

JAN URADZINSKI

Wpływ ogrzewania subletalnego na dynamikę rozwoju oraz czas trwania jednej generacji *Escherichia coli*

Z Katedry Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Weterynaryjnego AR-T w Olsztynie

Zakres temperatur, w których drobnoustroje mogą się rozwijać, waha się w granicach od kilku stopni poniżej 0 do około 90°C, nigdy jednak nie osiąga 100°C (8). Oprócz temperatur, w których możliwy jest rozwój mikroorganizmów, wyróżnia się temperatury ich przeżywalności. Wykraczają one poza minimum i maksimum wzrostu. Dla populacji bakteryjnej temperatura minimalna w zasadzie nie ma granicy, której przekroczenie spowodowałoby zabicie wszystkich komórek (2).

Odmienne natomiast przedstawia się reakcja drobnoustrojów na działanie temperatur wysokich. Drobnoustroje znajdujące się w formie wegetatywnej wykazują niezbyt dużą oporność na ogrzewanie. Zjawisko to zostało powszechnie wykorzystane w praktyce w przemyśle spożywczym, fermentacyjnym, w pracowniach mikrobiologicznych, w lecznictwie itp. W przemyśle spożywczym jedną z podstawowych metod konserwowania żywności jest stosowanie wysokich temperatur. Jeżeli jednak w poszczególnych urządzeniach do obróbki termicznej żywności temperatury nie przekroczą wymaganego poziomu do zabicia wszystkich drobnoustrojów, część z nich przeżyje. Drobnoustroje te w sprzyjających warunkach mogą aktywnie włączyć się do procesów psucia, przez co w zasadniczy sposób skracają okres trwałości produktu, a jednocześnie mogą zagrażać zdrowiu konsumentów.

Jak wynika ze statystyk, w większości krajów mimo poprawy ogólnych warunków higienicznych, liczba bakteryjnych zatruc pokarmowych nie zmniejsza się, a przeciwnie wzrasta z roku na rok (4, 7). Można przy tym stwierdzić, że pewna liczba przypadków zatruc pokarmowych spowodowana jest błędami technologicznymi, wynikającymi z nieprawidłowej obróbki termicznej żywności.

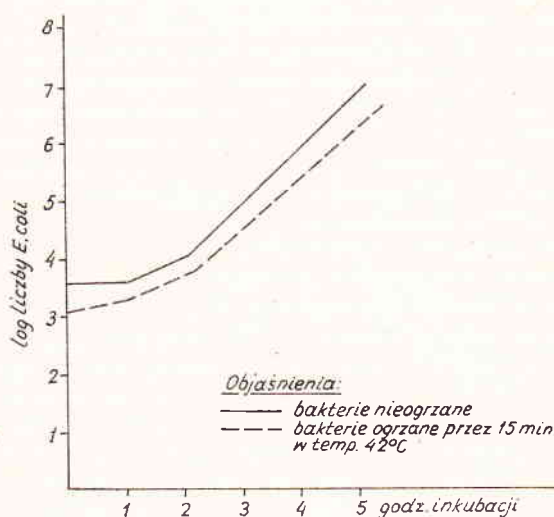
Mając na uwadze wagę przedstawionych problemów oraz stosunkowo małą ilość informacji dotyczących funkcji życiowych bakterii uszkodzonych termicznie podjęto badania własne, których celem było określenie wpływu ogrzewania subletalnego na dynamikę rozwoju oraz czas trwania jednej generacji *Escherichia coli*.

Materiał i metody

Przedmiotem badań była *Escherichia coli* (nr kolekcji 224), otrzymana w postaci zliofilizowanej z Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie. W badaniach zastosowano hodowlę szczepu w bulionie odżywczym o pH 7,4 ± 0,1. Po ożywieniu liofilizatu przesiewano szczep do bulionu i po 24 godz. inkuba-

cji w temperaturze 37°C uzyskiwano hodowlę wyjściową do prowadzonych badań. Następnie do 6 probówek, zawierających bulion ogrzany uprzednio do temperatury 37°C, wprowadzono po 1 ml wstępnie ustalonej przy pomocy skali Mc Farlanda wyjściowej hodowli bakteryjnej, wcześniej rozcieńczonej płynem Ringera do 10⁻⁵. Zawartość poszczególnych probówek dokładnie mieszano i 5 z nich natychmiast wstawiano do termostatu celem inkubacji. Zawartość szóstej probówki poddawano kolejnym 10-krotnym rozcieńczeniom w płynie Ringera. Z poszczególnych rozcieńczeń wykonano posiewy na 3 płytki z agarom zwykłym i inkubowano je w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Po tym czasie liczone wyrosłe na agarze kolonie, podając wynik w odniesieniu do 1 ml bulionu. Używając kolejno następnych 5 probówek z zakażonym bulionem inkubowanym w termostacie, wykonywano analogiczne oznaczenia po 1, 2, 3, 4 i 5 godzinach inkubacji. Podobnie postępowano z populacją bakteryjną wcześniej ogrzaną przez 15 minut w temperaturach: 42, 46, 50 i 52°C. W identyczny sposób wykonano dziewięć dalszych serii badań z każdą temperaturą ogrzewania.

