

Unieszkodliwianie kwasem cytrynowym pałeczek *Salmonella* w podłożach mikrobiologicznych i tuskach indyjskich

ANITA MIKOŁAJCZYK

Zakład Neurobiologii i Anatomii Człowieka Wydziału Nauk Medycznych UWM, ul. Warszawska 30, 10-082 Olsztyn

Mikołajczyk A.

Elimination of *Salmonella* spp. in bacteriological media and in turkey carcasses with citric acid

Summary

The aim of this study was to determine the influence of citric acid in different concentrations on *Salmonella* spp. in microbiological media and in turkey carcasses. The influence of 0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.05%, 0.1%, 0.25%, 0.5%, 1%, 1.5%, 2.0% citric acid concentrations in nutrient agar on *Salmonella* Enteritidis no. 33/66, *Salmonella* Anatum no. 30/93, *Salmonella* Typhimurium no. 227/84, was studied. Citric acid in 0.1% concentration agar media totally inhibits the growth of all *Salmonella* strains studied. At the concentration of 0.05% the bacteria count of *S. Anatum*, compared with the control, decreased by 2 logarithmic cycles and the count of *S. Enteritidis*, and *S. Typhimurium* by 1 logarithmic cycles only. Additional investigations were carried out on 150 turkey breast samples bought from poultry plants. The samples were contaminated with *Salmonella* Enteritidis no. 33/66. Afterwards, each sample was moved to 1%, and 2% citric acid solution for a period of 15 minutes. The results obtained after immersing turkey carcass elements in citric acid indicate that detecting *Salmonella* spp. in the samples was dependent on the inoculum of these bacteria on the poultry carcass surface. *Salmonella* spp. were not found when the surface of an element of a turkey carcass was contaminated with 10^1 *Salmonella* spp. colony-forming-units (cfu) and immersed for 15 minutes in 1% and 2% citric acid aqueous solution, while at a 10^2 cfu contamination, *Salmonella* spp. was detected in a smaller number of samples compared with the control samples. The inhibiting influence of citric acid on *Salmonella* spp. in bacterial substrates can also occur on poultry carcasses. The unfavourable action of this compound on *Salmonella* bacteria was stronger in bacterial media than in poultry carcasses.

Keywords: *Salmonella*, citric acid, turkey carcasses, microbiological media

Zwalczanie pałeczek *Salmonella* w środowisku stanowi trudny problemem dla osób zajmujących się produkcją zwierzęcą i żywności. Opracowano i przetestowano wiele metod dotyczących m.in.: uboju, immunizacji i stosowania substancji antybakteryjnych. Żadna z tych metod nie gwarantowała pełnego sukcesu, ale wszystkie poprawiały warunki higieniczne i bezpieczeństwo zdrowotne żywności.

Unieszkodliwianie pałeczek *Salmonella* prowadzane było w rozmaitych modelach doświadczalnych, z użyciem wielu związków chemicznych, m.in. chlorku heksadecylopirydyniowego (1, 13, 20), ortofosforanu sodu (20, 21), kwasów organicznych (6, 11, 17-19), wody utlenionej i dwuwęglanu sodu (15). Nie wszystkie z tych metod okazały się skuteczne. Środek określa się jako skuteczny, jeśli pod jego wpływem następuje redukcja określonych drobnoustrojów o 2 log (8).

Możliwość stosowania dodatkowych substancji w przetwórstwie żywności jest ograniczona na skutek

negatywnego oddziaływania ich na ludzki organizm oraz trudności w rozpuszczalności i możliwości bezpośredniego zastosowania. Wzrost świadomości konsumentów odnośnie do jakości i zdrowotności żywności zmusza do stosowania w technologii żywności jedynie takich środków chemicznych, które naturalnie występują w przyrodzie.

Wśród preferowanych dodatków niszczących florę bakteryjną na tuskach, sporą grupę stanowią kwasy organiczne i ich sole. Kwasy organiczne powszechnie uważane są za bezpieczne. W polskim przemyśle spożywczym dopuszczone jest stosowanie następujących kwasów organicznych: askorbinowego, cytrynowego, mlekowego, octowego, winowego oraz ich soli (14). Kwas cytrynowy używany jest jako regulator kwasowości i przeciwutleniacz. Można go uzyskać z owoców cytrusowych, ale zdecydowanie częstszą i tańszą metodą jego pozyskania jest fermentacja utleniająca. W przebiegu tej fermentacji produkt rozpadu glukozy

ulega częściowemu utlenieniu kosztem tlenu atmosferycznego do kwasu cytrynowego. Powszechnie kwas cytrynowy uznaje się za bezpieczny i naturalnie występujący w środowisku. Stanowi on część integralną metabolizmu komórkowego jako metabolit cyklu Krebsa. Maksymalna dawka kwasu cytrynowego dodawanego do żywności określana jest jako *quantum satis* (14). Nie wyznaczając żadnego poziomu maksymalnego dla zastosowania tego kwasu w produkcji żywności (w tym również w produktach przeznaczonych dla niemowląt i małych dzieci), kwas cytrynowy jako dodatek stosuje się zgodnie z dobrą praktyką wytwarzania, w dawkach nieprzekraczających dawki koniecznej do uzyskania zamierzonego celu, pod warunkiem niewprowadzania w błąd konsumenta. Stąd tak często, na wielu produktach spożywczych używana jest pełna nazwa „kwas cytrynowy” lub widnieje napis E 330, będący oznaczeniem wymienionego kwasu zgodnym z numerycznym systemem oznaczeń Unii Europejskiej.

