

JAROSŁAW KOWALIK, SYLWIA TARCZYŃSKA, STEFAN ZIAJKA

## PRÓBA ZASTOSOWANIA IMPEDYMETRII DO SZACOWANIA WZROSTU DROBNOUSTROJÓW

### KOMUNIKAT NAUKOWY

#### Streszczenie

Na rozwój metody szacowania ryzyka mikrobiologicznego (MRA) miały wpływ takie czynniki, jak: stosowanie systemu HACCP w zakładach branży spożywczej; preferowanie przez konsumentów świeżych, mniej przetworzonych produktów żywnościowych; określenie bezpiecznego okresu przechowywania różnych rodzajów produktów żywnościowych; zmiana epidemiologii zatruc i zakażeń pokarmowych ze względu na pojawienie się zagrożenia nowymi rodzajami drobnoustrojów oraz obniżona odporność u coraz większej liczby ludzi.

Do analizowania wzrostu drobnoustrojów w surowcach i produktach mleczarskich można zastosować, oprócz klasycznej metody płytkowej, również zjawisko impedancji. Zasada oznaczeń z wykorzystaniem impedymetrii polega na ocenie zmiany oporności elektrycznej pożywek hodowlanych, wywołanej wzrostem różnych mikroorganizmów lub specyficznej ich grupy.

Celem pracy było określenie przydatności systemu monitorującego Bactometer M 64 do analizy wzrostu i przeżywalności drobnoustrojów w modyfikowanych pożywkach mikrobiologicznych.

W badaniach wykorzystano modelowe produkty uzyskane przez modyfikację pożywki (bioMerieux), stosując dodatek kwasu mlekowego, soli kuchennej i azotanu(V) sodu. Doświadczenie wykonano z udziałem gramujemnych pałeczek *Escherichia coli* 22. Analizy mikrobiologiczne przeprowadzono metodą z zastosowaniem impedymetrycznego systemu monitorującego. Uzyskiwane wyniki (czas detekcji) mogą być przydatne w mikrobiologii prognostycznej umożliwiając określenie reakcji mikroorganizmów na zmieniające się warunki w żywności.

**Słowa kluczowe:** mikrobiologia prognostyczna, system impedymetryczny, szacowanie ryzyka mikrobiologicznego.

#### Wprowadzenie

Wzrastająca zapadalność na choroby spowodowana jest w wielu krajach występowaniem drobnoustrojów chorobotwórczych w żywności [1, 6]. W związku z tym

---

*Mgr inż. J. Kowalik, dr inż. S. Tarczyńska, prof. dr hab. S. Ziajka, Instytut Rozwoju Mleczarstwa, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, ul. Oczapowskiego 7, 10-957 Olsztyn -Kortowo*

Światowa Organizacja ds. Rolnictwa i Wyżywienia (FAO) i Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) podjęły problematykę bezpieczeństwa żywności na poziomie narodowym, jak i międzynarodowym. Ocena ryzyka związanego ze spożywaną żywnością dostarcza informacji, które pozwalają lepiej zrozumieć wzajemne oddziaływanie między drobnoustrojami, żywnością i chorobami ludzkimi. Dzięki niej istnieje możliwość stworzenia narzędzi pozwalających na identyfikację i zoptymalizowanie ryzyka mikrobiologicznego [1].

Oszacowanie ryzyka mikrobiologicznego (ang. Microbiological Risk Assessment –MRA) jest metodą umożliwiającą:

- oszacowanie ryzyka (identyfikacja zagrożeń, charakterystyka zagrożeń, oszacowanie narażenia i charakterystyka ryzyka),
- zarządzanie ryzykiem (wyważona polityka konsultacji między wszystkimi zainteresowanymi stronami, rozważającymi oszacowanie ryzyka i innymi czynnikami związanymi z ochroną zdrowia konsumentów oraz promowaniem uczciwych praktyk handlowych, mająca na celu opracowanie i wprowadzenie w życie strategii kontrolujących ryzyko),
- komunikację ryzyka (wymiana informacji i opinii przez proces analizy ryzyka dotyczący zagrożeń i ryzyka oraz czynników wpływających na ryzyko, pomiędzy odpowiedzialnymi za analizę i zarządzanie ryzykiem, konsumentami, przemysłem, społecznościami naukowymi oraz innymi zainteresowanymi stronami) [1, 5, 9, 10].

