

HIGIENA ŻYWNOŚCI ZWIERZĘCEGO POCHODZENIA

STANISŁAW ZALESKI
Szczecin

Subletalne uszkodzenie termiczne komórek wegetatywnych metodami stosowanymi w przemyśle spożywczym

Okres kiedy uważano, że surowce spożywcze mogą być przekazywane do dalszego przetworstwa i obrotu tylko wtedy, gdy są wolne od bakterii chorobotwórczych należy do przeszłości. Od dawna było wiadomym, że warzywa, szczególnie o pędach jadalnych rosnących w ziemi mogą na swej powierzchni być zanieczyszczone bakteriami chorobotwórczymi, przede wszystkim *Clostridium botulinum*. Dalsze badania udowodniły, że tuszki drobiowe oraz jaja są w wysokim procencie zanieczyszczone pałeczkami z grupy *Salmonella*. W mleku i jego przetworach stwierdzany jest gronkowiec enterotoksyczny (48). Mięso zwierząt rzeźnych bardzo łatwo ulega zanieczyszczeniu powierzchniowemu pałeczkami z grupy *Salmonella* i dzięki temu są one wykazywane w Polsce w blisko 10% badanych prób kielbas surowych wędzonych, wędzonek, kielbas parzonych i mięsa mielonego (8). Również ryby nie są wolne od tego problemu i u słodkowodnych stwierdzono praktycznie wszystkie niebezpieczne dla człowieka bakterie (67). Ryby morskie, szczególnie pochodzące z niektórych akwenów są zanieczyszczone takimi bakteriami chorobotwórczymi, jak laseczki jadu kielbasianego (60) oraz *Vibrio parahaemolyticus* (69).

Istniejąca sytuacja powoduje konieczność zmiany dotychczas obowiązujących poglądów. Obecnie panuje już zgodność poglądów, że dominująca ilość przypadków zatruc pokarmowych spowodowana jest błędami technologicznymi. Jeżeli np. w czasie przerobu użyta zostanie zaniżona temperatura obróbki termicznej, do tego dołączy się niewłaściwy proces chłodzenia a cykl błędów zostanie zamknięty zbyt wysoką temperaturą obrotu, to wtedy są stwarzane odpowiednie warunki dla przeżycia i bytowania drobnoustrojów gnilnych i chorobotwórczych. W tej sytuacji za zdrowie konsumenta musi być obciążony producent i dystrybutor. Wśród innych do obowiązków organów urzędowego nadzoru powinna należeć kontrola prawidłowości wdrażanych i stosowanych parametrów technologicznych. Zdaniem bowiem niektórych kierunków przetworstwa właściwego musi być zastosowanie takich parametrów w czasie przerobu, by flora szkodliwa zginęła,

została uszkodzona i zredukowana w zasadniczych ilościach. W czasie przechowywania i podczas obrotu muszą być stworzone jednoznacznie takie warunki, by pozostałe przy życiu komórki nie mogły się w produkcie rozmnożyć i zagrozić zdrowiu człowieka.

Szereg czynników fizyko-chemicznych może być przyczyną uszkodzenia lub śmierci komórek wegetatywnych, względnie najlepiej poznany jest jednak wpływ temperatury na drobnoustroje. Zarówno zastosowanie temperatur subminimalnych dla drobnoustrojów, jak i przekroczenie maksymalnej powodują powstanie określonych zmian w komórce, które omówiono poniżej.

Temperatury subminimalne

Temperatury subminimalne dla drobnoustrojów mezo- i termofilnych leżą jeszcze w zakresie temperatur plusowych, dla psychrofilii są to temperatury ujemne.

Przyjmuje się, że temperatury subminimalne są przyczyną przejścia komórek w stan anabiozy. Słuszność tego poglądu w przypadku zarodników nie budzi wątpliwości, w odniesieniu do komórek wegetatywnych natomiast tak temperatury subminimalne plusowe, jak i minusowe mogą również być przyczyną ich uszkodzenia a także śmierci.

Temperatury subminimalne w zakresie plusowym mogą u szeregu gatunków wywoływać letalny szok. Szybkie chłodzenie 10⁸/ml komórek *Aerobacter aerogenes* i natychmiastowe ogrzanie do 20° nie wywołuje szoku. Przy przetrzymywaniu zawiesiny tej bakterii w zbuforowanym płynie fizjologicznym przez godzinę w temp. 0° procent ginących komórek wzrastał wraz ze zmniejszaniem się jej gęstości. Podczas takiego chłodzenia zawiesiny pojawiają się w środowisku wewnątrzkomórkowe aminokwasy, ATP i kw. nukleinowy, które, poza ATP, po dodaniu do świeżej zawiesiny, niezależnie od jej gęstości działają na nią ochronnie podczas chłodzenia. Podobne właściwości ochronne posiada także wprowadzona do środowiska sacharoza i jony magnezu oraz wapnia (58).

