

Aktywacja przetrwalników *Bacillus stearothermophilus*

Jan Iciek¹

Zdzisława Libudziś²

Helena Stobińska²

Elżbieta Ottuszek²

Agnieszka Jaworska¹

1. Wprowadzenie

Podczas sterylizacji produktów spożywczych, jak również środowisk fermentacyjnych, największe trudności w uzyskiwaniu ich jałowości stwarzają ciepłooporne formy przetrwalne bakterii. Są one wytwarzane m.in. w cyklu rozwojowym bakterii należących do rodzajów *Bacillus* i *Clostridium*. Do gatunków wytwarzających spory o szczególnie wysokiej ciepłooporności należą *B. thermoacidurans*, *B. stearothermophilus* oraz *C. sporogenes* i *C. botulinum* typu A i B (1). Spory bakteryjne są postaciami przetrwalnymi komórek o różnym stanie fizjologicznym. Spora w stanie spoczynkowym jest komórką zdolną do wyrastania w prostych podłożach odżywczych. Uważa się, że spora znajduje się w stadium uśpienia (2 - 4), gdy do kiełkowania są niezbędne specjalne, korzystne warunki środowiskowe. Poziom uśpienia przetrwalnika decyduje o stopniu jego wrażliwości na czynniki fizyczne i chemiczne (5,6).

Do samoczynnego kiełkowania zdolne są tylko spory znajdujące się w stanie spoczynkowym. Kiełkowanie spor uśpionych jest możliwe dopiero po ich aktywacji, którą wywołują różne związki chemiczne typu substancji odżywczych oraz pozaodżywczych, a także enzymy i czynniki fizyczne (7 - 16, 25). Aktywacja spor jest procesem odwracalnym. Przetrzywanie przetrwalników w środowisku uniemożliwiającym ich wykiełkowanie (np. w wodzie) powoduje ponowne przejście w stan uśpienia (17 - 19).

Wśród aktywatorów fizycznych najefektywniejszą jest obróbka termiczna (20 - 23, 27). Zależnie od gatunku bakterii przetrwalnikujących aktywacja jest osiągana w różnej temperaturze, najczęściej w zakresie 65 - 120°C (23,24). Szczególnie istotna jest aktywacja w temperaturze powyżej 100°C; towarzyszy jej wówczas równoczesna destrukcja części spor (22,25 - 27). Dla *B. stearothermophilus* maksymalną aktywację spor osiągnano w temperaturze 110 - 115°C. Jednakże dokładnie wykonana analiza danych źródłowych wy-

¹ Instytut Chemicznej Technologii Żywności, Politechnika Łódzka.

² Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Politechnika Łódzka.

kazała brak w literaturze informacji pozwalających przewidzieć stopień i kinetykę termicznej aktywacji oraz wpływu tej aktywacji na kinetykę destrukcji przetrwalników. Znajomość warunków i kinetyki termicznej aktywacji oraz destrukcji przetrwalników jest niezbędna dla wyznaczenia optymalnych parametrów sterylizacji podłoża fermentacyjnych i produktów spożywczych.

Przewidujemy, że łatwiej (stosując łagodniejsze warunki) będzie można zniszczyć spory w stanie spoczynkowym. Możliwość zastosowania łagodniejszych warunków sterylizacji pozwala na zmniejszenie degradacji podłoża podczas jego wyjaławiania. Z tych powodów poznanie procesu aktywacji przetrwalników ma duże znaczenie, zarówno teoretyczne jak i praktyczne.

Celem pracy była ocena różnych metod wyzwalających aktywację przetrwalników *B. stearothermophilus* oraz oznaczenie efektów i warunków obróbki cieplnej (temperatury, czasu jej działania) pozwalających na uzyskanie maksymalnej aktywacji przetrwalników zawieszonych w wodzie.

2. Metodyka badań

2.1. Pozyskiwanie i przechowywanie materiału biologicznego

Badania prowadzono dla *Bacillus stearothermophilus* ATCC 10149.

