

MAGDALENA MOLSKA

TERMICZNA INAKTYWACJA PRZETRWAŁNIKÓW *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* W OBECNOŚCI NaCl

Streszczenie

Celem badań było wykonanie analizy procesu inaktywacji termicznej spor bakteryjnych w obecności NaCl, z wyróżnieniem zjawiska aktywacji spor uśpionych i destrukcji spor zaktywowanych.

Badano wpływ różnych stężeń chlorku sodu na ciepłoporność spor bakterii *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 10149). Spory były ogrzewane w roztworach wodnych NaCl o stężeniach 0–6%, w trzech zakresach temperatury (110–121°C).

Na podstawie wykonanych badań stwierdzono, że obecność NaCl w analizowanym środowisku zwiększa wrażliwość spor bakteryjnych na ogrzewanie i istotnie wpływa na proces inaktywacji przetrwałników. Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem stężenia NaCl w środowisku, przy tej samej temperaturze, czas potrzebny do osiągnięcia założonej czystości mikrobiologicznej ulega skróceniu.

Słowa kluczowe: przeżywalność przetrwałników, *Bacillus stearothermophilus*, inaktywacja termiczna.

Wstęp

Utrwalanie żywności stosuje się w celu otrzymania produktów bezpiecznych i stabilnych pod względem mikrobiologicznym. Procesy te realizowane są poprzez inaktywację lub hamowanie wzrostu niepożądanych mikroorganizmów. Znanych jest wiele metod utrwalania produktów spożywczych m.in.: obróbka termiczna, suszenie, chlódzenie czy dodatek chemicznych środków konserwujących.

Jedną z bardziej powszechnych metod utrwalania, stosowanych już od wielu lat w technologii żywności, jest sterylizacja. Uzyskanie jałowego środowiska podczas obróbki termicznej, przy jednocześnie minimalnej jego degradacji, zależy głównie od dawki energii cieplnej, która jest uzależniona od rodzaju, ilości oraz stanu fizjologicznego drobnoustrojów, a w szczególności spor bakteryjnych występujących w danym

środowisku. Wynika to z faktu, że właśnie formy przetrwalne bakterii, szczególnie odporne na działanie wysokiej temperatury, stwarzają największe trudności w uzyskaniu jałowego produktu [1, 4, 11].

W zależności od tego czy przetrwalnik znajduje się w stanie zaktywowanym, uśpionym czy „super uśpionym”, charakteryzuje się różnym poziomem wrażliwości na działanie wysokiej temperatury [6]. Mimo to często spotykany jest opis procesu przebiegu inaktywacji przetrwalników za pomocą modelu klasycznego, uwzględniającego obecność jedynie spor zaktywowanych w populacji przetrwalników, [2, 3, 14, 17]. W rzeczywistości, najnowsze dane doświadczalne rzadko potwierdzają takie uproszczenie, szczególnie w początkowym i końcowym okresie procesu sterylizacji termicznej przetrwalników [5, 7, 8, 18].

Poza istotnym znaczeniem stanu fizjologicznego przetrwalników, ciepłooporność ich w dużym stopniu zależy również od składu chemicznego środowiska, w którym spory są ogrzewane, np.: od różnych poziomów pH środowiska oraz obecności soli mineralnych, tłuszczów, białek czy węglowodanów [9, 11, 12, 16].

Ponieważ NaCl jest bardzo powszechnym dodatkiem do produktów spożywczych, a termofilne spory bakteryjne są często przyczyną pogorszenia jakości lub psucia się żywności, podjęto badania nad połączonym wpływem NaCl i temperatury na przeżywalność spor bakterii *Bacillus stearothermophilus* (jako najbardziej ciepłoopornych form przetrwalnych). Mimo, że wielu badaczy uwzględniło w swych pracach wpływ NaCl na inaktywację drobnoustrojów, to badania te prowadzone były na sporach poddanych procesowi wcześniejszej aktywacji [15, 16]. Zakładano wówczas obecność jedynie spor bakteryjnych w aktywnym stadium fizjologicznym, nie analizując tym samym wpływu soli na przebieg procesu aktywacji przetrwalników uśpionych.

Celem badań było ustalenie ilościowego wpływu NaCl na kinetykę termicznej inaktywacji spor bakterii *Bacillus stearothermophilus*, z wyróżnieniem procesu aktywacji spor uśpionych i destrukcji spor zaktywowanych.