Przy wyjaśnieniu na poziomie molekularnym wpływu niskich temperatur na uwalnianie przez mikroor-

ganizmy wewnątrzkomórkowych roztworów przyjmuje się możliwość istnienia trzech podstawowych mechanizmów, z których każdy mógłby oddziaływać oddzielnie lub w dowolnych kombinacjach z pozostałymi (15):

a) pierwszy z rozważanych związany jest z inaktywacją w niskich temperaturach określonych białek permeaz. Wydaje się jednak, że możliwości działania tego mechanizmu ogranicza wielokrotnie wykazywana zależność między minimalną temperaturą rozmrażania drobnoustrojów a składem chemicznym środowiska,

b) drugim możliwym mechanizmem mógłby być deficyt energii koniecznej do aktywnego transportu roztworów. Deficyt ATP jest przy tym mało prawdopodobny, ponieważ w temperaturach niższych od minimalnych nie ustaje oddychanie drobnoustrojów, choć równocześnie w tych samych warunkach związek ten pojawia się w środowisku otaczającym komórkę. Największe ilości ATP stwierdza się po pół godzinie trzymywania populacji *Aerobacter aerogenes* w temp. 0°. Po tym czasie zanika on do ilości śladowych w wyniku albo resorpcji, adsorpcji albo biodegradacji (59),

c) za najbardziej prawdopodobną przyczynę przyjmuje się występowanie zmian w budowie molekularnej błony cytoplazmatycznej. W temperaturach subminimalnych krzepną lipidy zawarte w biomembranach i wtedy zgodnie z „modelem płynnej mozaiki” drobiny białka pływające w półpłynnej warstwie lipidowej błony cytoplazmatycznej zostają unieruchomione. Do unieruchomionych drobin należą również białka permeaz.

Największa wrażliwość na szok zimny występuje u różnych gatunków bakterii w populacji znajdującej się w fazie wzrostu logarytmicznego. Jest ona silniej wyrażona u komórek wyrosłych na podłożach chemicznie zdefiniowanych. Wymieranie populacji *Pseudomonas* sp. jest tym większe, im prostszy pod względem składu chemicznego był płyn zawieszający (16).

Komórki *E. coli* będące w fazie wzrostu logarytmicznego po przeniesieniu do środowiska o temperaturze nieco niższej od minimalnej przestają się dzielić. Mimo to gęstość optyczna populacji rośnie w wyniku tworzenia się postaci nitkowatych, dochodzących do 300 μ długości. Jest to wynikiem dalej trwającego procesu syntezy DNA, RNA, białka i glikopeptydu. Komórki olbrzymie przeniesione do 30° szybko tworzą przegrody międzykomórkowe, w wyniku czego powstają pojedyncze, krótkie komórki (25, 54).

Temperatury ujemne

Obserwacja u drobnoustrojów zjawisk zachodzących w ujemnych temperaturach subminimalnych i ustalanie przyczyn ich powstawania jest utrudnione. Wynika to z braku możliwości wykonania różnych badań komórki w stanie zamrożonym i konieczności stwierdzania skutków zamrożenia dopiero po rozmrożeniu. Efekt mrożenia i rozmrażania oceniany jest więc łącznie.

Mrozząc i rozmrażając populację drobnoustrojów stwierdzono, że w porównaniu z wyjściową liczbą komórek po rozmnożeniu jest mniejsza. Z powyższego wyprowadzono wniosek, że zabiegi te łącznie powodują śmierć części populacji. Intensywność obumierania komórek zależy od gatunku i postaci drobnoustroju, składu chemicznego środowiska, w którym są one zamrażane a także od szybkości i końcowej temperatury mrożenia i rozmrażania.

Pod względem wrażliwości na temperatury subminimalne minusowe, drobnoustroje można podzielić na 4 grupy:

a) przeżywające rozmaite warunki mrożenia i rozmrażania a do tej grupy zaliczane są przede wszystkim zarodki bakteryjne. Również szereg gatunków wegetatywnych komórek bakteryjnych jest niewrażliwych i zwykle ponad 50%, a często nawet 90% mikrokoków, paciorkowców i gronkowców przeżywa nawet długie okresy przetrzymywania w stanie zamrożonym (4, 32, 66).

b) niewrażliwe na proces zamrażania, wymierające natomiast w czasie przetrzymywania w stanie zamrożonym,

c) wrażliwe na proces zamrażania i wymierające w czasie przetrzymywania w stanie zamrożonym,

d) ginące w czasie mrożenia praktycznie niezależnie od warunków środowiskowych (17).

Do ostatniej grupy należą tylko nieliczne gatunki; w zasadzie wszystkie posiadające znaczenie w przemyśle spożywczym należą do trzech pierwszych grup.

Czynniki chroniące bakterie przed śmiercią mogą być produkowane przez populację, mogą także wynikać ze składu chemicznego środowiska. Podobnie jak w temperaturach subminimalnych plusowych, w trakcie mrożenia gęstej populacji bakterii wydzielają one do środowiska substancje wewnątrzkomórkowe, które działają ochronnie. Określono je mianem „czynników ochronnych”, a ich rola polega na ułatwianiu przejścia komórkom do stanu pełnej sprawności fizjologicznej. Jeżeli populacja jest mniej gęsta, ich stężenie w środowisku jest za niskie dla wywołania tego efektu (16).

Do związanych ze środowiskiem substancji chemicznych działających ochronnie podczas mrożenia i przechowywania zaliczane są związki wysokocząsteczkowe jak koloidy, białka mleka, żelatyna, mieszaniny kompleksowe w postaci wyciągów mięsnych oraz niektóre związki niskocząsteczkowe jak glicerol, sacharoza, glukoza, laktoza a także amidy dwumetylowe kwasów mrówkowego i octowego i amid jednometylowy kwasu octowego.

Wpływ szybkości mrożenia i warunków przechowywania na przeżywanie bakterii jest różny u mezofili i psychrofilii. Najwyższy procent mezofili ginie przy mrożeniu wolnym w temp. do -10° , na psychrofile natomiast bardziej szkodliwy wpływ wywiera mrozenie szybkie i wolne rozmrażanie (17).