Analizy mikrobiologiczne prowadzone w celu kontroli wzrostu drobnoustrojów są bardzo długotrwałe, kosztowne i nie w pełni skuteczne. Metodyka badań kontrolnych pozwala ocenić zmiany sensoryczne, chemiczne i fizykochemiczne nie udzielając odpowiedzi do momentu, gdy w produkcji nie będzie wystarczająco dużej liczby drobnoustrojów niepożądanych, czyli gdy zepsucie produktu jest ewidentne. Rozwiązaniem może być prognozowanie mikrobiologiczne umożliwiające przewidywanie rozwoju, przeżywalności lub inaktywacji mikroorganizmów w produktach spożywczych [7].

Określenie reakcji mikroorganizmów na czynniki wpływające na wzrost drobnoustrojów w żywności umożliwia przewidywanie ich zachowania w żywności na podstawie wykonanych w przeszłości badań [2]. Mikrobiologia prognostyczna jest obiecującym i szybko rozwijającym się obszarem nauki o żywności, który nabrał znaczącej naukowej wagi w ostatnich latach. Łączy ona w sobie takie dziedziny nauki, jak: matematyka, technologia, chemia i mikrobiologia, które dają możliwość przewidywania zachowań mikroorganizmów w żywności w danych warunkach [10].

Do badań mikrobiologicznych produktów spożywczych wykorzystuje się oprócz klasycznych metod także metodę impedymetryczną. Zasada oznaczania polega na ocenie zmiany impedancji pożywek hodowlanych, wywołanej wzrostem wszystkich mikroorganizmów lub specyficznej ich grupy [3]. Żywe komórki w czasie wzrostu i namnażania powodują zmianę składu pożywki, przekształcając słabo zdysocjowane

lub niezdysocjowane związki wielkocząsteczkowe (polisacharydy, tłuszcze, białka) do dobrze dysocjujących związków o mniejszej masie molekularnej, takich jak: kwasy organiczne, kwasy tłuszczowe, aminokwasy. W miarę gromadzenia produktów metabolizmu następuje obniżenie oporu medium w czasie przepływu prądu elektrycznego pomiędzy elektrodami zanurzonymi w hodowli mikroorganizmów, co zostaje zarejestrowane przez instrument pomiarowy [8].

Celem pracy było określenie przydatności systemu monitorującego Bactometer M 64 do analizy wzrostu i przeżywalności drobnoustrojów w modyfikowanych pożywkach mikrobiologicznych.

### Material i metody badań

W badaniach zastosowano mikrobiologiczny system monitorujący Bactometer M64 firmy bioMerieux. Impedymetr ten składa się z jednej jednostki pomiarowej – inkubatora sprzężonego z komputerem. Jednostka pomiarowa składa się z dwóch oddzielnych komór o indywidualnym systemie grzewczo-chłodniczym i regulowanej temperaturze w zakresie od 8 do 55°C, z dokładnością do 0,1°C. W każdej komorze są gniazda na wprowadzenie dwóch lub czterech modułów hodowlanych. Zapisywane zmiany parametrów elektrycznych tworzą krzywą impedancji analogiczną do krzywej wzrostu bakterii. Czas liczony od rozpoczęcia hodowli drobnoustrojów do pojawienia się tej istotnej zmiany określa się pojęciem czasu detekcji – czasu wykrycia (DT – Detection Time) [4, 7].