Na podstawie otrzymanych wyników określano dynamikę rozwoju, a następnie czas trwania jednej generacji *Escherichia coli* w fazie logarytmicznego wzrostu, stosując formułę zaproponowaną przez Buchananą i Fulmera (cyt. 12).

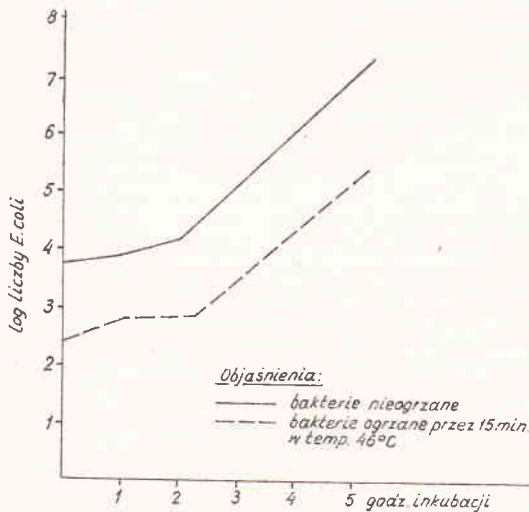


Ryc. 1. Zmiana liczby komórek *Escherichia coli* podczas inkubacji w bulionie o temperaturze 37°C

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki przedstawiono w postaci rycin 1—3 oraz tab. 1. Przebieg rozwoju hodowli bulionowej *Escherichia coli* nieogranej oraz ogrzanej w różnych temperaturach obrazują wykresy (ryc. 1, 2 i 3). W bulionie odżyw-

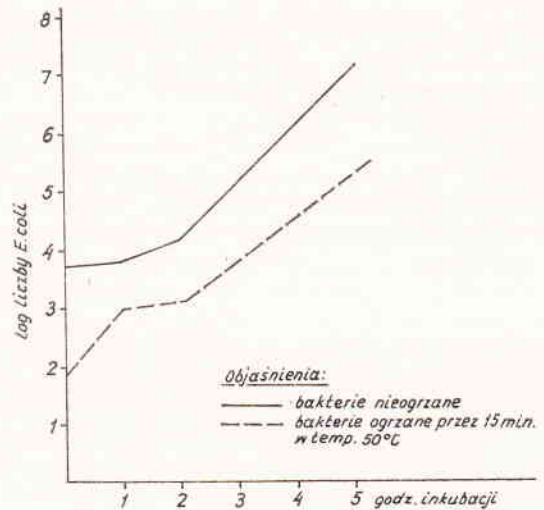
czym faza przygotowawcza nieogranych komórek bakteryjnych trwała około 1 godziny. Odmiennie natomiast kształtowała się dynamika rozwoju bakterii, które były wcześniej ogrzane. Nie obserwowano wyraźnej fazy przygotowawczej, a przeciwnie, w ciągu pierwszej godziny inkubacji tempo rozwoju bakterii było wyższe w porównaniu z nieogrzaną kontrolą i rosło wraz z podnoszeniem temperatury ogrzewania (ryc. 1—3).



Ryc. 2. Zmiana liczby komórek *Escherichia coli* podczas inkubacji w bulionie o temperaturze 37°C

Podczas wzrostu nieogranych komórek *Escherichia coli* w bulionie o temperaturze 37°C, przy początkowym *inoculum*, wynoszącym $2,07$ do $5,77 \times 10^3$ komórek w 1 ml, czas trwania jednej generacji w fazie logarytmicznego wzrostu dla siedemdziesięciu badań wyniósł średnio 20,01 min. Wartość ta zbliżona jest do cytowanych w literaturze (5). Po ogrzaniu bakterii w różnych temperaturach stwierdzono różnice, wyrażające się wydłużeniem czasu trwania jednej generacji w fazie logarytmicznego wzrostu. Wartości te zestawiono w tab. 1. Jak wynika z otrzymanych danych czas trwania jednej generacji *Escherichia coli* ogrzanej w temperaturze 42°C uległ wydłużeniu o 0,66 min., co jednak w porównaniu z nieogrzaną kontrolą nie stanowi istotnej różnicy (tab. 1). Ogrzanie komórek *Escherichia coli* w wyższych temperaturach wpłynęło w istotny sposób na wydłużenie czasu jednej generacji, który w porównaniu z nie-

ogranymi kontrolami wydłużał się odpowiednio o: 46°C — 3,79 min., 50°C — 5,90 min. Ogrzanie w temperaturze 52°C spowodowało śmierć wszystkich bakterii przy ich początkowym *inoculum*, wynoszącym średnio $3,64 \times 10^3$ komórek w 1 ml bulionu, co uniemożliwiło prowadzenie dalszych badań.



