

Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na przeżywalność *Aeromonas hydrophila* w serze podpuszczkowym dojrzewającym

JACEK SZCZAWIŃSKI, BOŻENNA STAŃCZAK, JANINA PĘCONEK

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Szczawiński J., Stańczak B., Pęcunek J.

Effect of ultra high pressure on the survival of *Aeromonas hydrophila* in ripened hard cheese

Summary

The aim of the study was to determine the effect of ultra high-pressure treatment on the survival of *A. hydrophila* in sliced, vacuum-packaged, Gouda type hard cheese.

Samples of ripened hard cheese were placed in commercially used polyamide-polyethylene bags, inoculated with *A. hydrophila* and vacuum-sealed. The samples were exposed to high hydrostatic pressure of 100, 200, 300 MPa for 5, 10 and 15 min at an ambient temperature. The number of surviving *A. hydrophila* and Aerobic Plate Counts (APC) were determined. The bacterial counts were transformed into logarithms. D-values (time required for a decimal reduction of *A. hydrophila* at a given pressure) were calculated by means of the linear regression method. It was determined that the application of high hydrostatic pressure could be an effective way to inactivate *A. hydrophila* in ripened cheese. The reduction of *A. hydrophila* in samples of cheese by 6 log cycles can be achieved by using 300 MPa for 14.58 min. *A. hydrophila* is much more sensitive to high pressure than the natural microflora of ripened Gouda-type hard cheese.

Keywords: *Aeromonas hydrophila*, ripened cheese

Aeromonas hydrophila należy do bakterii psychrotrofowych, względnych beztlenowców, rozwijających się w temperaturze od 5°C do 42°C, tolerujących pH od 4,0 do 10,0. W ostatnich latach *A. hydrophila* zaliczono do drobnoustrojów chorobotwórczych, które mogą namnażać się w różnych produktach spożywczych przechowywanych w niskiej temperaturze, przy niewielkim dostępie tlenu (4, 8, 24). Będąc organizmem związanym ze środowiskiem wodnym, *A. hydrophila* stanowi częstą przyczynę zakażenia ryb, krabów i ostryg (1, 3, 4, 16, 17). Izolowano ją również z mleka i przetworów mlecznych (9, 12, 16, 17, 24) oraz z mięsa zwierząt rzeźnych (4, 17, 18, 25). Coraz częstsze stają się zatrucia pokarmowe o charakterze zaburzeń jelitowych (gastroenteritis), wywoływane przez *Aeromonas hydrophila* (3, 8, 9, 24), mające związek z coraz powszechniejszym przechowywaniem żywności w warunkach chłodniczych, stosowaniem opakowań próżniowych oraz tendencją do obniżania poziomu soli kuchennej, jak również azotanów i azotynów w przetworach mięsnych. Dodatkowo występowaniu zachorowań sprzyja spożywanie żywności minimalnie przetworzonej, niekiedy surowej lub niedostatecznie ogrzewanej (4, 5, 27). Autorzy nielicznych publikacji na temat jakości mikrobiologicznej serów podpuszczkowych dojrzewających produkowanych w Pol-

sce i dostępnych w sprzedaży detalicznej nie stwierdzali występowania w nich *A. hydrophila* (7). Do wtórnych zakażeń *A. hydrophila* sera podpuszczkowego dojrzewającego może jednak dochodzić po zabiegu prawidłowo przeprowadzonej pasteryzacji mleka użytego do produkcji serów, najczęściej podczas ich porcjowania, plasterkowania lub pakowania.

Niekonwencjonalną metodą utrwalania żywności, opartą na nietermicznym niszczeniu drobnoustrojów, jest stosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego, określanego w piśmiennictwie angielskojęzycznym jako UHP (Ultra High Pressure). Metoda ta została zastosowana w skali przemysłowej dopiero w 1991 r. w Japonii. W ostatnich latach w wielu krajach, również w Polsce, podejmowane są badania nad coraz szerszym wykorzystaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w przemyśle spożywczym, w celu poprawy jakości i trwałości przetworów mięsnych, mlecznych, rybnych, owocowych i warzywnych (10, 11, 13-15, 18, 23, 25). Metoda ta może być, między innymi, przydatna do dekontaminacji produktów w hermetycznych, elastycznych opakowaniach, zakażonych drobnoustrojami podczas zabiegów i operacji technologicznych przeprowadzanych po obróbce termicznej, np. porcjowania lub plasterkowania (23). W badaniach własnych stwierdzono, że zastosowanie wysokiego ciśnienia

hydrostatycznego przy parametrach niezbędnych do redukcji o 6 cykli logarytmicznych *L. monocytogenes* nie wywoływało występowania zmian organoleptycznych w próbkach peklowanej i pasteryzowanej szynki oraz serów dojrzewających pakowanych próżniowo (21, 22).