Przyczyna bójczego działania zimna wobec drobnoustrojów nie została do dziś jednoznacznie określona. Aktualnie istnieją dwie teorie usiłujące wyjaśnić zjawisko śmierci chłodniczej. Teoria starsza, która nie została jednak odrzucona, przyjmuje jako przyczynę mechaniczne uszkodzenie komórki. Może ono być powodowane przez kryształy lodu, tworzące się podczas mrożenia w środowisku otaczającym komórkę, względnie w jej wnętrzu. Za znaczeniem kryształów zewnątrzkomórkowych przemawiałoby największe wymieranie komórek w końcowych stadiach krystalizacji lodu a bezpośrednio przyczyną śmierci w tym przypadku miałyby być ich miażdżenie. Tworzenie się kryształów wewnątrzkomórkowych obserwowano u szeregu drobnoustrojów i ich działanie letalne sprowadzono do możliwości przebijania elementów morfotycznych, przede wszystkim błony cytoplazmatycznej.

Przeciwny pogląd zakłada, że mechanizm tego zjawiska oparty jest na powstającej różnicy ciśnień osmotycznych między wnętrzem komórki a otaczającym środowiskiem lub naruszeniem szczelności błon komórkowych. Pierwszy z tych mechanizmów jest możliwy dzięki szybkiej krystalizacji wody w środowisku i wytwarzaniu się wskutek tego ciśnienia hy-

pertonicznego w stosunku do panującego w treści komórki. Równocześnie istnieją dowody, że biomembrany komórek mogą zmieniać w czasie mrożenia swoje właściwości i zamrożone a potem rozmrożone komórki *E. coli* ulegają lizie pod wpływem lizozymu i tryptofanu, a więc enzymów nieaktywnych w stosunku do normalnych komórek tej grupy (30).

Teoria śmierci mechanicznej jest do pogodzenia z teorią uszkodzenia na tle osmotycznym. Obecnie przyjmuje się, że przy mrożeniu szybkim główną przyczyną śmierci jest tworzenie się kryształów wewnątrzkomórkowych przy mrożeniu wolnym natomiast decydującą rolę odgrywa odwodnienie komórki lub zagęszczenie roztworów. Czynniki te nie działają od siebie niezależnie i addytywnie a prawdopodobnie efekt końcowy jest skutkiem ich synergizmu.

Ostatnio wykazano, że śmierć pod wpływem mrożenia może być natychmiastowa lub opóźniona do 24 godzin. Śmierć bezpośrednio *E. coli* B/r przy mrożeniu szybkim obejmowała 68% populacji, przy mrożeniu wolnym 23%. Przy przetrzymywaniu w -20° śmierć opóźniona wyniosła odpowiednio 17% i 71%. Ostatnie badania wiążą stan błony cytoplazmatycznej bakterii ze zmianami w DNA komórki. Pod wpływem mrożenia dochodzi do degradacji odpowiedzialnych za jej stan segmentów DNA i stwierdzono pełną korelację między stopniem uszkodzenia komórki a ilością uszkodzonego DNA. Każdy bowiem typ mrożenia powoduje pewną ilość pojedynczych pęknięć przybrzeżnych DNA (single strand breaks = SSB) i przy mrożeniu szybkim stopień fragmentaryzacji jest wysoki (SSB = 8), a przy mrożeniu wolnym niski (SSB = 2,3). W czasie przetrzymywania w temp. -20° C komórki wolno zamrożonych ich SSB wzrasta z 2,3 do 11,8 po upływie 24 godzin, podczas gdy u komórek mrożonych szybko zmiany te są dużo słabiej zaznaczone (3).

W ten sposób wyłania się przypuszczenie, że śmierć bakterii jest związana z degradacją DNA i przebiega pod wpływem mrożenia na poziomie molekularnym. Teoria utraty przez DNA jego funkcjonalnej integralności jest do pogodzenia ze starszymi, przyjmującymi za przyczynę śmierci zamrażalniczej uszkodzenie błony cytoplazmatycznej. Istnienie tych powiązań między DNA a błoną cytoplazmatyczną komórek bakteryjnych zostało dobrze udokumentowane (3).

Effektem mrożenia nie jest tylko albo przeżycie pełnosprawnych komórek drobnoustrojów lub ich śmierć. Część spośród przeżywających jest „metaboliycznie uszkodzona” a przejawia się to zdolnością do tworzenia kolonii tylko na podłożach bogatych, przy braku możliwości rozmnażania na podłożach ubogich (4, 36, 41, 42, 49, 57, 73). Na tych ostatnich podłożach komórki uszkodzone nie są w stanie syntetyzować niektórych podstawowych metabolitów.

Badanie uszkodzenia limitowaniem niektórych aminokwasów w podłożu pozwalają przypuszczać, że albo w wyniku mrożenia i zmian przepuszczalności błon komórkowych stężenia wewnątrzkomórkowe zmniejszają się poniżej poziomu krytycznego lub też, że ściśle określony aminokwas jest konieczny do regeneracji danej komórki. Badania przy użyciu szczepów *E. coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* i *Pseudomonas* sp. wykazały, że do ich regeneracji konieczne były różne aminokwasy (31).

Komórki uszkodzone metaboliycznie mrożeniem nie posiadają zdolności do rozmnażania się na podłożach z dodatkami związków selektywnych (24, 44). Po rozmrożeniu do wnętrza uszkodzonych komórek drożdży mogą wnikać cytyniany i insulina (11), również ściany komórek bakteryjnych stają się bardziej przepuszczalne dla różnych roztworów i nawet jonów tok-

sycznych. W tym ostatnim przypadku przypuszcza się, że w podłożach umożliwiających wzrost komórek uszkodzonych mogą występować związki tworzące chelaty z jonami toksycznymi (5, 37).