Przetrwalniki bakteryjne otrzymywano w dwustopniowej procedurze namnażania wg metody Kim i Naylor (28), stosując płynne podłoże presporulacyjne o składzie: 1% tryptone (Difco), 0,5% yeast extract (Difco) oraz 0,2% K_2HPO_4 (pH podłoża wynosiło 7,2) oraz podłoże sporulacyjne zawierające 0,3% bacto-beef extract (Difco), 0,5% bacto-peptone (Difco), 0,4% yeast extract (Difco) oraz 10 ppm $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ i 2% agaru, (pH podłoża 7,2).

Hodowlę presporulacyjną prowadzono w temperaturze 55°C przez 24 godziny w warstwie podłoża o grubości 1 cm. Przetrwalniki bakteryjne otrzymywano w hodowli powierzchniowej, stosując podłoże sporulacyjne i płytki Petriego o średnicy 15 cm. Posiane płytki inkubowano przez 48 godzin w temperaturze 55°C. Warunki te zapewniały maksymalną wydajność przetrwalników (29). Biomasę bakterii zmywano z powierzchni płytek jałową wodą destylowaną, otrzymując zawiesinę o gęstości ok. 10^9 kom/cm³. Dla zabicia form wegetatywnych ogrzewano ją w temperaturze 80°C przez 10 minut.

Do badań zawiesinę rozcieńczano do gęstości około 10^6 spor/cm³ (wyznaczoną metodą mikroskopową).

Liczba przetrwalników spoczynkowych, zdolnych do wzrostu w postaci kolonii, w przygotowanej zawiesinie wynosiła ok. 10^5 kom/cm³ (wyznaczona metodą płytkową).

2.2. Aktywowanie przetrwalników

Jako czynniki aktywujące przetrwalniki *B. stearothermophilus* ATCC 10149 zastosowano: mechaniczne wytrząsanie, traktowanie lizozymem oraz działanie ciepłem (15,16,24).

Aktywację przetrwalników *B. stearothermophilus* wykonano w następujących wariantach doświadczeń:

1) zawiesinę przetrwalników o objętości 30 cm³ wytrząsano w czasie 10 minut z 5,5 g szklanych kuleczek o średnicy 2 mm,

2) zawiesinę przetrwalników inkubowano z lizozymem, rozpuszczonym w buforze fosforanowym o pH 7,4, w temperaturze 40°C w czasie 2 i 10 minut stosując dawkę enzymu wynoszącą 1,5 µg/cm³,

3) zawiesinę przetrwalników umieszczoną w zatopionych kapilarach lub rurkach szklanych ogrzewano w łaźni olejowej.

Liczbę przetrwalników, które w wyniku działania zastosowanych czynników zostały zaktywowane, kontrolowano metodą płytkową wykonując wysiewy z odpowiednich rozcieńczeń do podłoża regeneracyjnego (28). Stosowane podłoże zawierało: 0,3% beef extract (Difco), 0,5% tryptone (Difco), 0,4% yeast extract (Difco), 0,1% glukozy oraz purpurę bromokrezolową jako indykator pH. Posiewy inkubowano w temperaturze 55°C przez 48 godzin. Zaktywowane przetrwalniki (zdolne do kiełkowania) wytwarzały żółte kolonie otoczone strefami wskazującymi na ich kwaszące właściwości. Wyniki pomiarów podawano jako liczbę przetrwalników zdolnych do wzrostu w postaci kolonii (j.t.k./cm³; j.t.k. — jednostki tworzące kolonie).

Kontrolę stopnia aktywacji termicznej przetrwalników prowadzono w zatopionych rurkach szklanych w zakresie temperatury 90°C – 125°C oraz w zatopionych kapilarach szklanych w temperaturze od 90°C do 132°C. Wymiary rurek: średnica zewnętrzna 7,45 mm, grubość ścianki 1,15 mm, długość ok. 12 cm. Wymiary kapilar: średnica zewnętrzna 1,48 mm, grubość ścianki 0,32 mm, długość ok. 20 cm.

Rurki bądź kapilary po zatopieniu umieszczano w łaźni olejowej i ogrzewano w czasie do 10, 40 lub 120 minut w temperaturze: 132°C, 125°C, 120°C, 115°C, 110°C, 105°C, 100°C, 95°C oraz 90°C.