Celem badań było określenie możliwości wykorzystania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego do inaktywacji *Aeromonas hydrophila* w serze podpuszczkowym dojrzewającym typu gouda, plasterkowanym, a następnie pakowanym próżniowo.

Materiał i metody

Materiałem do badań był ser podpuszczkowy dojrzewający, twardy – typu gouda, dostępny w sprzedaży detalicznej. Do zakażenia próbek sera użyto mieszaniny trzech szczepów *A. hydrophila* (PIW nr 98, PIS nr 98 i IS nr 95), pochodzących z kolekcji Państwowego Instytutu Weterynarii w Puławach. *Inoculum* przygotowywano z 24-godzinnej hodowli w bulionie TSB (Oxoid) inkubowanej w temp. 30°C. Próbkę plasterkowanego sera, o masie 10 g, umieszczano w torebkach z folii poliamidowo-polietylenowej (PA/PE), przeznaczonych do przechowywania żywności, a następnie zakażano *A. hydrophila* w liczbie zapewniającej koncentrację bakterii na poziomie 10^6 komórek/g. Przygotowane próbki sera zamykano próżniowo, stosując urządzenie odpowietrzające Hencovac Vacuum Verpackungs Maschinen 1000. Kontrolne i zakażone *A. hydrophila* próbki sera, po przechowywaniu przez 24 godz. w temp. 4°C, dostarczano do Centrum Badań Wysokociśnieniowych Polskiej Akademii Nauk, gdzie poddawano je działaniu wysokich ciśnień w specjalnie skonstruowanym do badania żywności stanowisku wysokociśnieniowym. Próbkę sera poddawano ciśnieniu: 100, 200 i 300 MPa (1000, 2000, 3000 atm.), w czasie 5, 10 i 15 minut, w temperaturze otoczenia. Po ok. 18 godz. przechowywania w temp. 4°C, w próbkach kontrolnych i zakażonych poddanych działaniu wysokiego ciśnienia hydrostatycznego oznaczano liczbę *A. hydrophila* oraz ogólną liczbę drobnoustrojów tlenowych (łącznie określenie liczebności *A. hydrophila* oraz mikroflory towarzyszącej). W celu określenia liczby *A. hydrophila* stosowano pożywkę selektywną Ryan (Oxoid). Ogólną liczbę drobnoustrojów tlenowych oznaczano zgodnie z Polską Normą PN-93A-86034/04 (19), używając pożywki agarowej z mlekiem odtłuszczonym. Wszystkie posiewy inkubowano w temp. 30°C przez 72 godziny. Doświadczenie przeprowadzono w czterech powtórzeniach.

Wyniki badań poddano transformacji logarytmicznej oraz opracowaniu statystycznemu metodą analizy wariancji. Wartość D, która oznacza czas (w minutach) potrzebny do dziesięciokrotnej redukcji liczby bakterii, czyli redukcji o jeden cykl logarytmiczny, przy danym ciśnieniu hydrostatycznym, obliczano metodą regresji liniowej.