U komórek uszkodzonych metaboliycznie w temperaturach subminimalnych obserwuje się także zmiany niektórych podstawowych cech fizjologicznych. U *E. coli* i *Pseudomonas fluorescens* (5) oraz *Aerobacter aerogenes* (49) obserwowano wydłużenie czasu trwania lagfazy. Czas trwania jednej generacji w okresie wzrostu logarytmicznego może być niezmienny, jak w przypadku *E. coli* i *Ps. fluorescens* (5) lub skrócony, jak u *A. aerogenes* (49).

Hodowla gronkowca złocistego w temp. 5° C powoduje sukcesywne zwiększanie jego wrażliwości na chlorek sodowy, zwiększając równocześnie jego zapotrzebowanie na substancje odżywcze (28). Czas i wielokrotność działania temp. -34° na gronkowce wpływa na zdolność do produkowania koagulyzy i hemolizyn. U niektórych szczepów utrata zdolności produkowania koagulyzy występowała po jednorazowym zamrożeniu na 10 do 30 minut; u wszystkich obserwowano to po czterokrotnym zamrożeniu lub przetrzymaniu gronkowca w stanie zamrożonym przez okres miesiąca. Część z tych ostatnich traciła również zdolność produkowania hemolizyn. W wyniku mrożenia część szczepów zmieniała także swoją morfologię i w preparatach obserwowano pojedyncze ziarenkowce lub dwinki o zmienionej barwliwości metodą Grama (34, 35).

Przetrzymywanie gronkowca w temp. -10° C przez 2 tygodnie powoduje podwyższenie jego ciepłoporności, po dalszych 2 tygodniach ciepłoporność opada poniżej występującej u komórek kontrolnych (72).

Badania mrożonej żywności wykazują, że stosowanie nieodpowiednich podłoży jest przyczyną nie wykrywania w niej uszkodzonych metaboliycznie różnych drobnoustrojów, w tym *E. coli* i bakterii kolipodobnych (50, 51). Choć przy badaniach rutynowych aktualnie proponuje się dodawanie do podłoży tryptikazy lub ekstraktu drożdżowego (4, 57, 71), to jednak lepsze wyniki uzyskuje się przy jednogodzinnej preinkubacji próbek w bulionie tryptikazowo-sojowym (70) lub przez homogenizację próbki z tym bulionem. Godzinna preinkubacja tak przygotowanego materiału w temp. 25° a następnie posiew na podłoże stałe lub określenie NPL pozwala przy badaniu niektórych produktów na wykazanie 20-krotnie większej ilości *E. coli* i bakterii kolipodobnych niż innymi metodami (64).

Temperatury wyższe od maksymalnych

Możliwość przeżycia przez drobnoustroje obróbki termicznej sprawia, że część komórek, dla których letalność procesu była zbyt niska jest pełnosprawna fizjologicznie. Inne, które zetknęły się z graniczną ilością ciepła zostają uszkodzone metabolicznie.

Komórki pełnosprawne będą się rozwijały we wszystkich warunkach podobnie jak komórki, które z uderzeniem ciepła nie zetknęły się.

Sposób działania uszkadzającego wysokich temperatur może być obecnie rozpatrywany wielopłaszczyznowo. Charakterystycznymi objawami uszkodzenia komórek roślinnych jest brak ich zdolności do rozmnażania się na podłożach zawierających takie związki selektywne, jak barwniki, substancje powierzchniowo-czynne czy w wyższych stężeniach NaCl.

Nie ulega wątpliwości, że pod wpływem wysokich temperatur zostają zdenaturowane białka wewnątrzkomórkowe. Jednak pogląd przyjmujący to zjawisko za podstawową przyczynę śmierci

termicznej komórki wegetatywnej jest obecnie kwestionowany. Koagulacja białka jest zjawiskiem generalnym, jako przyczynę śmierci dyskutuje się natomiast zmiany subtelniejsze (53). Gdyby poza tym nieodwracalna zmiana struktury białka była czynnikiem decydującym, nie istniałaby możliwość regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie.

Przy odzyskiwaniu komórek uszkodzonych na podłożach umożliwiających powrót do pełnej sprawności fizjologicznej obserwuje się przedłużenie czasu trwania lagfazy. U *Pseudomonas* sp. może ona być przedłużona nawet do 48—72 godzin w warunkach optymalnych. U gronkowca wraz z pogłębianiem się uszkodzenia czas trwania lagfazy przy odzyskiwaniu ulega stalemu wydłużeniu (29). Podane przykłady wyraźnych zmian skłaniają do twierdzenia, że w takich przypadkach nie jest to lagfaza, ale czas regeneracji. Propozycję zastosowania oddzielnego określenia dla zjawiska regeneracji uzasadnia się twierdzeniem, że „jest to okres powrotu drobnoustrojów z ich subletalnego stanu” (20).