Ocenę stopnia przeżycia bakterii prowadzono w 8 – 9 próbach dla każdej temperatury, wykonując 8 – 10 równoległych wysiewów dla danego czasu ogrzewania.

3. Omówienie wyników

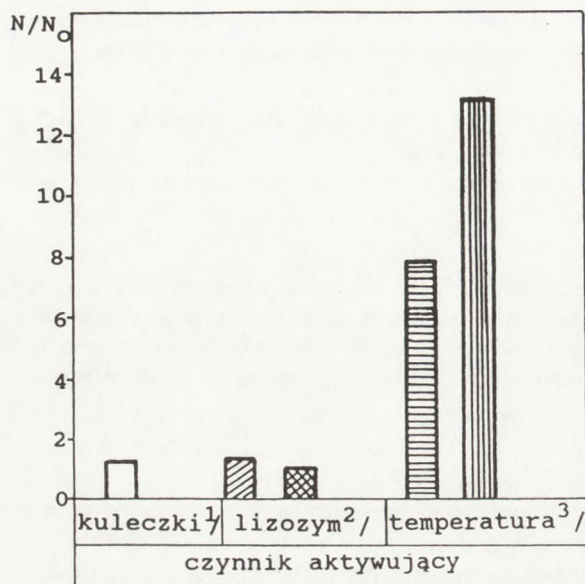
3.1. Dobór czynnika aktywującego przetrwalniki

Populacja przetrwalników (N) stanowi mieszaninę spor w stanie spoczynkowym (N₀) oraz spor uśpionych (N – N₀) wymagających wstępnej aktywacji, po której są one dopiero zdolne do wzrostu w postaci kolonii.

W celu aktywacji przetrwalników *B. stearothermophilus* ATCC 10149 zastosowano lizozym, wytrząsanie z perełkami oraz obróbkę termiczną.

Stwierdzono, że najskuteczniejszym czynnikiem aktywującym jest temperatura działająca w określonym czasie. Po ogrzewaniu w rurkach w 120°C ilość przetrwalników zdolnych do wzrostu w postaci kolonii zwiększa się 7,8 razy.

W kapilarach natomiast uzyskany stopień aktywacji wynosi 13,1 w temperaturze 115°C (rys. 1). Tak jak podaje Keyman i wsp. (18) mechanizm polega na cieplnej aktywacji enzymów, które nie są aktywne w sporze uśpionej.



Rys. 1. Stopień aktywacji (N/N_0) przetrwalników *B. stearothermophilus* ATCC 10149:

- 1) 10 min wytrząsania;
- 2) stężenie lizozymu: 1,5 µg/cm³; czas działania: 2 min ▨ i 10 min ▩;
- 3) ▨ rurki (120°C), ▩ kapilary (115°C).

Ogrzewanie udostępnia ponadto substancje potrzebne do ich kiełkowania, np. L-alaninę lub inaktywuje inhibitory tego procesu (18).

Po traktowaniu przetrwalników lizozymem przez 2 minuty uzyskano tylko 1,3-krotne zwiększenie stopnia zaktwowanych spor. Po wydłużeniu czasu działania enzymu do 10 minut, stwierdzono uszkodzenie komórek i praktyczny zanik efektu aktywacji ($N/N_0 = 1,05$). Gould i Hitchins (30) wykazali, że pod wpływem lizozymu następowała także liza przetrwalników *Clostridium bif fermentans*.