Mając na uwadze powszechność używania kwasu cytrynowego w przemyśle spożywczym oraz złożoność problemu poszukiwania metod unieszkodliwiania pałeczek *Salmonella* na linii ubojowej i w trakcie obróbki mięsa drobiowego, postanowiono określić wpływ różnych stężeń kwasu cytrynowego na przeżywalność pałeczek *Salmonella* w podłożach mikrobiologicznych i na tuszkach drobiowych.

Materiał i metody

Badano wpływ stężeń – 1%, 2% kwasu cytrynowego w agarze odżywczym na: *Salmonella* Enteritidis nr 33/66, *Salmonella* Anatum nr 30/93, *Salmonella* Typhimurium nr 227/84, otrzymanych z Muzeum Szczepów Bakteryjnych Państwowego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach.

Kwas cytrynowy wyjaławiano przy użyciu filtra Millipor (Millex 9P, 022μ, Bedford), a następnie dodawano go w odpowiednich stężeniach do gorącego podłoża.

Badane szczepy wsiewano do 9 ml bulionu odżywczego i po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C uzyskiwano hodowlę wyjściową do dalszych badań. Następnie wykonywano z tej hodowli dziesięciokrotne rozcieńczenia i każdy szczep z każdego rozcieńczenia wysiewano: na agar odżywczy bez substancji chemicznych (kontrola) oraz na agar odżywczy z dodatkiem różnych ilości kwasu cytrynowego. Stosowano posiew powierzchniowy. Płytki inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 do 48 godzin. Badania dla każdego szczepu powtórzono dziesięciokrotnie i obliczono średnie ze wszystkich badań.

Ponadto badania przeprowadzono na 150 próbkach z piersi indyckich zakupionych w zakładach drobiarskich. Po dostarczeniu do laboratorium przetrzymywano je w chłodni w temperaturze 4°C, a następnie przygotowywano z nich 25 g próbki do dalszych badań. W badaniach dotyczących sprawdzenia naturalnej obecności pałeczek *Salmonella* przeprowadzanych na próbkach wybieranych losowo (w ilości 20% wszystkich próbek pobieranych do badań z każdej, jednej zakupionej piersi) nie stwierdzano pałeczek *Salmonella*. Pozostałe próbki były celowo konta-

minowane. Do zakażenia próbek użyto szczepu *Salmonella* Enteritidis nr 33/66. Szczep najpierw wsiewano do bulionu odżywczego i inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny, a następnie na każdą próbkę наносzono po 0,05 ml 24-godzinnej hodowli bulionowej *S. Enteritidis* rozcieńczonej od 10⁻⁴ do 10⁻⁸. Określano wyjściowe *inoculum* prób kontrolnych w każdej serii badań. Zawiesinę bakteryjną rozprawdzano delikatnie, specjalną, szeroką eżą, możliwie na jak największej powierzchni próbki. Po naniesieniu bakterii wszystkie próbki przetrzymywano przez 20 minut w lodówce w temperaturze 4°C, w celu całkowitego wysuszenia zawiesiny. Następnie każdą próbkę przenoszono do jałowych zlewek z 250 ml roztworu 1% i 2% kwasu cytrynowego na okres 15 minut. Z metod zalecanych do wykrywania pałeczek *Salmonella* z tuszek drobiowych, podrobów i produktów drobiarskich zastosowano metodę podaną w Europejskiej i Polskiej Normie (7, 12).

Po 15 minutach działania roztworów kwasu cytrynowego, każdą próbkę przenoszono do jałowej zlewki i zalewano 225 ml zbuforowanej wody peptonowej (pH 7,2), po czym inkubowano w temperaturze 37°C przez 20 godzin. Namnażanie selektywne wykonywano na podłożu seleninowo-cystynowym (SC, 0 687-17-1, Difco Laboratories Detroit MI, USA) i podłożu Müller-Kauffmana (MK) oraz w podłożu Rappaport-Vassiliadis (RV, CM 669, Oxoid) a przesiewy na agarze z zielenią brylantową i czerwienią fenolową (BGA, CM 329, Oxoid) oraz na agarze bizmutowo-siarczynowym (BSA, 00 73-01-1, Difco Laboratories). Kolonie typowe lub podejrzane o przynależność do rodzaju *Salmonella* były identyfikowane serologicznie i biochemicznie. Do określenia charakterystycznych cech biochemicznych pałeczek *Salmonella* użyto testu API 20 E. Typy serologiczne określano w oparciu o zmodyfikowany schemat Kauffmanna-White'a, zaproponowany przez Popoffa i Le Minora, z zastosowaniem surowic wyprodukowanych w Krajowym Ośrodku *Salmonella*.