Wielokrotnie wykazywaną przyczyną istnienia czasu regeneracji jest uszkodzenie rRNA i mRNA. Stwierdzano je różnymi metodami u gronkowców (2, 19, 56), *Salmonella typhimurium* (62) i *E. coli* (53). W przypadku *S. typhimurium* pod wpływem działania ciepła ulega całkowitemu rozpadowi frakcji 23 rRNA. W tym samym czasie zostaje także całkowicie zniszczona frakcja 30S RNA, a współczynnik sedimentacji frakcji 50S zostaje obniżony do właściwego dla frakcji 47S. W czasie regeneracji komórek uszkodzonych w ich płazmie nagromadzają się cztery rodzaje frakcji rRNA o współczynnikach sedimentacji 16, 17, 23 i 24S. Przy odzyskiwaniu w tych samych warunkach pojawiają się także frakcje 22, 26 i 28S, które są prekursorami frakcji 30S RNA oraz 31 i 48S jako prekursorzy frakcji 50S (62).

Subletalne uszkodzenie termiczne gronkowców powoduje całkowite zniszczenie frakcji 16 i 30S RNA (52, 56) przy równoczesnej zmianie helikoidy frakcji 23S (52).

Powstające pod wpływem wysokich temperatur zmiany w rRNA komórki wegetatywnej nie są jedyne i dlatego nie mogą być traktowane jako wyłączna przyczyna ich uszkodzenia. Obecnie istnieją podstawy do sądzenia, że uszkodzeniu ulega również RNA komórki, które wykazano u gronkowca złocistego (2, 26), *Aeromonas aerogenes* (61) i *Streptococcus faecalis* (6). W przypadku ostatniej z wymienionych bakterii redukcja ilości RNA nie była jednak wprost proporcjonalna do procentu komórek przeżywających (6).

Także ściana komórkowa jest miejscem wrażliwym, ale u *E. coli* nie reaguje ona uszkodzeniem w zakresie temperatur między 50° a 60°. Działanie temperatury między 75° a 100° zmienia jej wrażliwość na enzymy proteolityczne. U gronkowców uszkodzana jest błona cytoplazmatyczna i także staje się ona przepuszczalna dla substancji wewnątrzkomórkowych, w tym również DNA. U psychrofilnej bakterii *Vibrio marinus* uszkodzenie termiczne obserwowane jest już po ogrzaniu w temperaturze wyższej od 20°. W otaczającym środowisku pojawia się szereg związków wewnątrzkomórkowych, w tym białka, DNA, RNA i aminokwasy (18).

Istnieją także przypuszczenia, że za uszkodzenia termiczne komórek wegetatywnych niektórych gatunków bakterii odpowiedzialna jest wrażliwość termiczna DNA. Uzyskiwane jednak do tej pory wyniki nie udowadniają powyższego jednoznacznie.

W stanie uszkodzenia termicznego zaobserwowano również u *Staph. aureus* zmianę aktywności niektórych enzymów. Głównie tyczy to enzymów biorących udział w cyklu kwasów trójkarboksylowych. Osłabieniu ulega aktywność dehydrogenazy butandiolowej i mlekowej, hydratazy fumarowej, aldolazy fruktozodwufosforowej oraz oksydazy NADP (7, 63). Synteza koagulazy nie jest naruszana i obserwuje się pojawienie tego związku nawet w podłożach, które uniemożliwiają rozmnażanie się gronkowców uszkodzonych termicznie (46).

Nie ulega również zmianie ilość produkowanej przez szczep *S. aureus* S6 enterotoksyny B (10), wyraźnie natomiast zmienia się wrażliwość na chlorek sodowy. Niezależnie od pH przy 4,0% NaCl w podłożu lub więcej, ilość odzyskiwanych uszkodzonych gronkowców jest dużo niższa od otrzymanywanej na podłożach o mniejszej zawartości NaCl (55).

Pod wpływem subletalnego szoku termicznego *Str. faecium* u komórek nieuszkodzonych zaobserwowano zwiększenie procentowej zawartości nasyconych kw. tłuszczowych. Przypuszcza się, że wynikająca z tego zmiana budowy chemicznej błony cytoplazmatycznej była przyczyną stwierdzonego u tego gatunku wzrostu ciepłoporności i zmniejszenia wrażliwości na NaCl (14).

Wysokie temperatury mogą również wywoływać uszkodzenia metaboliczne u drożdży. Spośród 10 badanych gatunków u 9 pojawiła się bardzo duża wrażliwość na niskie pH, wyrażająca się wydatnym zawężeniem zakresu umożliwiającego rozmnażanie (45).

Z powyższego przeglądu wynika więc, że działanie wysokiej temperatury na komórki wegetatywne różnych gatunków drobnoustrojów jest wielokierunkowe. Dokonane obserwacje pozwalają przypuszczać, że wprowadzenie unitarnej hipotezy przyczyn uszkodzenia technicznego wszystkich komórek wegetatywnych wydaje się być niemożliwe.

Odzyskiwanie drobnoustrojów uszkodzonych jest tylko możliwe po uprzedniej restytucji komórki. Rozpoczyna się ona od resyntezy i rekoncentracji związków, które wydostały się poza obręb komórki, a potem dopiero ma miejsce resynteza i regeneracja RNA, w tym rRNA. Zregenerowaniu i uszczelnieniu podlega również ściana komórkowa (27).

Możliwość odzyskania maksymalnej liczby komórek uszkodzonych istnieje tylko na podłożach optymalnych. Regeneracja trwa kilka godzin i potem są one zdolne do wzrostu również na podłożach minimalnych.

Str. faecalis znajduje optymalne warunki do rozwoju w bulionie tryptikazowo-sojowym (9). Uszkodzony *S. aureus* jest bardzo wrażliwy na chlorek sodowy, jeżeli jednak w środowisku znajdują się dostępne dla bakterii substancje odżywcze w postaci np. glukozy, mieszaniny aminokwasów i fosforan, wtedy może dojść do regeneracji nawet bez rozmnażania się. Polega na resyntezie RNA i wtedy wywołana temperaturą wrażliwość na NaCl jest tracona (27). Przy odzyskiwaniu tej bakterii wskazuje się na istotną rolę pH podłoża, które dla uszkodzonych komórek leży przy 6,0 (1).