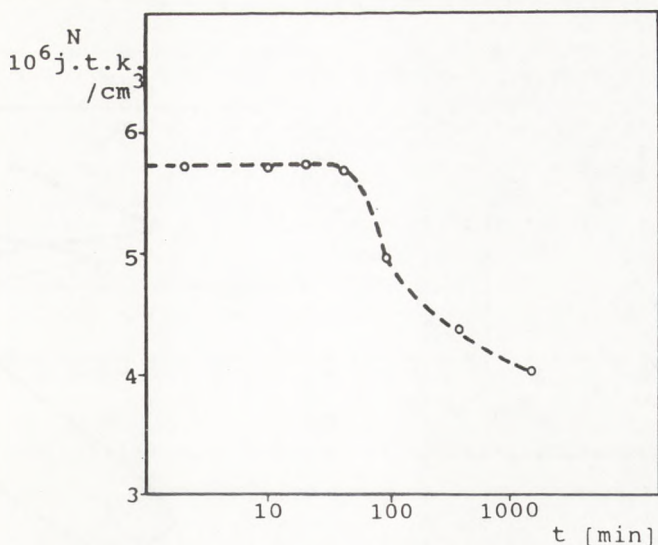
Traktowanie spor szklany- mi kuleczkami pobudza przetrwalniki do wzrostu zaledwie 1,25 razy (rys. 1).

Na podstawie uzyskanych wyników widać wyraźnie, że najskuteczniejszym aktywatorem przetrwalników *B. stearo-*

thermophilus jest temperatura. Jednakże w czasie przechowywania zaktwowanych przetrwalników w temperaturze pokojowej w zawiesinie wodnej ponownie przechodzą one w stan uśpiania (rys. 2). Stały stopień aktywacji zachowują jedynie do ok. 40 minut przechowywania w tych warunkach. Po 90 minutach zaobserwowano zjawisko ponownego usypiania przetrwalników. Liczba aktywnych spor zmalała od $5,73 \times 10^6$ do $4,97 \times 10^6$ kom/cm³. Po 24 godzinach przetrzymywania w temperaturze pokojowej $4,03 \times 10^6$ kom/cm³ nie utraciło zdolności do wzrostu w postaci kolonii (rys. 2).

Podobne wyniki uzyskał w swoich badaniach Keyman (18), który wykazał, że utrzymanie przetrwalników *B. cereus* w stanie aktywacji (bez ponownego usypiania) było możliwe tylko podczas ich przechowywania w stanie zamrożonym w temperaturze -20°C.

Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych badań wybrano obróbkę termiczną zapewniającą najwyższą aktywację przetrwalników. Aby wyeliminować błąd spowodowany ponownym usypianiem spor, analizy mikrobiologiczne