Material i metody badań

W badaniach stosowano szczepy bakterii *Bacillus stearothermophilus* z kolekcji American Type Culture Collection 10149. Przetrwalniki bakteryjne otrzymywano w dwustopniowej procedurze namnażania, opracowanej przez Kima i Naylora [10].

Inaktywacji termicznej poddano roztwór wodny zawierający spory bakteryjne, znajdujące się w różnych stanach fizjologicznych. Badania eksperymentalne realizowano w szklanych kapilarach.

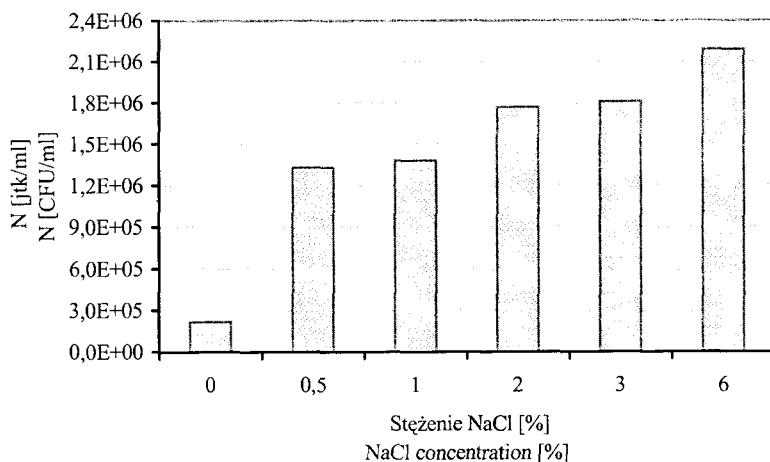
Zawiesinę przetrwalników rozcieńczano do gęstości około $10^6/\text{cm}^3$, po czym poddawano ją szokowi termicznemu (80°C przez 10 min) w celu zniszczenia form wegetatywnych. Tak przygotowaną zawiesinę spor w roztworze wodnym NaCl o stężeniach 0–6% napełniano kapilary, które po zatopieniu ogrzewano do 30 min w łaźni

olejowej, w temp. 110°C i 115°C oraz do 10 min w temp. 121°C. Próbki po wyjęciu z łaźni olejowej natychmiast oziębiano do ok. 20°C. Liczbę przetrwalników bakteryjnych po sterylizacji kontrolowano metodą płytkową [13], wykonując posiewy z odpowiednich rozcieńczeń do podłoża regeneracyjnego [10]. Posiewy inkubowano w temp. 55°C przez 48 godz. Ocenę stopnia przeżycia przetrwalników w danej temperaturze określano po przetrzymaniu w przedziałach czasowych (od 1 min do 30 min), wykonując po 4 do 7 równoległych posiewów z każdej próbki i danego czasu ogrzewania. Wyniki pomiarów podano jako liczbę przetrwalników zdolnych do wzrostu w postaci kolonii (jtk/cm³).

Wyniki i dyskusja

Na podstawie wykonanych badań potwierdzono doniesienia literaturowe [16], że obecność NaCl w analizowanym środowisku wpływa na przebieg krzywej przeżycia spor bakterii *Bacillus stearothermophilus*, zmniejszając ich ciepłooporność, a tym samym skracając czas inaktywacji.