Uszkodzona *S. typhimurium* ginie w podłożu SF i w bulionach zawierających tetratonat (12). Jest ona również niezdolna do rozwoju na podłożu Lewina. Na agarze tryptikazowo-sojowym rozwija się natomiast dobrze wtedy, gdy doda

się 0,25% cytrynianu sodowego. Jej regeneracja jest także wynikiem resyntezy RNA oraz syntezy adenozyiny i nowego białka (61). Stwierdzono przy tym, że węgiel wprowadzany do podłoża w postaci glukozy nie jest wbudowany w skład powstających białek (47).

Uszkodzeniu termicznemu może ulec bardzo wysoki procent populacji, który w przypadku *E. coli* i bakterii kolipodobnych przekracza 99%. Nie rosną one wtedy na podłożu VRBA, z zielenią brylantową i dezoksychohanem (39).

Ponieważ bakterie uszkodzone zachowują się jak mutanty, a ich zmienność nie posiada charakteru auksotroficznego (38) istnieje podstawa do twierdzenia, że stres wywołuje określone zmiany w układzie genetycznym komórki, a zmienione zapotrzebowanie pokarmowe jest zjawiskiem wtórnym. Za takim poglądem przemawia obserwacja o nabywaniu przez te bakterie podobnych cech niezależnie od tego, czy stres został wywołany wysoką temperaturą, niską temperaturą, podwyższonym stężeniem NaCl czy też naświetlaniem promieniami jonizującymi, a także możliwość utrzymywania się uszkodzenia przez szereg generacji (40).

Uszkodzenie termiczne komórek wegetatywnych posiada duże znaczenie w przemyśle spożywczym, a szczególnie wyraźnie rola uszkodzonych bakterii psychrofilnych uwypukla się w przemyśle mleczarskim (21, 22, 23, 33). Zdarza się, że bezpośrednio po pasteryzacji nie stwierdza się obecności bakterii psychrofilnych w mleku, a dopiero później ujawnia się ich szkodliwe działanie. Przyczyną nieprawidłowej oceny mleka bezpośrednio po pasteryzacji jest badanie skutków obróbki termicznej przez posiew bezpośredni na agar tryptikazowo-sojowy. Na tym podłożu bakterie uszkodzone nie znajdują wystarczająco korzystnych warunków do rozwoju i nie ujawniają swej obecności w czasie 48—72 godzin hodowli. Na tym samym podłożu w postaci płynnej wzrost występuje po 72 godzinnej hodowli w temp. 20° (13).

Jak wynika z powyższego przeglądu tak w temperaturach subminusowych, jak też hypermaksymalnych drobnoustroje zmieniają swoje cechy. Obserwowane zmiany morfologiczne i biochemiczne powodują, że podczas badania żywności nieprawidłowymi metodami ich obecność nie zostaje wykazana. Efektem tego są straty ekonomiczne oraz zachorowania konsumentów.

Aspekt ekonomiczny zagadnienia wiąże się integralnie z problemem trwałości surowców, półproduktów i produktu gotowego. Produkt zamrożony po rozmrożeniu lub poddany pasteryzacji zawiera komórki uszkodzone i nieuszkodzone. Jeżeli badaniami mikrobiologicznymi objęte zostaną tylko nieuszkodzone, uzyskany obraz stanu faktycznego będzie fałszywy, a wydana ocena błędna. Regeneracja komórek uszkodzonych, która odbywa się także w produkcie spożywczym i ich aktywne włączenie się do procesu psucia przyspiesza go wydatnie. Zostaje przez to skrócony czas przeznaczony

dla obrotu i żywność trafia do rąk konsumenta w stanie budzącym poważne wątpliwości, a czasem jest zwracana producentowi jako zepsuta.

Problemem tym pod kątem widzenia zdrowia ludzkiego zajęło się ostatnio FAO, ogłaszając raport w sprawie sposobu ustalania standardów mikrobiologicznych w żywności (65). Szeroki jego skrót został ostatnio ogłoszony w Polsce (68). Wynika z niego, że tylko właściwe wstawienie wymagań mikrobiologicznych w czasie produkcji oraz ich kontrolowanie przy użyciu właściwych metod może ochronić konsumenta przed zachorowaniem.

Stwierdzone właściwości biologiczne drobnoustrojów zmuszają do podjęcia określonych działań. Stosowanie parametrów technologicznych przerobu żywności nie może nadal być oparte tylko na cechach smakowitości i gotowości kulinarnych produktu bez uwzględniania zagadnień mikrobiologicznych. Stosowane dodatki do żywności, a szczególnie obróbka termiczna są to zabiegi, które w określony sposób modelują środowisko i wpływają na biologię drobnoustrojów. Zostają wytworzone nowe warunki ekologiczne, w których możliwość wykonywania funkcji życiowych jest inna niż wykazywana w badaniach klasycznych.