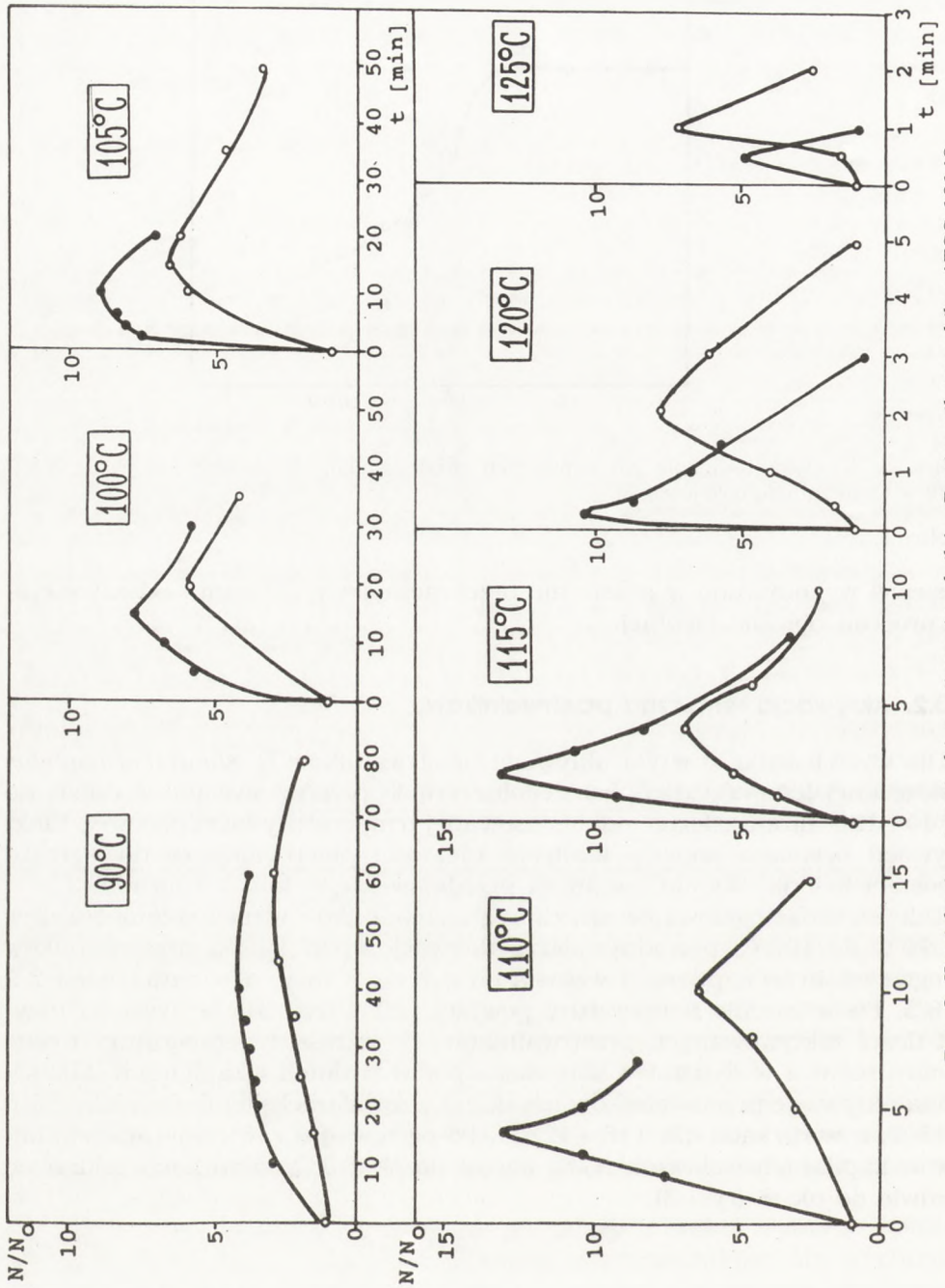
Rys. 2. Kinetyka usypiania zaktywowanych przetrwalników *B. stearothermophilus* ATCC 10149 w temperaturze pokojowej.

(wysiewy) wykonywano w czasie nie przekraczającym 30 minut od zakończenia procesu obróbki cieplnej.

3.2. Aktywacja termiczna przetrwalników

Dla wyznaczenia kinetyki aktywacji przetrwalników *B. stearothermophilus* w określonej temperaturze poszczególne próbki przetrzymywano w czasie do 10, 40 i 120 minut zależnie od zastosowanej temperatury łaźni olejowej. Efekt aktywacji oceniano poprzez kontrolę zdolności przetrwalników do wzrostu w postaci kolonii. Wyniki badań są przedstawione w tab. 1 i na rys. 3.

Tak jak widać ogrzewanie zawiesiny przetrwalników w niskiej temperaturze (od 90°C do 105°C) powoduje słabą aktywację spor. Liczba przetrwalników po ogrzewaniu w kapilarach wzrosła od 4,2 do 9 razy, a w rurkach od 2,9 do 6,5. Podwyższenie temperatury powyżej 110°C wyraźnie wpływa na przyrost ilości zaktywowanych przetrwalników. Ze wzrostem temperatury rośnie również różnica w dynamice aktywacji spor w rurkach i kapilarach. Maksymalną aktywację przetrwalników uzyskano w kapilarach dla temperatury 110 – 115°C, a w rurkach dla 115 – 125°C. Po ogrzewaniu zawiesiny przetrwalników w kapilarach wskaźnik N/N_0 wzrósł do ok. 13, a w rurkach szklanych zaledwie do ok. 8 (rys. 3).



Rys. 3. Kinetyka termicznej aktywacji przetrwalników *B. stearothermophilus* ATCC 10149:

○ rurki.

● kapilary.