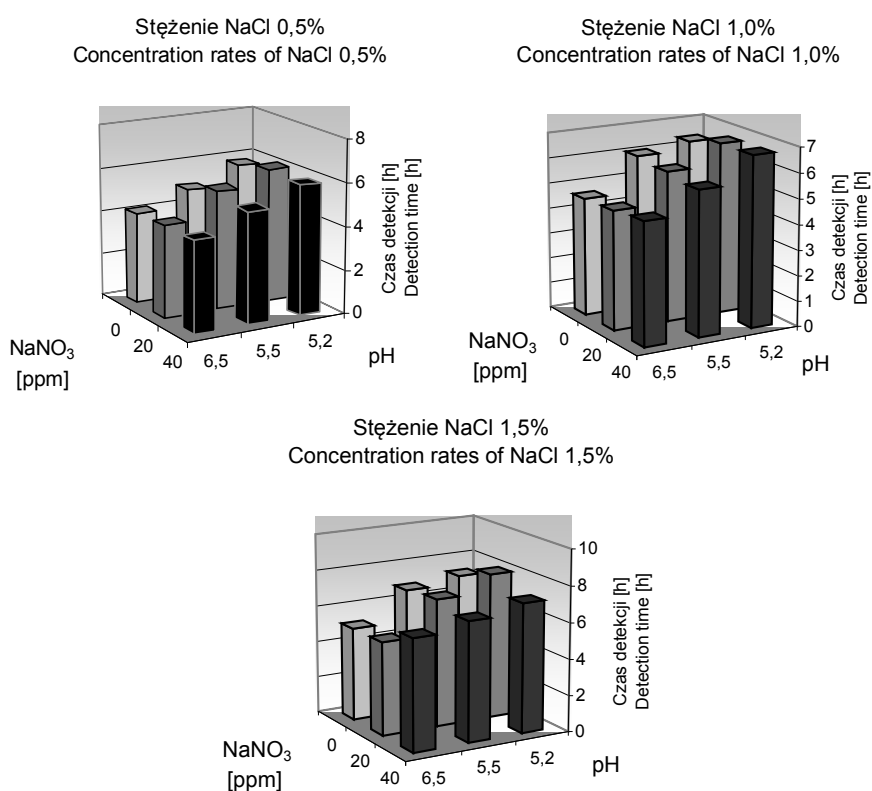
Badania przeprowadzono wykorzystując szczep *Escherichia coli* 22 (wyizolowany z materiału klinicznego z laboratorium bakteriologicznego Szpitala Wojewódzkiego w Olsztynie) pozyskany z kolekcji Katedry Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydziału Nauki o Żywności, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Bakterie przechowywano na skosie agarowym. Przed przystąpieniem do badań szczep pasażowano w bulionie odżywczym w temp. 37°C/18h (czas po którym liczba jednostek tworzących kolonie jest rzędu  $1,5-2 \times 10^9$  w  $\text{cm}^3$ ). Prowadzono kontrolę liczby bakterii (posiew na płytce Petriego z agarem odżywczym) w pożywce namnażającej do uzyskania zbliżonej liczby j.t.k. w  $1 \text{ cm}^3$  w każdym dniu. Analizowano zachowanie się bakterii *Escherichia coli* 22 w 27. zmodyfikowanych pożywkach wykonanych na bazie pożywki selektywnej (CM – firmy bioMerieux) (tab. 1). Pożywkę modyfikowano w celu zróżnicowania warunków wzrostu drobnoustrojów. Modyfikacji dokonano przez dodatek NaCl i  $\text{NaNO}_3$  w różnych stężeniach oraz kwasu mlekowego (do uzyskaniażądanego pH). Przygotowany „produkt” zaszczepiono bakteriami do poziomu  $1,5-2 \times 10^4$  j.t.k./ $\text{cm}^3$ . Do celek modułu baktometru wprowadzono po  $2 \text{ cm}^3$  zmodyfikowanych pożywek ze stałą liczbą bakterii (około  $3-4 \times 10^4$  j.t.k./ $\text{cm}^3$ ). Przygotowane pożywki przed zaszczepieniem poddawano sterylizacji w autoklawie w temp. 121°C/15 min.

Zaszczepione pożywki w celkach modułów umieszczonych w baktometrze inkubowano w temp. 37°C przez 48 h.

Doświadczenie wykonano pięciokrotnie. Każdą próbę przeprowadzono w trzech powtórzeniach.

### Omówienie wyników

W poszczególnych niezależnie pracujących celkach modułów uzyskano różny czas detekcji (tab. 1). Zależności pomiędzy składnikami pożywki wpływającymi na czas wykrycia przedstawiono w postaci wykresów słupkowych (rys. 1–3) wyliczając średnie arytmetyczne DT z pięciu wykonanych doświadczeń. Świadczy to o różnym stopniu wzrostu drobnoustrojów w stworzonych warunkach. W próbkach o stężeniu 0,5% NaCl czas detekcji był odwrotnie proporcjonalny do wartości pH pożywki



Rys. 1. Wpływ pH i NaNO<sub>3</sub> na czas detekcji *Escherichia coli* przy trzech stężeniach NaCl: 0,5; 1,0; 1,5 [%].

