄ 1.5 g/L),
 5 zatwierdzoną w metodzie ISO, a hodowlę prowadzono przez 20 godz., w temperaturze 37 °C.

Korzystnie w innym wykonaniu w etapie b) do hodowli selektywnej zastosowano stałe podłoża chromogenne, korzystnie podłoże zawierające 5-bromo-4-chloro-3-indolo-galaktopiranozyd (X-gal) i kaprylan 5-bromo-6-chloro-3-indolu oraz podłoże Xylose-Lysine-Desoxycholate - XLD (z ksylozą i lizyną), jako że metoda ISO przewiduje zastosowanie dwóch
 10 pożywek selektywnych: XLD oraz innej wybranej pożywki selektywnej.

Korzystnie w kolejnym wykonaniu, w etapie c), h) i m) pojedynczą kolonię przepłukano przez 3-krotne zawieszenie i odwirowanie w wirówce, korzystnie przy ilości obrotów na minutę wynoszącej 4000 rpm, korzystnie przez 5 minut. Kolonię ostatecznie zawieszono w objętości 10 µl w celu uzyskania wysokiego stężenia komórek bakteryjnych.

15 Korzystnie w kolejnym wykonaniu, w etapie d), i) i n) korzystano z podłoża SERS, w których skład wchodzi ITO (ang. indium tin oxide, tlenek indowo-cynowy) oraz nanocząstki srebra, ponieważ dla tych podłoży uzyskano znaczne wzmocnienie sygnału SERS z niskim tłem nie zakłócającym obrazu spektralnego bakterii.

Korzystnie w kolejnym wykonaniu, w etapie e), j) i o) dokonano pomiaru przy długości
 20 fali 785 nm, mocy lasera 5 mW i czasie pojedynczego pomiaru 60 s, ponieważ te parametry okazały się optymalne po ocenie jakości sygnału SERS.

Korzystnie w kolejnym wykonaniu, w etapie f) jako pożywkę namnażającą zastosowano pożywkę pół-Frasera, a hodowlę prowadzono przez 24 godz. w temperaturze 30 °C.

Korzystnie w kolejnym wykonaniu, w etapie g) do hodowli selektywnej stosowano stałe
 25 podłoża chromogenne, korzystnie podłoże zawierające 5-bromo-4-chloro-3-indolilo β-D-

glukopiranozyd i L - α fosfatydilinozytol, korzystnie pożywkę - Chromogenic Listeria Lab Agar.

Korzystnie, w etapie 1) jako pożywkę namnażającą stosowano pożywkę zawierającą 5-bromo-4-chloro-3-indolilo α -D-glukopiranozyd, korzystnie pożywkę ESIA Lab Agar, przy
5 czym hodowle prowadzono przez 24 godz. w temperaturze około 44 °C.

Przykład 4 – walidacja sposobu

W ramach potwierdzenia uzyskanych wyników każdą z próbek żywności zawierającą poszukiwane bakterie z Przykładu 2 i 3 poddano całościowym analizom według standardów ISO na obecność tych bakterii. Badania te potwierdziły, podobnie jak badania SERS, obecność
10 tychże bakterii. Badania te potwierdziły, że opracowany przez twórców nowy sposobu wykrywania występowania w żywności bakterii wybranych spośród *Salmonella* spp., *Cronobacter* spp. albo *L. monocytogenes* według wynalazku pozwala na szybkie wykrywania tych bakterii w żywności zapewnia pewność uzyskanego rezultatu.