TABELA 1
PARAMETRY MAKSYMALNEJ AKTYWACJI CIEPLNEJ PRZETRZALNIKÓW
B. STEAROTHERMOPHILUS W RURKACH I KAPILARACH

Temp.	Rurki				Kapilary			
	Czas	N ₀	N	N/N ₀	Czas	N ₀	N	N/N ₀
°C	min	10 ⁵ j.t.k./cm ³	10 ⁶ j.t.k./cm ³	-	min	10 ⁵ j.t.k./cm ³	10 ⁶ j.t.k./cm ³	-
90	60	8,74	2,51	2,87	40	6,09	2,53	4,15
100	20	8,74	5,23	5,98	15	6,09	4,75	7,80
105	15	10,78	7,03	6,51	10	6,09	5,46	8,97
110	10	8,71	5,60	6,43	4	6,09	7,90	12,98
115	4	7,34	5,10	6,95	2	6,09	7,98	13,10
120	2	6,88	5,38	7,82	0,33	6,09	6,30	10,34
125	1	7,47	5,40	7,23	0,50	6,09	3,03	4,98
132	-	-	-	-	0,67	6,09	1,35	2,22

Wysoki stopień aktywacji spor w kapilarach uzyskiwany w temperaturze 110°C – 115°C wynika zapewne z faktu, że proces aktywacji przetrwalników *B. stearothermophilus* rozpoczyna się w zakresie 100 – 105°C (22,25 – 27), a destrukcja komórek zachodzi dopiero w temperaturze powyżej 110°C. Różnice w uzyskanych efektach dla kapilar i rurek można wyjaśnić nierównomiernością osiągnięcia określonej temperatury w poszczególnych warstwach zawiesiny. Dla rurek czas osiągnięcia określonej temperatury jest znacznie dłuższy niż dla kapilar, co zwiększa efekt letalny i w rezultacie obniża wskaźnik N/N₀.

Obniżenie stopnia aktywacji w kapilarach do wartości 5,0 zanotowanej w temperaturze 125°C i do 2,2 w temperaturze 132°C można przypisać procesowi destrukcji przetrwalników zachodzącemu równolegle z ich aktywacją.

Czas osiągnięcia maksymalnej aktywacji spor był wyraźnie zależny od zastosowanej temperatury. Przy ogrzewaniu w 90°C maksymalna aktywacja była obserwowana po 40 minutach, natomiast w temperaturze powyżej 120°C w czasie krótszym niż 1 minuta.

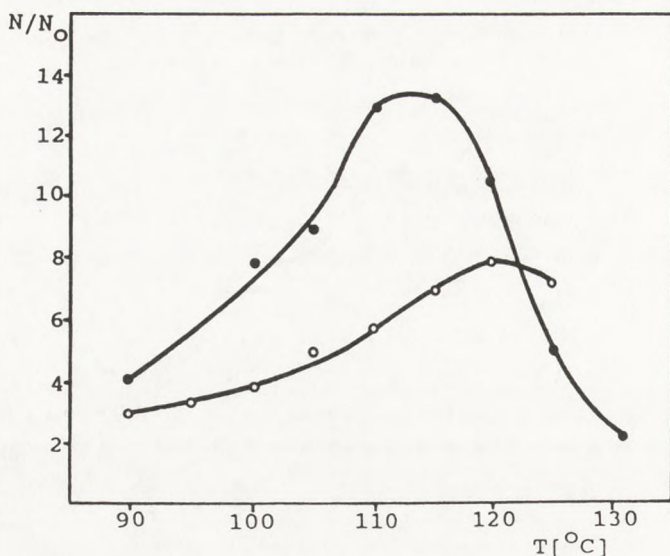
Wpływ temperatury na zalecany czas jej oddziaływania oraz maksymalny stopień aktywacji spor w rurkach i kapilarach przedstawiono na rys. 4 i 5.

Krzywe nakreślone na rys. 5 można opisać funkcją:

$$t = A \exp(B \times T) \quad [1]$$

gdzie:

- t — czas ogrzewania zawiesiny, min,
- T — temperatura łaźni olejowej, °C,
- A, B — stałe w równaniu 1; wartości stałych A i B podano w tab. 2.