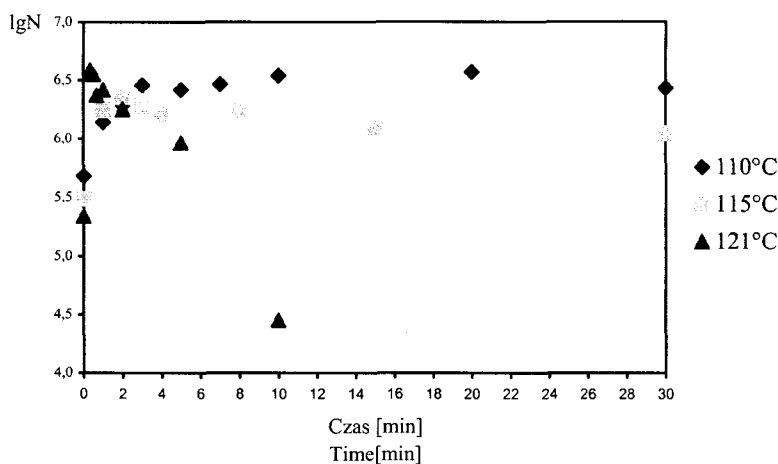
Ponadto zaobserwowano, że dodatek soli nie tylko wpłynął na sam proces inaktywacji spor zaktywowanych, ale również na proces aktywacji spor uśpionych, co w pracach innych badaczy zostało pominięte (analizowano proces inaktywacji spor uprzednio zaktywowanych) [15]. Tak więc na podstawie badań własnych stwierdzono, że już w warunkach pasteryzacji (80°C, 10 min) dodatek NaCl do wodnej zawiesiny spor powodował ich aktywację (rys. 1). Jednakże na tym etapie analizy samo stężenie soli nie miało dużego znaczenia.



Rys. 1. Aktywacja spor bakterii *Bacillus stearothermophilus* w temp. 80°C w zależności od stężenia NaCl.

Fig. 1. Activation of *Bacillus stearothermophilus* spores heated at 80°C, depending on the concentration of NaCl.

Potwierdzono również, że w zawieszynie spor bakteryjnych w wodzie, w miarę przedłużania czasu obróbki cieplnej, stężenie spor zaktywowanych rośnie, co uwidocznione zostało na rys. 2.



Rys. 2. Zmiany ilości żywych spor *Bacillus stearothermophilus* zawieszonych w wodzie, ogrzewanych w temp. 110, 115 i 121°C.

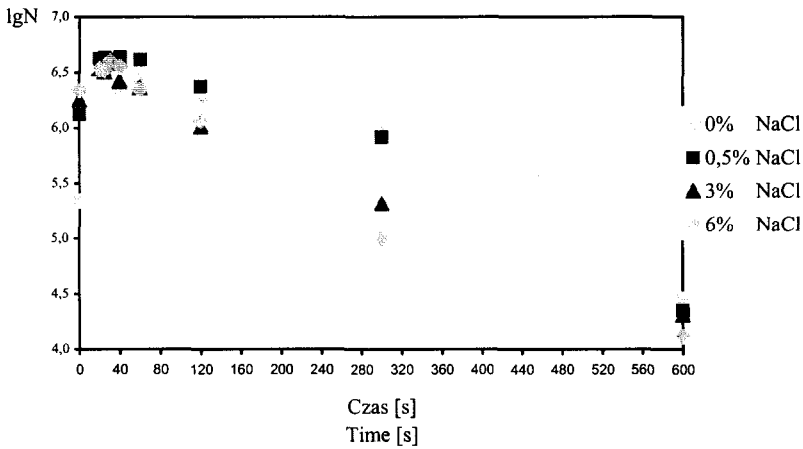
Fig. 2. Changes of the amount of live *Bacillus stearothermophilus* spores suspended in water, heated at 110, 115 i 121°C.

Tłumaczy się to przewagą procesu aktywacji spor uśpionych nad procesem destrukcji spor zaktywowanych w początkowym okresie obróbki cieplnej zawieszyny. Dalsze przedłużenie czasu sterylizacji powodowało spadek stężenia spor uśpionych, w efekcie malała szybkość procesu aktywacji.

W zależności od zastosowanej temperatury sterylizacji, przebieg przeżycia spor zawieszonych w wodzie był inny. W 110°C zarówno proces aktywacji, jak i destrukcji, przebiegał powoli. Natomiast podczas ogrzewania w 115°C maksymalne stężenie spor występowało po 2 min procesu, a w temp. 121°C już po 20 s ogrzewania. Również proces destrukcji wraz ze wzrostem temperatury przebiegał znacznie szybciej.

