



## Ćwiczenie 3

### Temat: Wpływ wybranych czynników fizycznych i chemicznych na rozwój mikroorganizmów występujących w żywności (temperatura, pH środowiska, dezynfektanty, konserwanty)

#### 1. Podstawy: wzrost, przeżycie, zahamowanie i inaktywacja

Wzrost oznacza zwiększanie liczby komórek zdolnych do podziału, a nie tylko wzrost biomasy lub aktywności metabolicznej. Krzywa wzrostu populacji obejmuje fazę adaptacji (lag), fazę wykładniczą, stacjonarną oraz fazę spadku liczby komórek hodowlanych. Stres technologiczny może wydłużać lag bez zmiany maksymalnej szybkości wzrostu albo zmniejszać tę szybkość bez natychmiastowej śmierci komórek.

Działanie **bakteriostatyczne** hamuje namnażanie w określonych warunkach, natomiast **bakteriobójcze** zmniejsza liczbę żywych komórek. Sterylizacja oznacza proces zwalidowany w odniesieniu do wymaganego poziomu zapewnienia sterylności; pasteryzacja ma ograniczyć określone zagrożenia i mikroflorę psującą, ale nie gwarantuje eliminacji wszystkich przetrwalników.

Wynik posiewu jest miarą hodowlalności w zastosowanych warunkach, nie bezpośrednim pomiarem wszystkich komórek żywych. Komórki subletalnie uszkodzone mogą nie tworzyć kolonii na podłożach selektywnych, a po regeneracji odzyskać zdolność wzrostu. Zjawisko VBNC (viable but non-culturable) dodatkowo komplikuje interpretację wyników. Kluczowa zasada mikrobiologii żywności: efekt czynnika jest funkcją dawki, czasu, rodzaju drobnoustroju i właściwości produktu. Ta sama temperatura lub wartość pH nie daje identycznego wyniku w bulionie laboratoryjnym, mięsie, mleku i kwaśnym soku.

#### 2. Temperatura jako czynnik wzrostu i inaktywacji

##### 2.1. Dlaczego temperatura wpływa na komórkę?

Temperatura reguluje szybkość reakcji enzymatycznych, płynność błony cytoplazmatycznej, stabilność białek i kwasów nukleinowych oraz transport substancji. Przy obniżeniu temperatury spada dynamika przemian metabolicznych i dyfuzja przez błonę; przy przegrzaniu dochodzi do destabilizacji struktur białkowych, zaburzeń przepuszczalności błon i uszkodzeń wielocelowych.

Dla każdego szczepu określa się **temperaturę minimalną, optymalną i maksymalną wzrostu**. Granice te opisują namnażanie, nie przeżywalność: bakteria może przeżyć temperaturę, w której nie jest w stanie się dzielić. Nie należy również utożsamiać optimum wzrostu z maksimum termooporności.

| Grupa fizjologiczna | Charakterystyka                                                 | Znaczenie w żywności                                              |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <b>Psychrofile</b>  | Optimum zwykle $\leq 15^{\circ}\text{C}$                        | Środowiska stale zimne; rzadziej główna mikroflora żywności       |
| <b>Psychrotrofy</b> | Mogą rosnąć w temperaturach chłodniczych, optimum często wyższe | Listeria monocytogenes, Yersinia enterocolitica, Pseudomonas spp. |
| <b>Mezofile</b>     | Optimum zazwyczaj $20\text{--}45^{\circ}\text{C}$               | Większość patogenów żywnościowych                                 |
| <b>Termofile</b>    | Optimum zwykle $\geq 45^{\circ}\text{C}$                        | Mikroflora termofilna i wybrane przetrwalnikujące                 |



## 2.2. Chłodzenie i zamrażanie

Chłodzenie jest przede wszystkim metodą hamowania wzrostu, a nie metodą wyjąławiania. Psychrotrof *L. monocytogenes* może namnażać się w chłodzie, zwłaszcza w żywności gotowej do spożycia o długim terminie trwałości. *Pseudomonas* spp. powodują psucie chłodzonych produktów białkowych i mogą wytwarzać enzymy zewnątrzkomórkowe zachowujące aktywność po obróbce cieplnej.