Rys. 4. Wpływ temperatury na maksymalny stopień aktywacji (N/N_0) przetrwalników *B. sterothrophilus* ATCC 10149:

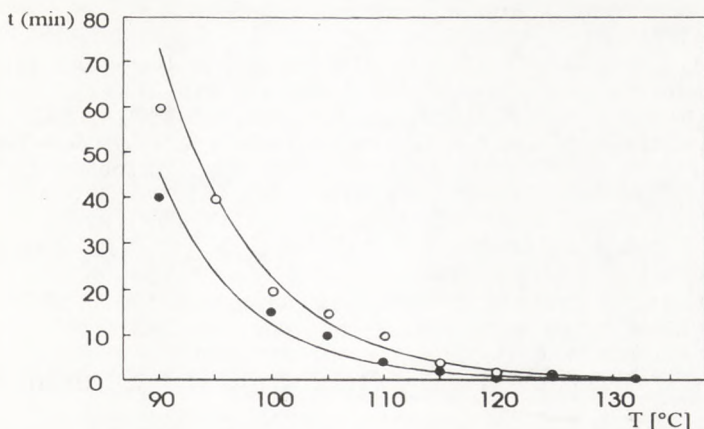
- rurki,
● kapilary.

TABELA 2
WARTOŚCI STAŁYCH A I B W RÓWNANIU [1] DLA RUREK I KAPILAR

Stała	Rurki	Kapilary
A	$2,5 \times 10^6$	$5,5 \times 10^6$
B	-0,116	-0,13

Wyniki uzyskane w kapilarach, szczególnie dla temperatury poniżej 115°C , stanowią wiarygodny materiał badawczy. W tych warunkach czas obróbki cieplnej kapilar ma nieznaczny wpływ na nieliniowość zjawiska aktywacji i destrukcji.

W wysokiej temperaturze trudno było określić dokładny czas maksymalnej aktywacji w warunkach kapilar, ponieważ wg naszych obserwacji oraz danych literaturowych (25,31) wynosił on kilka sekund. Ponadto w tych warunkach procesowi aktywacji bardzo wyraźnie towarzyszy destrukcja przetrwalników i to jest przyczyną niskich wartości wskaźnika N/N_0 . Zatem dla temperatury powyżej 120°C należy zastosować warunki zapewniające bardzo krótkie czasy ogrzewania i chłodzenia. Takie warunki można zrealizować jedynie w instalacji przepływowej. Autorzy są w trakcie wykonywania tych badań, a uzyskane wyniki będą opublikowane w najbliższym czasie.



Rys. 5. Warunki maksymalnej aktywacji przetrwalników *B. stearothermophilus* ATCC 10149:
 ○ rurki,
 ● kapilary.

4. Podsumowanie

Podczas stosowania rutynowych warunków sterylizacji okresowej w temperaturze około 121°C przetrwalniki są aktywowane w czasie znacznie krótszym od czasu sterylizacji. Z tych powodów nie można sterować procesem destrukcji przetrwalników poprzez modyfikację parametrów ich aktywacji. Podwyższenie temperatury do warunków procesu UHT (*ultra high temperature*) znacząco przyspiesza zarówno proces aktywacji jak i destrukcji. Przewidując, że zaktywowane przetrwalniki łatwiej ulegają destrukcji będziemy chcieli wykorzystać ten fakt dla złagodzenia warunków obróbki cieplnej podczas sterylizacji ciągłej produktów i podłoży. Dla realizacji takiego celu niezbędna jest znajomość procesu aktywacji przetrwalników.

W pracy sprawdzono trzy metody aktywacji spor poprzez: wytrząsanie ze szklanymi kuleczkami, oddziaływanie lizozymem oraz obróbkę cieplną w rurkach i kapilarach. Stwierdzono, że największy stopień aktywacji daje obróbka cieplna, szczególnie w kapilarach w temperaturze 110 do 115°C. Przewidujemy, że jeszcze lepszy efekt uzyska się w instalacji UHT.

Praca została wykonana w ramach projektu nr 30097 9101 finansowanego w latach 1991 – 1994 przez Komitet Badań Naukowych.

Literatura

1. Russell A.D., (1971), *Inhibition and Destruction of Microbial Cell*, Ed. Hugo B., Acad. Press, London — New York, 451 – 612.
2. Hashimoto T., Frieben W.R., Conti S.F., (1969), *J. Bacteriol.*, 98, 1011 – 1020.
3. Sommerville H.J., Delafield F.P., Rittenberg S.R., (1970), *J. Bacteriol.*, 101, 551 – 560.