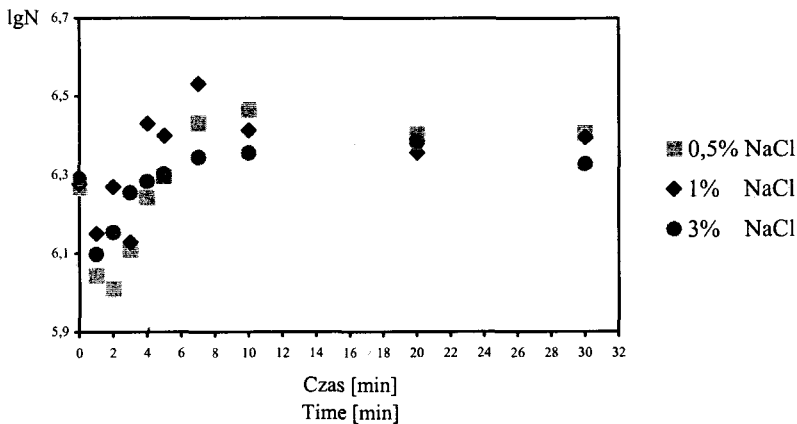
Podobny przebieg miały zmiany w ilości spor przeżywających w obecności soli, w temp. 115 i 121°C. Jednakże dodatek NaCl powodował wyraźniejszy proces aktywacji spor uśpionych i bardziej intensywny proces destrukcji spor zaktywowanych (rys. 3).

Natomiast ogrzewanie zawieszyny spor w obecności NaCl w niskiej temperaturze sterylizacji (110°C) spowodowało zmiany w ilości przeżywających przetrwalników (rys. 4).



Rys. 3. Zmiany ilości spor *Bacillus stearothermophilus* przeżywiających ogrzewanie w temp. 121°C, w obecności różnych stężeń NaCl.

Fig. 3. Changes in the amount of *Bacillus stearothermophilus* spores, heated at 121°C in the presence of NaCl at different concentrations.



Rys. 4. Zmiany ilości żywych spor *Bacillus stearothermophilus* w temp. 110°C, w obecności różnych stężeń NaCl.

Fig. 4. Changes of the amount of live *Bacillus stearothermophilus* spores, heated at 110°C in the presence of NaCl at different concentrations.

W tym przypadku dodatek NaCl w stężeniach od 0,5 do 3% spowodował, że w pierwszym okresie ogrzewania zjawisko destrukcji wystąpiło wcześniej. Przedłużenie czasu ogrzewania spowodowało aktywację spor uśpionych i w efekcie przewagę pro-

cesu aktywacji nad procesem destrukcji. Stężenie spor w zawieszynie rosło, a po osiągnięciu maksymalnej wartości (w tym momencie szybkości procesów aktywacji i destrukcji były takie same) dalsze ogrzewanie powodowało powolny spadek ilości żywych spor, w wyniku przewagi procesu destrukcji nad procesem aktywacji spor.

Dotychczasowe wyniki wskazują na możliwość wyznaczenia, w dalszym etapie badań, współczynników kinetycznych procesu aktywacji i destrukcji termicznej spor bakteryjnych z uwzględnieniem wpływu NaCl.

Umożliwiłyby to wykreślenie krzywych przeżycia wiarygodnie oddających przebieg inaktywacji przetrwalników. Dlatego też, punkty doświadczalne na obecnym etapie badań nie zostały opisane za pomocą krzywych (byłoby to tylko domysłem co do ich faktycznego przebiegu).

Wnioski

1. Przeżycie spor bakterii *Bacillus stearothermophilus* miało przebieg dwufazowy, gdyż można było wyróżnić zarówno zjawisko aktywacji jak i destrukcji przetrwalników.
2. Obecność NaCl w analizowanym środowisku zwiększała wrażliwość spor bakteryjnych na ogrzewanie.
3. W pierwszej fazie procesu sterylizacji, wraz ze wzrostem stężenia NaCl w badanej zawieszynie, stopień uśpienia spor bakteryjnych zmalał, co uwidoczniło się wzrostem stężenia spor zaktywowanych.
4. Działanie aktywujące soli (w zastosowanym zakresie stężeń) zostało zaobserwowane już w temperaturze pasteryzacji.
5. Na przebieg procesu inaktywacji przetrwalników duży wpływ miała także temperatura. Wraz ze wzrostem temperatury czas aktywowania przetrwalników, jak i ich destrukcji, uległ skróceniu.
6. Znajomość przebiegu termicznej inaktywacji przetrwalników umożliwi właściwy dobór warunków sterylizacji mediów w przepływie, procesu stosowanego w licznych technologiach przemysłu spożywczego i farmaceutycznego.