Podczas zamrażania dochodzi do tworzenia kryształów lodu, wzrostu stężenia substancji rozpuszczonych w niezamarzniętej fazie i zmian osmotycznych. Część komórek ginie lub zostaje uszkodzona, lecz wiele przeżywa przez długi czas. Rozmrażanie może umożliwić regenerację komórek, dlatego zamrożenie produktu nie zastępuje kontroli higienicznej.

Adaptacja do zimna obejmuje zmianę udziału nienasyconych kwasów tłuszczowych w błonie, produkcję białek szoku zimna oraz reorganizację translacji. W praktyce znaczenie ma także historia temperatury: komórki wcześniej zaadaptowane mogą reagować inaczej niż populacja poddana nagłemu ochłodzeniu.

## 2.3. Ogrzewanie: pasteryzacja, sterylizacja i przetrwalniki

Wilgotne ciepło zwykle inaktywuje mikroorganizmy skuteczniej niż suche przy porównywalnej temperaturze, ponieważ ułatwia denaturację białek. W pasteryzacji celem jest osiągnięcie wymaganej redukcji określonych mikroorganizmów, nie całkowita jałowość. W sterylizacji termicznej uwzględnia się najoporniejsze formy, zwłaszcza endospory.

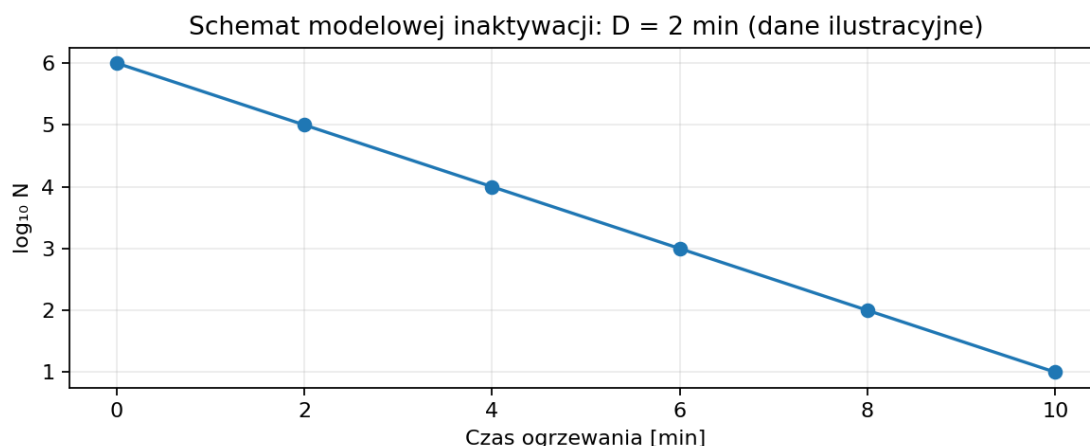
Przetrwalniki *Bacillus* i *Clostridium* mają odwodniony rdzeń, osłony ochronne, dipikolinian wapnia i białka chroniące DNA. Ich termooporność zależy od gatunku, szczepu, warunków sporulacji i matrycy. Niewłaściwe chłodzenie po obróbce może pozwolić przetrwalnikom na kiełkowanie i namnażanie.

Niektóre toksyny mogą pozostać aktywne mimo zabicia komórek. Przykładem jest **cereulid**, ciepłostabilna toksyna wymiotna *Bacillus cereus*. Dlatego ocena bezpieczeństwa produktu nie może ograniczać się do końcowej liczby komórek.

## 2.4. Kinetyka śmierci cieplnej: D, z, F

Wartość **D<sub>t</sub>** to czas w określonej temperaturze T wymagany do obniżenia liczby drobnoustrojów o jeden rząd wielkości (90%) przy założeniu log-liniowej inaktywacji. Nie oznacza ona „liczby redukcji” — trzy redukcje logarytmiczne odpowiadają  $3 \times D_t$ , jeśli model log-liniowy jest adekwatny. Wartość **z** oznacza wzrost temperatury potrzebny do dziesięciokrotnego skrócenia D. Parametr **F** jest równoważnym czasem działania cieplnego w temperaturze odniesienia przy określonej wartości z.  $F_0$  odnosi się zwyczajowo do 121,1°C i  $z = 10^\circ\text{C}$ ; nie jest uniwersalną miarą skuteczności wobec wszystkich mikroorganizmów.