Ryc. 3. Zmiana liczby komórek *Escherichia coli* podczas inkubacji w bulionie o temperaturze 37°C

Fazowość wzrostu populacji bakteryjnych obserwowana jest również w żywieniu. Z punktu widzenia trwałości oraz przydatności spożywczej mięsa i jego przetworów najważniejszą rolę odgrywa kształtowanie się analizowanych w niniejszej pracy faz: przygotowawczej do wzrostu oraz logarytmicznego wzrostu. Wielu autorów (9) uważa, że w celu przedłużenia świeżości mięsa nie jest konieczne zabicie wszystkich znajdujących się w nim drobnoustrojów, a jedynie wystarczy zahamować ich wzrost. Często komórki bakteryjne poddane ogrzaniu w temperaturach subletalnych, działaniu subletalnych dawek promieniowania lub działaniu niektórych środków chemicznych ulegają uszkodzeniom metabolicznym, co zdaniem wym. autorów ma być wystarczające do przedłużenia świeżości mięsa. Wynika to z utrzymania niskiego stopnia zakażenia bakteryjnego poprzez przedłużenie fazy przygotowawczej lub przedłużenie czasu jednej generacji.

Nie zawsze jednak obserwuje się wydłużenie fazy przygotowawczej oraz wydłużenie czasu

Tab. 1. Wpływ ogrzewania na czas trwania jednej generacji *Escherichia coli*

	Czas jednej generacji w minutach		Różnica w min.	Czas jednej generacji w minutach		Różnica w min.	Czas jednej generacji w minutach		Różnica w min.
	przed ogrzaniem	po ogrzaniu w temp. 42°C		przed ogrzaniem	po ogrzaniu w temp. 46°C		przed ogrzaniem	po ogrzaniu w temp. 50°C	
\bar{x}	21,60	22,26	0,66	19,25	23,05	3,79*	19,26	25,16	5,90*
s	1,02	1,80	1,27	2,25	2,01	1,86	1,83	1,58	1,74
v	4,72	8,07	193,70	11,69	8,73	49,10	9,53	6,28	29,54

jednej generacji bakterii uszkodzonych termicznie. Jackson i Woodbine (3) w badaniach wykonanych na subletalnie uszkodzonych komórkach *Staphylococcus aureus* nie stwierdzili w porównaniu z nieogrzanyymi bakteriami wydłużenia fazy przygotowawczej. Również w badaniach własnych, przeprowadzonych na ogrzanych w różnych temperaturach komórkach *Escherichia coli*, nie stwierdzono wydłużenia fazy przygotowawczej, a przeciwnie obserwowano w ciągu pierwszej godziny inkubacji wyższe tempo rozwoju komórek bakteryjnych.

Niektórzy autorzy podają, że faza logarytmicznego wzrostu bakterii jest początkiem procesu gnilnego mięsa (10). W okresie tym drobnoustroje ulegają intensywnym podziałom, a szybkość ich wzrostu ilościowego, zwiększającego się w postępie logarytmicznym, determinowana jest czasem jednej generacji. Jest on różny u poszczególnych gatunków i wynosi przykładowo w optymalnych warunkach rozwoju bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* około 20 min., z rodziny *Lactobacillaceae* 40—80 min., a z rodziny *Bacillaceae* 35—50 min. (10).

W badaniach własnych, przeprowadzonych na komórkach *Escherichia coli*, poddanych ogrzaniu wykazano, że wraz ze wzrostem temperatury ogrzewania czas trwania jednej generacji ulegał stałemu wydłużaniu. Do odmiennych wniosków doszli Jackson i Woodbine (3). Badacze ci na przykładzie uszkodzonych komórek *Staphylococcus aureus* wykazali, że czas podwojenia populacji, który jest również miarą wzrostu ilościowego, był taki sam dla ogrzanych i nieogrzanych bakterii.

Wyjściowa mikroflora mięsa reprezentuje zwykle zróżnicowane grupy systematyczne (1, 6, 9, 11), a bakterie należące do poszczególnych grup mogą różnie reagować na działanie podwyższonych temperatur. Dlatego też problem działania subletalnych temperatur na mikroflorę żywności wydaje się bardziej skomplikowany niż dotychczas sądzono i wymaga jeszcze dalszych badań.