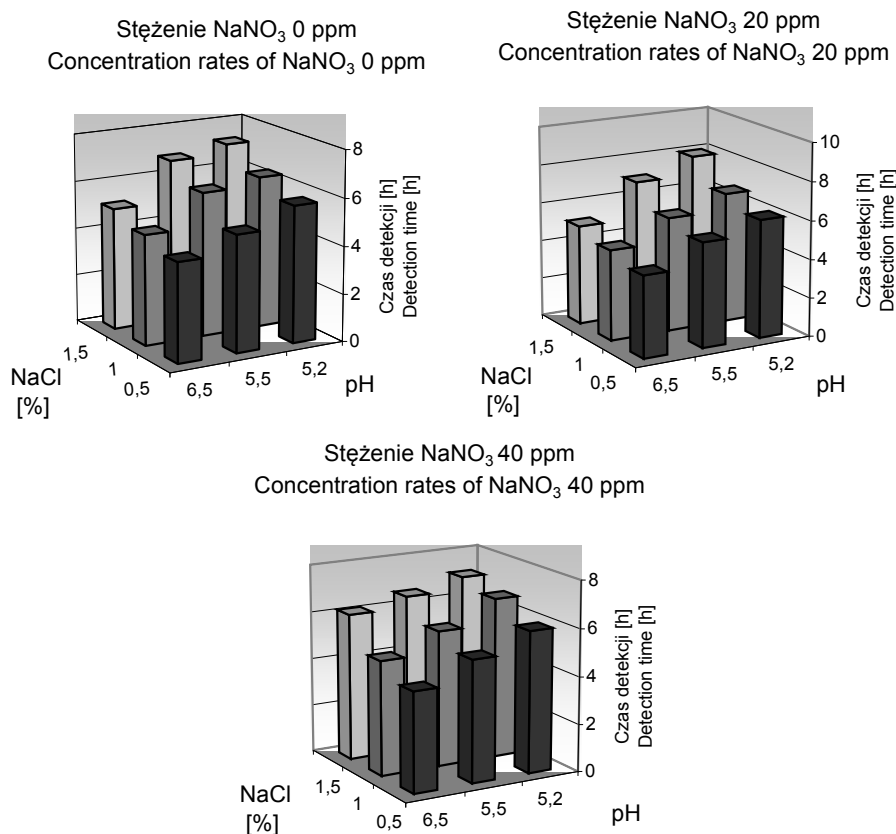
Fig. 1. The effect of pH and NaNO<sub>3</sub> on the detection time of *Escherichia coli* for the three concentration rates of NaCl: 0,5; 1,0; and 1,5 [%].

Tabela 1

Średni czas detekcji [h], uzyskany na podstawie wyliczonej średniej arytmetycznej z pięciu kolejnych powtórzeń doświadczenia.  
The Mean Detection Time [h] obtained on the basis of a computed arithmetic average of five successive repetitions of the experiment.

Parametry Parameters	Nr pożywki modyfikowanej / Number of the modified medium													
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	
pH	6,5	5,5	5,2	6,5	5,5	5,2	6,5	5,5	5,2	6,5	5,5	5,2	6,5	
NaCl [%]	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	
NaNO <sub>3</sub> [ppm]	40	40	40	20	20	20	0	0	0	40	40	40	20	
Czas detekcji [h] Detection time [h]	4,21	5,14	5,97	4,24	5,44	6,13	4,17	4,92	5,76	4,82	5,71	6,75	4,69	
Parametry Parameters	Nr pożywki modyfikowanej / Number of the modified medium													
	14.	15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.	25.	26.	27.
pH	5,5	5,2	6,5	5,5	5,2	6,5	5,5	5,2	6,5	5,5	5,2	6,5	5,5	5,2
NaCl [%]	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
NaNO <sub>3</sub> [ppm]	20	20	0	0	0	40	40	40	20	20	20	0	0	0
Czas detekcji [h] Detection time [h]	5,91	6,74	4,64	6,05	6,37	6,16	6,62	7,15	5,15	7,05	8,02	5,12	6,84	7,24

(rys. 1). Przy pH 6,5, stężenie  $\text{NaNO}_3$  (w przedziale 0–40 ppm) nie miało wpływu na wzrost bakterii. W tym przypadku czas detekcji kształtował się na poziomie około 4,2 h. Stosując pożywkę o pH 5,5 nastąpiło wydłużenie DT w zakresie 0,8–1,2 h. Najkrótszy czas detekcji (4,92 h) wystąpił w pożywce bez dodatku  $\text{NaNO}_3$ , najdłuższy (5,44 h) w próbce o stężeniu 20 ppm  $\text{NaNO}_3$ .