*Przykład:* dla  $D_{70} = 2$  min, modelowa redukcja 5 log wymaga 10 min utrzymania produktu w 70°C. W rzeczywistym procesie trzeba uwzględnić czas nagrzewania, najzimniejszy punkt, zmienność oporności i ewentualne odchylenia od przebiegu log-liniowego.



Ryc. 1. Model log-liniowy. W praktyce obserwuje się również ramiona i ogony krzywych przeżycia.

### 3. Odczyn środowiska (pH)

#### 3.1. pH zewnętrzne a homeostaza komórkowa

pH jest ujemnym logarytmem aktywności jonów wodorowych. Bakterie utrzymują pH cytoplazmy w zakresie umożliwiającym działanie enzymów, nawet gdy pH produktu różni się od tego zakresu. Zakwaszenie otoczenia zwiększa koszt energetyczny utrzymania homeostazy: komórka aktywuje transport protonów, systemy dekarboksylaz aminokwasowych, białka odpowiedzi kwasowej i mechanizmy naprawcze.

Wysokie pH również destabilizuje gradient protonowy i transport błonowy. Zakres tolerancji jest cechą szczepozależną. Drożdże i pleśnie często dobrze radzą sobie w środowiskach kwaśnych, co tłumaczy ich udział w psuciu soków, przetworów owocowych i produktów fermentowanych.

#### 3.2. Kwasy organiczne: dlaczego samo pH nie wystarcza?

Słabe kwasy organiczne w postaci niezdyssocjowanej łatwiej przenikają przez błonę. W cytoplazmie o wyższym pH dyssocjują, uwalniając protony i aniony. Prowadzi to do zakwaszenia wnętrza komórki, zużycia ATP na przywracanie homeostazy oraz zaburzeń enzymatycznych i transportowych.

Proporcja postaci niezdyssocjowanej zależy od pH i  $pK_a$ : udział  $HA = 1/[1 + 10^{(pH - pK_a)}]$ . Dwa produkty o tym samym pH mogą więc różnić się aktywnością przeciwdrobnoustrojową w zależności od rodzaju i całkowitego stężenia kwasu, pojemności buforowej oraz składu matrycy.

Fermentacja mlekowa działa nie tylko przez spadek pH, ale także przez akumulację kwasów organicznych, konkurencję o substraty i niekiedy produkcję bakteriocyn. Wrażliwość patogenów na kwasy jest zależna od wcześniejszej adaptacji i może zmieniać się pod wpływem stresów krzyżowych.

| Produkt (przykład) | Typowy charakter środowiska | Główna uwaga mikrobiologiczna                                   |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Mleko              | Bliskie obojętnemu          | Wysoka dostępność składników; wymaga chłodzenia/obróbki         |
| Jogurt             | Kwaśne                      | Zakwaszenie ogranicza wiele bakterii, ale nie wszystkie drożdże |
| Sok owocowy        | Kwaśne                      | Istotne drożdże, pleśnie i kwasotolerancyjne bakterie           |
| Mięso świeże       | Zwykle lekko kwaśne         | pH zależy od przemian poubojowych i gatunku mięsa               |



## 4. Dezynfektanty i higiena środowiska produkcji

### 4.1. Mycie, dezynfekcja, antyseptyka, sterylizacja

Mycie usuwa zabrudzenia i znaczną część mikroorganizmów przez oddziaływanie mechaniczne i chemiczne. Dezynfekcja ogranicza lub inaktywuje określone mikroorganizmy na powierzchniach do poziomu przewidzianego zastosowaniem preparatu. Antyseptyki stosuje się na żywych tkankach. Sterylizacja ma inny, znacznie bardziej rygorystyczny cel niż rutynowa dezynfekcja.