4. Roberts T.A., (1970), *J. Appl. Bacteriol.*, 33, 74 – 94.
5. Gould G.W., (1970), *J. Appl. Bacteriol.*, 33, 34 – 49.
6. Gould G.W., Jones A., Wrighton C., (1968), *J. Appl. Bacteriol.*, 31, 357 – 365.
7. Ando Y., Lida H., (1970), *Jap. J. Microbiol.*, 14, 361 – 370.
8. Vary J.C., Halvorson H.O., (1965), *J. Bacteriol.*, 89, 1340 – 1347.
9. El-Mabsot J.E., Stevenson K.E., (1979), *J. Food Sci.*, 44, 705 – 709.
10. Edwards J.L., Busta F.F., Speck M.L., (1965), *Appl. Microbiol.*, 13, 858 – 864.
11. Busta F.F., Ordal Z.J., (1964), *Appl. Microbiol.*, 12, 106 – 110.
12. Fields M.L., Frank H. P., (1973), *J. Bacteriol.*, 114, 878 – 879.
13. Cassier M., Sebald M., (1969), *Ann. Inst. Pasteur*, 117, 312 – 324.
14. Jaye M., Ordal Z. J., (1966), *Can. J. Microbiol.*, 12, 199 – 201.
15. Keyman A., Halvorson H.O., (1962), *J. Bacteriol.*, 83, 100 – 105.
16. Suzuki Y., Rode L.J., (1969), *J. Bacteriol.*, 98, 238 – 245.
17. Gibbs P.A., (1967), *J. Gen. Microbiol.*, 46, 285 – 291.
18. Keyman A., Evenchik Z., Halvorson H.O., Hastings J.W., (1964), *J. Bacteriol.*, 88, 313 – 318.
19. Hyatt M.T., Holmes P.K., Levinson H.S., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 24, 701 – 704.
20. Yousten A.A., (1975), *Can. J. Microbiol.*, 21, 1192 – 1197.
21. Feehery F.E., Munsey D.T., Rowley D.B., (1978), *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 365 – 370.
22. Shull J.J., Cargo G.T., Ernst R.R., (1963), *Appl. Microbiol.*, 11, 485 – 487.
23. Hashimoto T., Conti S.F., (1971), *J. Bacteriol.*, 105, 361 – 368.
24. Finley N., Fields M.L., (1962), *Appl. Microbiol.*, 10, 231 – 236.
25. Abraham G., Debray E., Candau Y., Piar G., (1990), *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 3073 – 3080.
26. Busta F.F., (1967), *Appl. Microbiol.*, 15, 640 – 645.
27. Perkin A.G., Burton H., Underwood H.M., Davies F.L., (1977), *J. Food Technol.*, 12, 131 – 148.
28. Kim J., Naylor H.B., (1966), *Appl. Microbiol.*, 14, 690 – 691.
29. Iciek J., Stolarek P., Libudzisz Z., Stobińska H., Oltuszek E., (1992), *XXVIII Zjazd P. T. Bioch.*, streszczenie referatów i komunikatów zjazdowych, 223.
30. Gould G.W., Hitchins A.D., (1963), *J. Gen. Microbiol.*, 33, 413 – 423.
31. Davies F.L., Underwood H.M., Perkin A.G., Burton H., (1977), *J. Food Technol.*, 12, 115 – 129.

Activation of spores of *Bacillus stearothermophilus*

Summary

Three methods for the activation of spores of *Bacillus stearothermophilus*: lysozyme treatment, shaking with glass pellets and thermal treatment in tubes and capillaries, were verified. It was found that the highest level of activation was reached during thermal treatment in capillaries at temperature from 110°C to 115°C. However, a better effect is expected in the UHT (ultra high temperature) installation.

Key words:

spores, activation of spores, thermal resistance.

Adres dla korespondencji:

Jan Iciek, Instytut Chemicznej Technologii Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Stefanowskiego 4/10, 90 – 924 Łódź.