Wnioski

1. Subletalne ogrzanie komórek *Escherichia coli* w temperaturach: 42°C i 50°C powodowało w pierwszej godzinie inkubacji w bulionie odżywczym o temperaturze 37°C szybszy rozwój pozostałych przy życiu bakterii w porównaniu z komórkami nieogrzanyymi.

2. Subletalne ogrzanie komórek *Escherichia coli* powodowało wydłużenie czasu jednej generacji. Wraz z podwyższeniem temperatury ogrzewania czas jednej generacji w fazie logarytmicznego wzrostu uległ stałemu wydłużaniu.

Piśmiennictwo

- Burbianka M., Pliszka A.: Mikrobiologia żywności. PZWL, 1977.
- Horubala A.: Podstawy przechowalności żywności. PWN, 1975.
- Jackson H., Woodbine M.: J. appl. Bact. 26, 152, 1963.
- Kenderski S.: Rev. Ferment. Ind. Aliment. 28, 195, 1973.

- Kotelko K., Sedlaczek L., Lachowicz T. M.: Biologia bakterii. PWN, 1977.
- Maleszewski J.: Higiena w przemyśle spożywczym — aspekty mikrobiologiczne. WNT, 1976.
- Mossel D. A. A.: Wien. tierärztl. Mschr. 43, 137, 1956.
- Paluch J.: Podstawy mikrobiologii przemysłowej. WNT, 1972.
- Praca zbiorowa: Nauka o mięsie i produktach mięsnych. WPLiS, 1966.
- Prost E.: Higiena miesa. PWRiL, 1975.
- Truszczyński M.: Bakteriologia weterynaryjna. PWRiL, 1977.
- Yotis W., Teodoro R.: J. Dairy Res. 24, 27, 1957.

Adres autora: dr Jan Uradziński, Al. Warszawska 87 m. 21, 10-083 Olsztyn.

Урадзинский Я. — Влияние сублетального обогрева на динамику развития и продолжительность одной генерации *Escherichia coli*.

Цель исследований состояла в определении влияния обогрева в различных температурах от 42°С до летальных температур на динамику развития и продолжительность одной генерации *Escherichia coli*. Упомянутые свойства определялись в питательном бульоне, инкубированном в темп. 37°С.

Исследования велись параллельно с необогретыми микроорганизмами и с микроорганизмами, обогретыми 15 минут в темп.: 42, 46, 50 и 52°С. Было выполнено по 10 серий исследований с каждой температурой обогрева.

Обогрев клеток *Escherichia coli* в темп.: 42, 46 и 50°С вызывал на протяжении первого часа инкубации бульона более быстрое развитие оставшихся при жизни бактерий. Обогрев же в темп. 52°С вызывал смерть всех бактериальных клеток.

Сублетальный обогрев *Escherichia coli* был причиной продления периода одной генерации. С повышением температуры обогрева период одной генерации в фазе логарифмического роста подвергался продлению.

Uradziński J. — The influence of sublethal heating on dynamics of development and time of persistence of one generation of *Escherichia coli*.

The purpose of the studies was to determine the influence of heating at various ranges of temperatures, from 42° up to lethal temperatures, on dynamics of development and time of persistence of one generation of *Escherichia coli*. The above mentioned properties were determined on nutritive broth incubated at 37°C.

The studies were performed parallelly with non heated and heated for 15 min. bacteria at 42, 46, 50 and 52°C. For each temperature of heating ten replicates were done.

Heating of *Escherichia coli* at 42, 46 and 50°C caused a faster growth of surviving bacteria in the first hour of broth incubation. Heating at 52°C caused a total death of bacterial cells.

Sublethal heating caused a prolongation of the time of persistence of one generation of *Escherichia coli*. Alongside with the increase of heating temperature the time of persistence of one generation at a log phase increased.

BORRESEN B.: Ropomaczcze u suk. II. Badania patofizjologiczne. Aspekty anamnestyczne, kliniczne i nożnicze. (Pyometria in the dog. II. A pathophysiological investigation. Anamnestic, clinical and reproductive aspects). Nord. Vet. Med. 31, 251—257, 1979 (6).

U suk z ropomaczcem występuje cały zespół objawów związany z nagromadzeniem ropy w macicy. Obserwacje przeprowadzone na 119 zwierzętach wykazały, że u 83% badanych pacjentów ropomaczcze występowało w wieku 6—11 lat. Około 93% prawidłowych rozpoznaw ustalano w okresie 12 tygodni po ustąpieniu normalnego proestrus. U 90% chorych samic występowała polidypsja oraz zaburzenia w laktacji. W badaniach nie ustalono żadnych związków między doustnym stosowaniem gestagenów i występowaniem ropomaczcza.

G.