Najczęstszą przyczyną nieskutecznej dezynfekcji jest pominięcie mycia, nieodpowiedni czas kontaktu, błędne stężenie, niewłaściwa temperatura, obecność resztek organicznych albo niezgodność preparatu z powierzchnią. Deklaracje skuteczności należy odczytywać z etykiety i dokumentacji preparatu, a nie przenosić dowolnie między zastosowaniami.

| Grupa                                    | Główne cele molekularne                              | Ograniczenia                                              |
|------------------------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| <b>Alkohole</b>                          | Denaturacja białek, zaburzenia błon                  | Słabe działanie wobec endospor; szybkie odparowanie       |
| <b>Związki chloru</b>                    | Utlenianie białek, lipidów i kwasów nukleinowych     | Wrażliwość na obciążenie organiczne; zgodność materiałowa |
| <b>Nadtlenek wodoru / kwas nadoctowy</b> | Utleniające uszkodzenia wielocelowe                  | Wymagają właściwego stężenia, czasu i procedur BHP        |
| <b>Czwartorzędowe sole amoniowe</b>      | Uszkodzenie błon i zaburzenie przepuszczalności      | Ograniczone spektrum, m.in. wobec spor; wpływ zabrudzeń   |
| <b>Aldehydy</b>                          | Alkilacja / sieciowanie białek i kwasów nukleinowych | Istotne ograniczenia toksykologiczne i proceduralne       |

### 4.2. Biofilm, tolerancja i ocena skuteczności

Biofilm to zorganizowana społeczność komórek związanych z powierzchnią i macierzą zewnątrzkomórkową. Macierz może ograniczać penetrację substancji czynnej, a wolniej rosnące komórki w głębszych warstwach wykazują inną wrażliwość niż komórki planktonowe. Szczególne znaczenie mają odpływy, uszczelki, trudno dostępne złącza i powierzchnie o mikrouszkodzeniach.

Tolerancja na biocyd nie jest automatycznie równoznaczna z dziedziczną opornością. Możliwe są adaptacja fenotypowa, selekcja wariantów i mechanizmy transportu zewnętrznego. Wnioski o oporności krzyżowej na antybiotyki wymagają osobnych badań; nie należy zakładać, że każda ekspozycja subletalna wywołuje taki efekt.

Badania zawiesinowe oceniają działanie w warunkach kontrolowanych, a badania nośnikowe lepiej odzwierciedlają działanie na powierzchni. W praktyce ocenia się redukcję logarytmiczną, stosuje neutralizator pozostałości preparatu i odpowiednie kontrole. W Europie istotna jest rodzina norm EN 14885 oraz normy szczegółowe odpowiednie dla zastosowania.

## 5. Konserwanty chemiczne stosowane w żywności

### 5.1. Zasady skutecznego konserwowania

Konserwant jest składnikiem celowo dodanym do żywności, aby ograniczyć wzrost niepożądanego mikroflory w przewidzianym okresie trwałości. Skuteczność zależy od dawki, pH, aktywności wody, rodzaju produktu i mikroorganizmu. Konserwant nie naprawia zaniedbań higienicznych ani nie zastępuje walidacji trwałości.

Należy rozróżniać nazwę związku, jego formę chemiczną oraz dopuszczone zastosowanie prawne. Zakres i maksymalne poziomy stosowania dodatków w UE wynikają z aktualnych przepisów i warunków dla konkretnych kategorii żywności; nie można uznać danej substancji za dopuszczoną do każdego produktu.