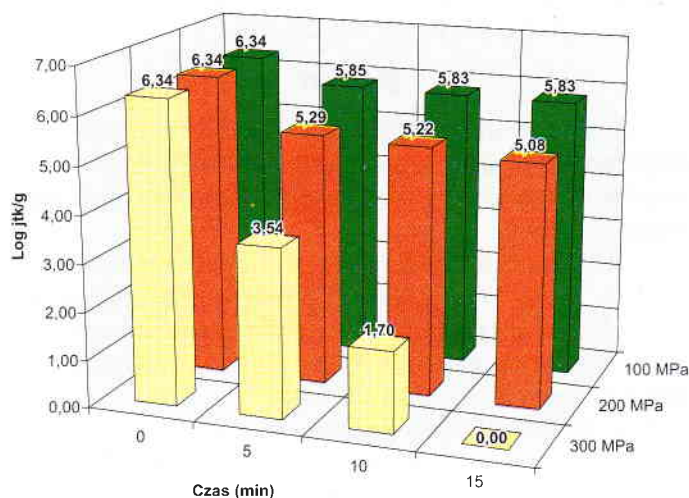
Wyniki i omówienie

Wyniki badań przedstawione na ryc. 1 wskazują, że wysokie ciśnienie hydrostatyczne powodowało redukcję liczby *A. hydrophila* w próbkach sera gouda, wzrastającą wraz z wysokością ciśnienia i czasem jego od-

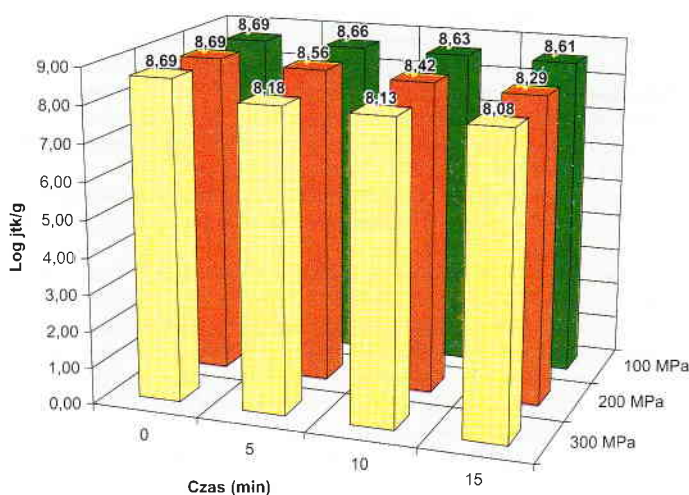
Tab. 1. Wartość D – czas niezbędny do dziesięciokrotnej redukcji liczby *A. hydrophila* przy danym ciśnieniu hydrostatycznym

Ciśnienie	Współczynnik regresji liniowej	Wartość D (minuty)	Współczynnik korelacji
100 MPa	-0,0312	32,05	-0,644
200 MPa	-0,0771	12,97	-0,743
300 MPa	-0,4111	2,43	-0,982

działywania. Znaczną redukcję *A. hydrophila* obserwowano przy działaniu ciśnienia 300 MPa. Redukcja ta wynosiła ok. 3 cykli logarytmicznych po 5 min. i o ok. 5 cykli logarytmicznych po 10 min. Ciśnienie 300 MPa działające w czasie 15 minut było wystarczające do całkowitej inaktywacji *A. hydrophila* w próbkach sera (redukcja o ok. 6 cykli logarytmicznych). Analiza wariancji wykazała, że zarówno wysokość ciśnienia hydrostatycznego, jak i czas jego działania wywierały statystycznie istotny wpływ na liczbę bakterii ($p < 0,01$).



Ryc. 1. Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na liczbę *A. hydrophila* w serze dojrzewającym typu gouda



Ryc. 2. Wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na ogólną liczbę drobnoustrojów tlenowych w serze dojrzewającym typu gouda

Wartości D (czas w minutach niezbędny do dziesięciokrotnej redukcji *A. hydrophila* przy danym ciśnieniu wynosiły: D_{100MPa} – 32,05 min., D_{200MPa} – 12,97 min., D_{300MPa} – 2,43 min. (tab. 1).

Przedstawione na ryc. 2 wyniki wskazują, że ani wielkość, ani czas działania wysokim ciśnieniem hydrostatycznym nie wywierały wyraźnego wpływu na ogólną liczbę drobnoustrojów w badanych próbkach sera dojrzewającego. Ogólna liczba drobnoustrojów tlenowych towarzyszących *A. hydrophila* w badanym serze po oddziaływaniu ciśnienia wysokości 300 MPa przez 15 min. pozostawała na poziomie ok. 10⁸ jtk/g (zarówno w próbce kontrolnej, jak i poddanej ciśnieniu).