Wąskie ramy opracowania nie pozwalają na omówienie innych niż temperatura czynników mających wpływ na drobnoustroje występujące w żywności. Biorąc jednak pod uwagę oddziaływanie tak ogólnie znanych, jak skład chemiczny otaczającego środowiska gazowego, a_w produktu, jego pH, redox, stężenia chlorku sodowego i innych dodatków oraz antagonizm międzydrobnoustrojowy można stwierdzić, że:

1. problemy ekonomiki produkcji przemysłu spożywczego oraz ochrony zdrowia konsumenta stwarzają konieczność włączenia postulatów mikrobiologii żywności do nauki o żywności oraz ich praktycznego stosowania w przemyśle spożywczym,

2. stosowanie podwyższonych temperatur podczas obróbki termicznej żywności przy nadawaniu jej gotowości kulinarnej jest w każdym przypadku zabiegiem pasteryzacyjnym. Z powyższego wynika konieczność wprowadzenia parametrów, których poziom wyznaczony na podstawie badań teoretycznych spowoduje żądany skutek bakteriobójczy,

3. kontrola mikrobiologiczna surowców, przerobu i gotowego produktu spożywczego musi być prowadzona przy użyciu nowoczesnych i właściwych metod, które powinno się wprowadzać w formie obowiązujących aktów prawnych,

4. odmienność cech morfologicznych i biochemicznych drobnoustrojów w przerobionej żywności stanowi podstawę do postulowania intensywnego rozwoju badań nad ich biologią w nowych warunkach ekologicznych.

Piśmiennictwo

1. Allwood M. C., Russell A. D.: *Canad. J. Microbiol.* 12, 1295, 1966.
2. Allwood M. C., Russell A. D.: *J. Bacteriol.* 95, 345, 1968.

3. Alur M. D., Morales G., Grecz N.: IRCS 2, 1551, 1974.
4. Arpai J.: Biologia (Bratisl.) 16, 31, 1961.
5. Arpai J.: Folia Microbiol. 8, 18, 1963.
6. Beauchat L. R., Lechowich R. V.: Appl. Microbiol. 16, 772, 1968.
7. Bluhm L., Ordal Z. J.: J. Bacteriol. 97, 140, 1969.
8. Buczowski Z., Strzelecki E., Pietkiewicz K., Cader-Strzelecka B.: Przegl. Epidemiol. 24, 293, 1970.
9. Clark C. W., Witter L. D., Ordal Z. J.: Appl. Microbiol. 16, 1764, 1969.
10. Collins-Thompson D. L., Hurst A., Kruse H.: Canad. J. Microbiol. 19, 1463, 1973.
11. Conway E. J., Duggan F.: Biochem. J. 69, 265, 1958.
12. Corry J. E. L., Kitchell A. G., Roberts T. A.: J. appl. Bacteriol. 32, 415, 1969.
13. Dabbah R., Moats W. A., Mattick J. F.: J. Dairy Sci. 52, 608, 1969.
14. Dütschauer C. L., Jordan D. C.: J. Milk Food Technol. 37, 382, 1974.
15. Farrell J., Rose A. H.: Ann. Rev. Microbiol. 21, 101, 1967.
16. Gorrill R. H., McNeil E. M.: J. gen. Microbiol. 22, 437, 1960.
17. Hagen P. O.: Inhib. Destruct. Microbial Cell 39—76, 1971.
18. Haight R. D., Morita R. Y.: J. Bacteriol. 92, 1388, 1968.
19. Haight R. O., Ordal Z. J.: Canad. J. Microbiol. 15, 15, 1969.
20. Harris N. D.: J. appl. Bacteriol. 26, 387, 1963.
21. Heather C. D., Vanderzant C.: Food Res. 22, 164, 1957.
22. Heather C. D., Vanderzant C.: J. Dairy Sci. 40, 1079, 1957.
23. Heather C. D., Vanderzant C.: Food Res. 23, 126, 1958.
24. Hobbs G., Roberts T. A., Walker P. D.: J. appl. Bacteriol. 28, 147, 1965.
25. Hoffmann B.: Arch. Mikrobiol. 58, 302, 1967.
26. Hurley W. C., Gardner F. A., Vanderzant C.: J. Food Sci. 28, 47, 1963.
27. Iandolo J. I., Ordal Z. J.: J. Bacteriol. 91, 134, 1966.
28. Jackson H.: J. appl. Bacteriol. 37, 59, 1974.
29. Jackson H., Woodbine M.: J. appl. Bacteriol. 26, 152, 1963.
30. Kohn A.: J. Bacteriol. 79, 697, 1960.
31. Kuo S. C., MacLeod R. A.: J. Bacteriol. 93, 651, 1969.
32. Larkin E. P., Litsky W., Fuller J. E.: Appl. Microbiol. 3, 102, 1953.
33. Lawton W. C., Nelson F. E.: J. Dairy Sci. 38, 380, 1955.
34. Lukasova J.: Acta vet. (Brno), 39, 35, 1970.
35. Lukasova J.: Acta vet. (Brno) 39, 41, 1970.
36. Łojkiewicz Ł.: Praca doktorska. Akademia Rolnicza Szczecin 1970.
37. MacLeod R. A., Kuo S. C., Gelinas R.: J. Bacteriol. 93, 961, 1967.
38. MacLeod R. A., Smith L. D. H., Gelanis R.: Canad. J. Microbiol. 12, 61, 1966.
39. Marcy R. B.: J. Milk Food Technol. 33, 445, 1970.
40. Marcy R. B.: J. Milk Food Technol. 36, 414, 1973.
41. Moss C. W., Speck M. L.: Appl. Microbiol. 11, 326, 1963.
42. Moss C. W., Speck M. L.: J. Bacteriol. 91, 1103, 1966.
43. Mukherjee P., Bhattacharjee S. B.: J. gen. Microbiol. 60, 233, 1970.
44. Nakamura M., Dawson D. A.: Appl. Microbiol. 10, 40, 1962.
45. Nelson F. E.: Appl. Microbiol. 24, 236, 1972.
46. Pariza M. W., Iandolo J. J.: Appl. Microbiol. 17, 836, 1969.
47. Pierson M. D., Tomlins R. J., Ordal Z. J.: J. Bacteriol. 105, 1234, 1971.
48. Płiszka A.: Gronkowcowe zatrucia pokarmowe. PZWL 1973.
49. Postgate J. R., Hunter J. R.: J. appl. Bacteriol. 26, 405, 1963.
50. Ray B., Speck M. L.: Appl. Microbiol. 24, 258, 1972.
51. Ray B., Speck M. L.: Appl. Microbiol. 25, 499, 1973.
52. Rosenthal L. J., Iandolo J. J.: J. Bacteriol. 103, 833, 1970.
53. Russell A. D., Harries D.: Appl. Microbiol. 16, 1394, 1968.
54. Shaw M. K.: J. Bacteriol. 95, 221, 1968.
55. Smolka L. R., Nelson F. E., Kelley L. M.: Appl. Microbiol. 27, 443, 1974.
56. Sogin S. J., Ordal Z. J.: J. Bacteriol. 94, 1082, 1967.
57. Straka R. P., Stokes J. L.: J. Bacteriol. 78, 181, 1959.
58. Strange R. E., Dark F. A.: J. gen. Microbiol. 29, 719, 1962.
59. Strange R. E., Ness A. G.: Nature (Lond.) 197, 819, 1963.
60. Tchórzewska-Jóźwiak A.: Praca magisterska. Akademia Rolnicza Szczecin 1976.
61. Tomlins R. I., Ordal Z. J.: J. Bacteriol. 105, 512, 1971.
62. Tomlins R. I., Ordal Z. J.: J. Bacteriol. 107, 134, 1971.
63. Tomlins R. I., Pierson M. D., Ordal Z. J.: Canad. J. Microbiol. 17, 750, 1971.
64. Warseck M., Ray B., Speck M. L.: Appl. Microbiol. 26, 919, 1973.
65. Wld Hlth Org.-techn. Rep. Ser. Nr. 543. 1974.
66. Yurchenko J. A., Piepoli C. R., Yurchenko M. C.: Appl. Microbiol. 2, 53, 1954.
67. Zaleski S.: Medycyna Wet. 30, 579, 1974.
68. Zaleski S.: Przemysł Spoż. 30, 283, 1976.
69. Zaleski S., Daczowska E.: Postępy Mikrobiol. 14, 77, 1975.
70. Zaleski S., Fik A.: Medycyna Wet. 31, 631, 1975.
71. Zaleski S., Fik A.: Medycyna Wet. 32, 176, 1976.
72. Zaleski S., Sobolewska K., Jakubowska L.: 2nd Intern. Congr. Food Sci. Technol. Warszawa 1966, 381.
73. Zmysłowska I.: Praca doktorska. Akademia Rolnicza Szczecin 1970.