| Substancja / grupa                   | Dominujący mechanizm                                                            | Przykładowe zastosowanie                         |
|--------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Sorbiniany / kwas sorbowy</b>     | Hamowanie enzymów i metabolizmu, szczególnie drożdży i pleśni                   | Wybrane produkty kwaśne, wyroby piekarskie, sery |
| <b>Benzoesany / kwas benzoesowy</b>  | Postać niezdysocjowana zaburza homeostazę i metabolizm                          | Wybrane kwaśne napoje i przetwory                |
| <b>Propioniany / kwas propionowy</b> | Hamowanie pleśni i wybranych bakterii                                           | Wybrane wyroby piekarskie                        |
| <b>Azotyny</b>                       | Hamowanie określonych szlaków metabolicznych, istotne wobec <i>C. botulinum</i> | Wybrane peklowane produkty mięsne                |
| <b>SO<sub>2</sub> / siarczyny</b>    | Hamowanie enzymów i reakcji metabolicznych                                      | Wybrane napoje, wino, produkty owocowe           |
| <b>Kwas octowy / mleczan</b>         | Zakwaszanie i działanie słabych kwasów                                          | Marynaty i fermentacja / wybrane receptury       |

## 5.2. Azotyny i zagrożenie botulinowe

Azotyny w wybranych wyrobach mięsnych ograniczają zagrożenie związane z *Clostridium botulinum*, uczestniczą w kształtowaniu barwy i właściwości sensorycznych. Ich skuteczność współzależy od pH, soli, obróbki termicznej, temperatury przechowywania i receptury. Jednocześnie stosowanie azotynów podlega restrykcjom ze względu na ryzyko tworzenia N-nitrozozwiązków. Nie wolno wyprowadzać poziomów dodatku z historycznych receptur bez sprawdzenia aktualnych regulacji. Istotne jest rozróżnienie grup fizjologicznych *C. botulinum* i ich wymagań wzrostowych. Żywność pakowana próżniowo lub w atmosferze modyfikowanej wymaga szczególnej analizy zagrożeń beztlenowych; sam brak tlenu nie gwarantuje bezpieczeństwa.

## 5.3. Sorbiniany, benzoesany, propioniany i siarczyny

Sorbiniany i benzoesany są na ogół skuteczniejsze w kwaśnym środowisku, gdy większa część kwasu pozostaje niezdysocjowana. Wzrost drożdży i pleśni jest częstym punktem krytycznym przy produktach owocowych; jednak gatunki i szczepy różnią się wrażliwością, a adaptacja może ograniczać skuteczność.

Propioniany wykorzystuje się szczególnie do ograniczania pleśni w wybranych produktach piekarskich. SO<sub>2</sub> i siarczyny oddziałują na wiele szlaków metabolicznych i mają zastosowania m.in. w winie oraz przetwórstwie owocowym; ich użycie wymaga również uwzględnienia wymogów deklarowania składników i nadwrażliwości części konsumentów.

## 6. Łączne oddziaływanie czynników i stres subletalny

Technologia płotków (*hurdle technology*) polega na zestawieniu kilku umiarkowanych barier: temperatury, pH, aktywności wody, atmosfery, konserwantów i konkurencji mikrobiologicznej. Bariery mogą działać addytywnie, synergistycznie albo antagonistycznie. Wyniku nie wolno przewidywać wyłącznie przez proste sumowanie pojedynczych redukcji.

Komórki poddane stresowi subletalnemu uruchamiają systemy ochronne, np. odpowiedź na stres ogólny, chaperony, systemy antyoksydacyjne i naprawę DNA. Zjawisko tolerancji krzyżowej może sprawić, że adaptacja do jednego stresu zmienia wrażliwość na drugi, lecz kierunek efektu jest zależny od organizmu i warunków.

W badaniach mikrobiologicznych ważne jest równoległe rozpatrywanie hodowalności, integralności błon, aktywności metabolicznej oraz zdolności do odrostu. Cytometria przepływowa z barwnikami żywotności dostarcza innych informacji niż posiew; rozbieżność wyników nie musi oznaczać błędu, lecz różne definicje stanu komórki.



## Część praktyczna

***Każdy bada jeden szczep. Intensywność wzrostu porównywać z próbą kontrolną inkubowaną w warunkach optymalnych***

### 1. Badanie wpływu temperatur na wzrost drobnoustrojów: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*

Wykonać posiewy badanych szczepów oczkiem ezy do 4 probówek z podłożem bulion z glukozą o pH 7,0:

- a. inkubacja w temperaturze optymalnej - **próba kontrolna**
- b. pasteryzacja w temp. 80°C przez 15 min. i po ostudzeniu inkubacja w temp. optymalnej
- c. pasteryzacja w temp. 63,5°C przez 30 min. i po ostudzeniu inkubacja w temp. optymalnej
- d. inkubacja w temp. 7 °C przez 7 dni.