Uzyskane wyniki świadczą o dużej wrażliwości *A. hydrophila* na działanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego w porównaniu z drobnoustrojami tlenowymi, stanowiącymi typową mikroflorę sera podpuszczkowego dojrzewającego. Na podstawie porównania uzyskanych wyników z danymi z piśmiennictwa można stwierdzić, że *A. hydrophila* należy do patogenów najbardziej wrażliwych na wysokie ciśnienie hydrostatyczne (2, 6, 20, 22, 25, 26).

Wnioski

1. Zastosowanie wysokiego ciśnienia hydrostatycznego może być skutecznym sposobem eliminacji *A. hydrophila* z sera podpuszczkowego dojrzewającego typu gouda.

2. Redukcję *A. hydrophila* o 6 cykli logarytmicznych w serze typu gouda zapakowanym próżniowo w torebki z folii poliamidowo-polietylenowej uzyskać można poprzez zastosowanie ciśnienia w wysokości 300 MPa przez okres 14,58 min.

3. *A. hydrophila* jest znacznie bardziej wrażliwa na wysokie ciśnienie hydrostatyczne niż mikroflora naturalnie występująca w serze typu gouda.

Piśmiennictwo

1. Archer D. L., Kvenberg J. E.: Regulatory significance of *Aeromonas* in foods. J. Fd Safety. 1988, 9, 53-58.
2. Arroyo G., Sanz P. D., Prestamo G.: Effect of high pressure on the reduction of microbial population in vegetables. J. Appl. Microbiol. 1997, 82, 735-742.
3. Buchanan R. L., Palumbo S. A.: *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species. A review. J. Fd Safety. 1985, 7, 15-29.
4. Beuchat L. R.: Behavior of *Aeromonas* species at refrigeration temperatures. Int. J. Fd Microbiol. 1991, 13, 217-224.
5. Czapski J., Limanówka-Jacygrad D.: Nietermiczne metody przedłużania trwałości żywności o małym stopniu przetworzenia. Przemysł Spoż. 1996, 50, 27-30.
6. Fonberg-Broczek M., Arabas J., Porowski S., Podlasin S., Szczepek J., Windyga B., Ścieżyńska H., Górecka K., Grochowska A., Karłowski K., Jurczak J., Satański P.: The effect of ultra high pressure on vegetative microorganisms and spores of chosen bacteria and moulds. Proceedings of the first main meeting. Vol. 4: High pressure. Process Optimization and Minimal Processing of Foods. Copernicus Programme. Contract CIPA – CT 94 – 0195, Porto, November 12th 1996, s. 46-50.
7. Kaźmierczak A., Molska I., Nowosielska R.: Jakość mikrobiologiczna serów podpuszczkowych dojrzewających. Przemysł Spoż. 1999, 53, 18-20.
8. Kirov S. M.: The public health significance of *Aeromonas* spp. in foods. Int. J. Fd Microbiol. 1993, 20, 179-198.
9. Kirov S. M., Hui D. S., Hayward L. J.: Milk as a potential source of *Aeromonas* gastrointestinal infection. J. Fd Prot. 1993, 56, 306-312.