Adres autora: prof. dr Stanisław Zaleski, ul. Kazimierza Królewicza 65/7, 71-551 Szczecin.

PROFILAKTYKA I HIGIENA PRODUKCJI ZWIERZĘCEJ

MAREK SOKOŁOWSKI, GRAŻYNA JURKIEWICZ

Skazenie aflatoksyną B₁ sruł arachidowych i mieszanek paszowych

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Warszawie

Z chwilą ustalenia przyczyny tzw. Turkey Disease X (14), która w 1960 r. w Anglii spowodowała masowe upadki indyków w wyniku zatrucia aflatoksynami, rozpoczęto na szeroką skalę badania nad pozostałością mikotoksyn w paszach i komponentach paszowych oraz środkach spożywczych roślinnego i zwierzęcego pochodzenia (1, 3, 4, 5). Zatrucie aflatoksynami powoduje ostrą hepatoksykozę wielu gatunków zwierząt (2, 10, 13, 15). Wg Eddsa (5) dawka DL₅₀ per os aflatoksyny B₁ dla wybranych gatunków zwierząt wynosi: kaczęta 0,4—0,6 mg/kg dawka podawana przez 5 dni: królik 0,3 mg/kg; warchlak 0,62 mg/kg; szczur 5,5—7,2 mg/kg; owca 2,0 mg/kg. Najbardziej wrażliwym na działanie aflatoksyn jest pstrąg. Podawanie aflatoksyny B₁ w jednorazowej dawce 4μg/kg, wywołuje u pstrąga powstanie guzowatych

przerostów wątroby i dróg żółciowych z formowaniem się cyst (5).

Edds podaje, że dawka 3,0 mg/kg aflatoksyny B₁ u szczura powoduje zahamowanie syntezy kwasów nukleinowych, dając zmiany strukturalne neukleotydów zauważalne już w 30 min. od chwili podania.

Wg danych piśmiennictwa (4, 5) największe ilości aflatoksyny B₁ stwierdzono w orzeszkach ziemnych, leszczynowych, spleśniałym chlebie, serze, twarogach, śmietanie, majonezie, ryżu, sorgo. Udowodniono, że u bydła żywnego paszą skażoną aflatoksyną B₁ w liściach 0,6—0,9 mg w dawce jednorazowej, mikotoksyna pojawia się w mleku po 3—5 dniach po podaniu i wydala się z nim 10 dni od momentu zaprzestania skarmiania (3).

Największe ilości aflatoksyny B₁ stwierdzono