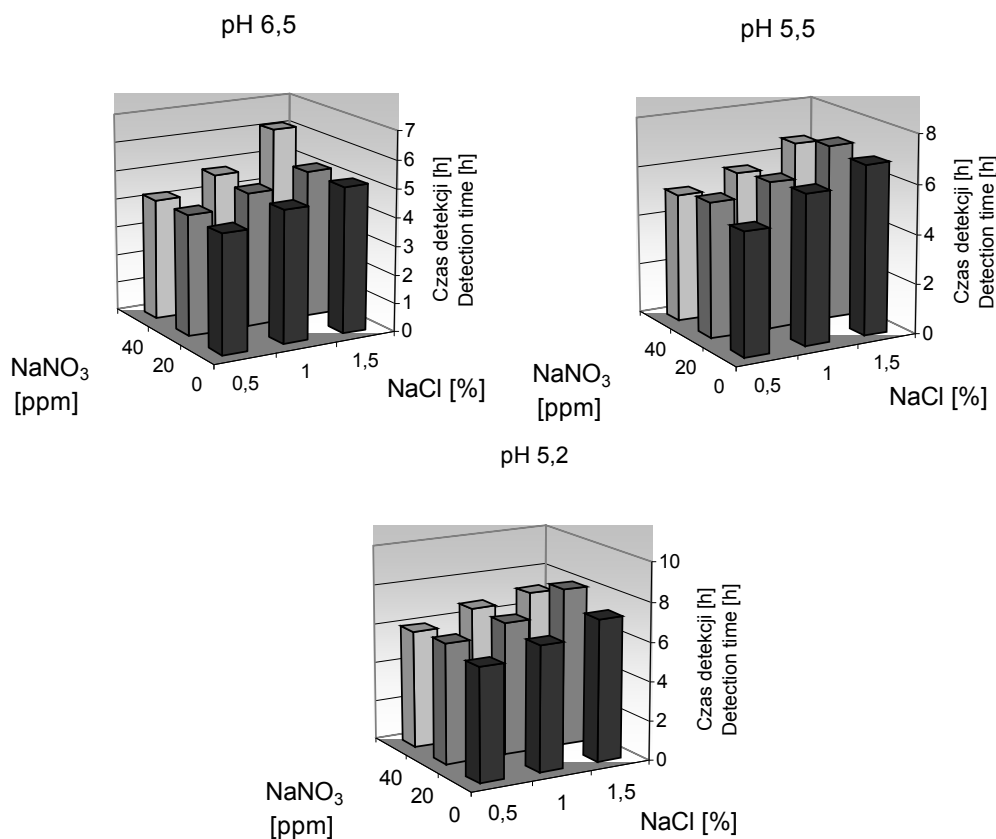


Rys. 2. Wpływ pH i NaCl na czas detekcji *Escherichia coli* przy trzech różnych stężeniach  $\text{NaNO}_3$ : 0; 20; 40 [ppm].

Fig. 2. The effect of pH and NaCl on the detection time of *Escherichia coli* for the three concentration rates of  $\text{NaNO}_3$ : 0; 20; and 40 [ppm].

Przy 1,5% stężeniu NaCl i pH 6,5 czas detekcji bakterii kształtował się w zakresie 5,12–5,15 h zarówno w próbce bez  $\text{NaNO}_3$ , jak i przy stężeniu 20 ppm, zaś przy stężeniu 40 ppm  $\text{NaNO}_3$  nastąpił wyraźny wzrost DT od 1 h do 6,16 h. Zmniejszając pH pożywki do 5,5 czas detekcji wzrastał do 6,62 h przy stężeniu 40 ppm, 6,84 h w próbce bez  $\text{NaNO}_3$  i 7,05 h przy stężeniu 20 ppm. Dalszy wzrost kwasowości powodował

wzrost DT do 8,02 h w przypadku stężenia 20 ppm oraz do 7,15 h przy 40 ppm i 7,24 h w próbce bez dodatku  $\text{NaNO}_3$ .