Po inkubacji sprawdzić wzrost szczepów i ocenić wrażliwość szczepów na warunki pasteryzacji oraz temperatury chłodniczej.

### 2. Badanie oddziaływania pH środowiska na wzrost drobnoustrojów: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*

Wykonać posiewy badanych szczepów oczkiem ezy do 2 probówek z podłożem bulion z glukozą o różnym pH:

- a. pH 4,5
- b. pH 9,6

Po posiewie inkubować próby w warunkach optymalnych dla danego szczepu. Po inkubacji sprawdzić wzrost szczepów i ocenić wrażliwość na kwaśne i alkaliczne środowisko.

### 3. Badanie oddziaływania NaCl na wzrost drobnoustrojów: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*

Wykonać posiewy badanych szczepów oczkiem ezy do 2 probówek z podłożem bulion z glukozą (pH 7,0) o różnym stężeniu NaCl:

- a. 4,5 %
- b. 15 %

Po posiewie inkubować próby w warunkach optymalnych dla danego szczepu. Po inkubacji sprawdzić wzrost szczepów i ocenić wrażliwość na stężenia soli.

### 4. Badanie oddziaływania dodatku benzoianu sodu na wzrost drobnoustrojów: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*

Wykonać posiewy badanych szczepów oczkiem ezy do 2 probówek z podłożem bulion z glukozą z dodatkiem 1% benzoianu sodu o różnym pH:

- a. pożywka o pH 7,0 z dodatkiem 1% benzoianu sodu
- b. pożywka o pH 4,5 z dodatkiem 1% benzoianu sodu

Posiewy inkubować w warunkach optymalnych dla danego szczepu. Po inkubacji sprawdzić wzrost w obydwu probówkach i ocenić wpływ pH na skuteczność działania benzoianu sodu.



### 5. Badanie wrażliwości szczepów na działanie środka dezynfekcyjnego Pursept-AF

Wykonać posiewy badanych szczepów oczkiem ezy do probówki z podłożem bulion z glukozą (pH 7,0) z dodatkiem 10% środka dezynfekcyjnego.

Posiewy inkubować w warunkach optymalnych dla danego szczepu. Po inkubacji sprawdzić wzrost i ocenić skuteczność działania badanego środka.

### Warunki inkubacji badanych na ćwiczeniach szczepów:

*Escherichia coli* - 37°C przez 48 godzin,

*Bacillus subtilis* - 30°C przez 48 godzin,

*Staphylococcus aureus* - 37°C przez 48 godzin,

*Saccharomyces cerevisiae* - 25°C przez 96 godzin.

### Ćwiczenie 4

Odczytać wyniki posiewów, zestawić je w tabelach i zinterpretować

|                             |                   |        | BADANY SZCZEP |                   |                 |                      |
|-----------------------------|-------------------|--------|---------------|-------------------|-----------------|----------------------|
|                             |                   |        | <i>E.coli</i> | <i>B.subtilis</i> | <i>S.aureus</i> | <i>S. cerevisiae</i> |
| próba kontrolna             |                   |        |               |                   |                 |                      |
| temperatura 7°C             |                   |        |               |                   |                 |                      |
| pasteryzacja w temp. 80°C   |                   |        |               |                   |                 |                      |
| pasteryzacja w temp. 63,5°C |                   |        |               |                   |                 |                      |
| BADANY CZYNNIK              | pH                | 4,5    |               |                   |                 |                      |
|                             |                   | 9,6    |               |                   |                 |                      |
|                             | NaCl              | 4,5%   |               |                   |                 |                      |
|                             |                   | 15%    |               |                   |                 |                      |
|                             | Benzoesan sodu 1% | pH 4,5 |               |                   |                 |                      |
|                             |                   | pH 7,0 |               |                   |                 |                      |
|                             | Pursept-AF        |        |               |                   |                 |                      |