10. Kloczko I., Chudoba T.: Zastosowanie wysokich ciśnień hydrostatycznych do utrwalania przetworów rybnych. Przemysł Spoż. 1997, 51, 46-48.
11. Kloczko I., Radomski M.: Utrwalanie owoców, warzyw i soków za pomocą wysokich ciśnień hydrostatycznych. Przemysł Spoż. 1996, 50, 25-30.
12. Klossowska A., Malinowski E.: Drobnoustroje patogeniczne dla człowieka w mleku zbiorczym. Medycyna Wet. 2001, 57, 28-31.
13. Kolakowski P., Reys A., Babuchowski A.: Przydatność wysokich ciśnień w utrwalaniu i przetwarzaniu żywności. Przemysł Spoż. 1994, 48, 108-112.
14. Knorr D.: Effects of high hydrostatic pressure processes on food safety and quality. Fd Technol. 1993, 47, 156-161.
15. Lewicki P. P.: Zastosowanie wysokich ciśnień w technologii żywności. Przemysł Spoż. 1992, 46, 280-282.
16. Palumbo S. A., Maxino F., Williams A. W., Buchanan R. L., Thayer D. W.: Starch ampicillin agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*. Appl. Environ. Microbiol. 1985, 50, 1027-1030.
17. Palumbo S. A., Bencivengo M. M., del Corral F., Williams A. W., Buchanan R. L.: Characterization of *A. hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. J. Clin. Microbiol. 1989, 27, 854-856.
18. Pietrzak D., Mroczek J.: Zastosowanie wysokich ciśnień w przemyśle mięsnym. Przemysł Spoż. 2002, 56, 38-41.
19. Polska Norma. PN-93/A-86034-04. Mleko i przetwory mleczarskie. Badania mikrobiologiczne. Ogólna liczba drobnoustrojów – oznaczanie metodą płytkową w temperaturze 30°C.
20. Rönnner U.: Food preservation by ultra high pressure, [w:] Food Preservation By Combined Processes. (Wyd.) Leistner L., Gorris L. G. M., Final Report FLAIR Concerted Action No. 7, Subgroup B. EUR 15776 EN, 1994, 31-35.
21. Szczawiński J., Pęcunek J., Fonberg-Broczek M., Arabas J., Szczawińska M.: Możliwość zastosowania wysokich ciśnień do inaktywacji *L. monocytogenes* w mięsie i przetworach mięsnych. Magazyn Wet. 1995, 4, 516-519.
22. Szczawiński J., Szczawińska M., Stańczak B., Fonberg-Broczek M., Arabas J., Szczepek J.: Effect of high pressure on survival of *L. monocytogenes* in ripened, sliced cheeses at ambient temperature. High Pressure Research in the Biosciences and Biotechnology. K. Heremans (wyd.) Leuven University Press, Leuven, Belgium 1997, 295-298.
23. Szczawiński J., Kubik A.: Perspektywy zastosowania wysokiego ciśnienia hydrostatycznego do poprawy jakości higienicznej i trwałości żywności pochodzenia zwierzęcego. Magazyn Wet. 1998, 7, 120-122.
24. Trojanowska K.: Zatrucia pokarmowe – nowe patogeny żywności. Mat. Konf. Nauk. PTTŻ Oddział Warszawski – Bezpieczeństwo mikrobiologiczne produkcji żywności. Warszawa, 18-19 listopada 1997, s. 11-19.
25. Trujillo A. J.: Applications of high hydrostatic pressure on milk and dairy products. High Pressure Res. 2002, 22, 619-626.
26. Windyga B., Ścieżyńska H., Górecka K., Grochowska A., Fonberg-Broczek M., Karłowski K., Arabas J., Szczepek J., Satański P., Porowski S.: Efekt działania wysokiego ciśnienia (UHP) na drobnoustroje występujące w żywności. Mat. Kongresu Polskiej Gospodarki Żywnościowej i Nauki o Żywnieniu Człowieka, Warszawa 2000, s. 222.
27. Zalewski S.: Zastosowanie technologii „sous vide” do pakowania chłodzonych potraw gotowych do spożycia. Roczniki PZH 1999, 50, 163-169.

Adres autora: prof. dr hab. Jacek Szczawiński, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: szczawinski@alpha.sggw.waw.pl

PEDERSEN K., JØRGENSEN J. C., DIETZ H. H., ANDERSEN T. H.: Brodawkowe zapalenie wsierdzia spowodowane przez *Streptococcus bovis* u norki (*Mustela vison*). Verrucous endocarditis associated with *Streptococcus bovis* in mink (*Mustela vison*). Vet. Rec. 153, 264-268, 2003 (9)

W okresie 1998-2001 wystąpiło masowe padanie nerek na brodawkowe zapalenie wsierdzia. Posiewy bakteriologiczne wykonano z serca, śledziony, wątroby i płuc. Do identyfikacji zarazków zastosowano test API 20 Strep, API 32 Strep. Rapid i API 30CH. Gram-dodatnie ziarniaki wyosobniono we wsierdziach wszystkich padłych zwierząt. Rzadziej izolowano je z narządów wewnętrznych. Większość izolatów zidentyfikowano jako *Streptococcus bovis*. Wszystkie izolaty były wrażliwe na ampicylinę, linkospektin, opome na enrofloksacynę, sulfonamidy i TMP. Część izolatów była wrażliwa na neomycynę, penicylinę, spiramycynę, tetracykliny. Próby wywołania choroby u nerek po donosowym lub podskórnym zakażeniu dawką *S. bovis* wynoszącą 10⁷ jtk lub 2,5×10⁷ jtk dały wynik ujemny.