Literatura

- [1] Abdelmadjid A., Foster S.: Bacterial endospores the ultimate survivors. Int. Dairy J., 2002, **12**, 217.
- [2] Blakebrough N.: Biochemical and Biological Engineering Science. Academic Press, London 1968.
- [3] Doran P.: Bioprocess Engineering Principles, Academic Press, London 1995.
- [4] Furukawa S., Hayakawa J.: Investigation of desirable hydrostatic pressure required to sterilize *Bacillus stearothermophilus* IFO 12550 spores and its sterilization properties in glucose, sodium chloride and ethanol solutions. Food Res. Int. 2000, **33**, 901.
- [5] Iciek J.: Sterilization and Pasteurization of Media, In: Thermal Processing of Bio-Materials. Vol. 10 (Kudra T., Strumiłło Cz., eds), Gordon and Breach Sci., Publishers, Amsterdam 1998.

- [6] Iciek J., Cywińska U.: Modele matematyczne destrukcji termicznej przetrwalników. Post. Mikrobiol., 1993, **32** (4), 351.
- [7] Iciek J., Cywińska U., Jaworska A., Libudzisz Z., Nowicki L., Ołtuszek E., Stobińska H., Stolarek P.: Dobór modelu i jego parametrów do opisu procesu aktywacji i destrukcji termicznej przetrwalników. Inż. Chem. i Proc., 1998, **19** (3), 653.
- [8] Jaworska A.: Kinetyka termicznej aktywacji i destrukcji przetrwalników *Bacillus stearothermophilus*, Praca doktorska wykonana w Inst. Chem. Technol. Żywności PŁ, Łódź 1998.
- [9] Khalil H., Villota R.: Food Engineering and Process Application, 1 (M. Le. Maguer, P. Jelen, eds.) Elsevier Appl. Sci. Publishers, London 1986, pp. 583-594.
- [10] Kim J., Naylor H.: Spore production by *Bacillus stearothermophilus*, Appl. Microbiol., 1966, **14**, 690.
- [11] Libudzisz Z., Stobińska H., Ołtuszek E., Iciek J.: Sporogeneza w aspekcie procesów biotechnologicznych. Biotechnologia, 1993, **2** (21), 83.
- [12] López M., González I., Condón S., Bernardo A.: Effect of pH heating medium on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus* spores. Int. J. Food Microbiol., 1996, **28**, 405.
- [13] Mikrobiologia techniczna – pod red. Z. Libudzisz i K. Kowal. Wyd. PŁ, Łódź 2000.
- [14] Müller G.: Podstawy mikrobiologii żywności, WNT, Warszawa 1990.
- [15] Periago P., Fernández P., Ocio M., Martínez A.: A predictive model to describe sensitization of heat-treated *Bacillus stearothermophilus* spores to NaCl. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 1998, **A 206**, 58.
- [16] Periago P., Fernández P., Salmerón M., Martínez A.: Predictive model to describe the combined effect of pH and NaCl on apparent heat resistance of *Bacillus stearothermophilus*. Int. J. Food Microbiol., 1998, **44**, 21.
- [17] Pijanowski E., Dłużewski M., Jarczyk A.: Ogólna technologia żywności, WNT, Warszawa 1996.
- [18] Sapru V., Smerage G., Teixeira A., Lindsay J.: Comparison of predictive models for bacterial spore population resources to sterilization temperatures. J. Food Sci., 1993, **58**, 223.

THERMAL INACTIVATION OF *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS* SPORES IN THE PRESENCE OF NaCl

S u m m a r y

The aim of this study was to analyse thermal inactivation of bacterial spores in the presence of NaCl, with reference to the activation of latent spores and destruction of activated spores.

The effect of different concentrations of sodium chloride on thermal resistance of bacterial spores of *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 10149) was investigated. The spores were heated at different temperatures (110–121°C) in aqueous NaCl solutions at concentrations ranging from 0 to 6%.

On the basis of the experiments it was found that the presence of NaCl in the analysed medium increased the sensibility of bacterial spores to heating and affected significantly the process of spore inactivation.

It was observed that with an increase of NaCl concentration in the medium, at the same temperature, the time required to achieve the desired microbiological purity was shortened.

Key words: survival of spores, *Bacillus stearothermophilus*, thermal inactivation. ☒