Rys. 3. Wpływ NaCl i  $\text{NaNO}_3$  na czas detekcji *Escherichia coli* przy trzech wartościach pH: 6,5; 5,5; 5,2.

Fig. 3. The effect of NaCl and  $\text{NaNO}_3$  on the detection time of *Escherichia coli* for the three values of pH: 6,5; 5,5; 5,2.

### Wnioski

1. System impedymetryczny Bactometer M64 z powodzeniem może być używany do określania czasu detekcji drobnoustrojów w produktach spożywczych.
2. Urządzenie daje możliwość obserwacji zachowania drobnoustrojów w różnych warunkach środowiska.
3. Zastosowanie systemu impedymetrycznego może stać się narzędziem technik modelowania mikrobiologicznego, pozwalającym szybko określić reakcje mikroorganizmów na zmieniające się warunki w żywności.

### Literatura

- [1] Brown M., M. Stringen.: Microbiological risk assessment in food processing: Woodhead Publishing Limited, Cambridge 2002.
- [2] Buchanan R.L.: Predictive food microbiology. Trends Food Sci. Technol., 1993, **4**, 1-6.
- [3] Czajkowska D., Witkowska-Gwiazdowska A.: Metoda impedymetryczna w wykrywaniu drożdży bakterii fermentacji mlekowej w sokach z owoców cytrusowych. Przem. Spoż., 1998, **12**, 14-18.
- [4] Czajkowska D., Witkowska-Gwiazdowska A.: Postęp w analizach mikrobiologicznych żywności II. Zastosowanie metod instrumentalnych. Przem. Spoż., 1997, **4**, 39-42.
- [5] General Risk Analysis [http://www.foodriskclearinghouse.umd.edu/risk\\_analysis.cfm](http://www.foodriskclearinghouse.umd.edu/risk_analysis.cfm) (styczeń, 2004)
- [6] Kłossowska A., Malinowski E.: Drobnoustroje patogenne dla człowieka w mleku zbiorczym. Med. Wet. 2001, **57**(1), 28-29.
- [7] Kołożyn-Krajewska D., Jałosińska-Pieńkowska M.: Prognozowanie mikrobiologiczne jako narzędzie kształtowania bezpieczeństwa żywności. Przem. Spoż., 2003, **2**; 32-34, 48.
- [8] Kunicka A.: Wykorzystanie metody impedymetrycznej w analizie mikrobiologicznej: Laboratoria Aparatura Badania, 2000, **5** (5), 18-21.
- [9] Tyszkiewicz S.: Zasady analizy ryzyka i zasady ostrożności w prawie żywnościowym. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2000, **1** (22), 5-17.
- [10] Zwietering M., de Koos J., Hasenack B., de Wit J., van't Riet K.: Modelling of the bacterial growth curve. Appl. Envir. Biol., 1991, **57**, 1094-1101.

### AN ATTEMPT AT ASSESSING MICROBIAL GROWTH USING IMPEDIMETRY

#### Summary

The development of Microbiological Risk Assessment (MRA) was conditioned by the following factors: application of HACCP system in food industrial plants; fact that consumers prefer fresh and less processed food products, prerequisite to determine the duration of safe storage of various types of food products; changes in the epidemiology of food poisoning and food infections owing to risks resulting from the occurrence of new microorganisms; and lower immunity of more and more people.

Besides the classic plate method of analysing the growth of microorganisms in raw materials and dairy products, a method using the phenomenon of impedance can be applied. Such a determination method involving impedimetry includes the assessment of changes in electrical resistance of a bacterial culture medium, which is generated by the growth of various strains of bacteria or by their specific group.

The objective of this study was to determine the usefulness of a Bactometer M 64 monitoring system for analysing the growth and survival potential of microorganisms in some modified microbiological mediums. In the research, model products were applied. They were manufactured by modifying a 'bioMerieux' medium with lactic acid, sodium chloride, and sodium V nitrate. The experiment was carried out on the *Escherichia coli* 22. Microbiological analyses were conducted using an impedimetric monitoring system. The results obtained (time of detection) could appear useful for predictive microbiology as they could be successfully applied to determine reactions of microorganisms towards changing conditions in food.

**Key words:** predictive microbiology, impedimetric method, microbiological risk assessment. ☒