Kontrolę stanowiły próbki z piersi indyków zanieczyszczone pałeczkami *Salmonella*, które zanurzano w wodzie jałowej przez 15 minut. Każdy wariant doświadczenia powtórzono dziesięciokrotnie.

Wyniki opracowano statystycznie, posługując się testem t-Studenta oraz analizą korelacji. Do weryfikacji hipotez statystycznych przyjęto poziom istotności p = 0,10. Analiza korelacji została przeprowadzona na liczbach logarytmowanych.

Wyniki i omówienie

Wpływ kwasu cytrynowego na pałeczki *Salmonella* w podłożach mikrobiologicznych przedstawiono w tab. 1 i na ryc. 1.

Dane zawarte w tab. 1 wskazują, że średnia liczba bakterii w próbkach kontrolnych bez dodatku kwasu cytrynowego wynosiła dla *S. Enteritidis* 1,8 × 10⁸, *S. Anatum* 1,1 × 10⁸, *S. Typhimurium* 2,0 × 10⁸. Kwas cytrynowy w podłożu agarowym o stężeniu 0,1% całkowicie hamował wzrost wszystkich badanych szczepów *Salmonella*. Przy stężeniu 0,05% liczba bakterii w porównaniu z kontrolą zmniejszyła się o 2 cykle logarytmiczne w przypadku *S. Anatum* i o 1 cykl logarytmiczny w przypadku *S. Enteritidis* i *S. Typhimu-*

Tab. 1. Wzrost pałeczek *Salmonella* na podłożu agarowym z dodatkiem kwasu cytrynowego (n = 10)

<i>Salmonella</i>	Liczba kolonii (jtk/ml)										
	Stężenie kwasu cytrynowego (%)										
	0,00	0,01	0,02	0,03	0,05	0,1	0,25	0,5	1	1,5	2
Anatum	$1,1 \times 10^8$	$4,6 \times 10^7$	$7,0 \times 10^7$	$5,3 \times 10^7$	$7,0 \times 10^6$	0	0	0	0	0	0
Enteritidis	$1,8 \times 10^8$	$1,9 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$4,0 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0
Typhimurium	$2,0 \times 10^8$	$2,0 \times 10^8$	$2,3 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$	$7,2 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0

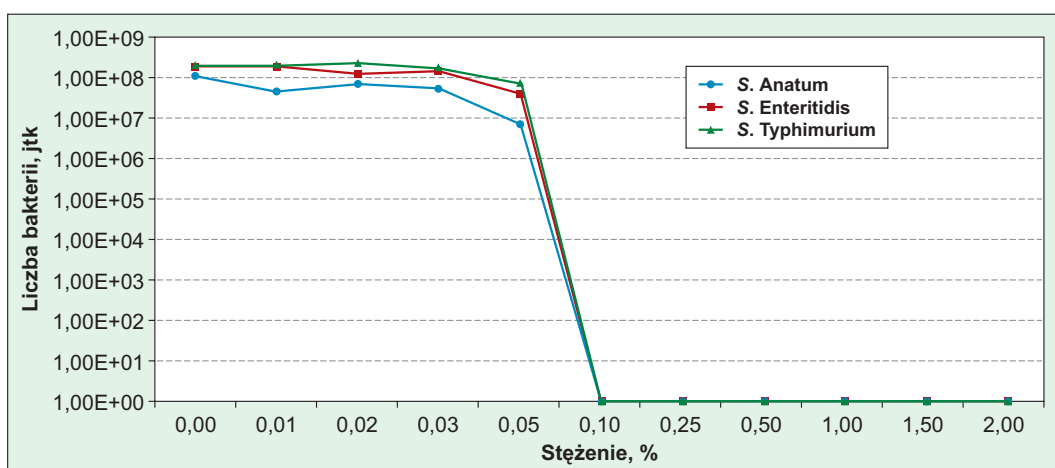
rium. Liczba *S. Anatum* w porównaniu z kontrolą przy stężeniu kwasu cytrynowego 0,03%, 0,02%, 0,01% zmniejszyła się o jeden cykl logarytmiczny. Natomiast *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* rosły w obecności 0,03%, 0,02% i 0,01% kwasu cytrynowego w liczbach mieszczących się w tym samym przedziale logarytmicznym.

Wpływ kwasu cytrynowego na *Salmonella* Enteritidis na elementach tuszek indyjskich przedstawiono w tab. 2.

Wyniki badań uzyskane po zanurzeniu elementów tuszek indyjskich w kwasie cytrynowym wykazały, że wykrycie pałeczek *Salmonella* z próbek zależy od *inoculum* tych bakterii na powierzchni tuszki drobiowej. Przy kontaminacji 10 jtk pałeczek *Salmonella* na powierzchni elementu tuszki indyjskiej i zanurzeniu jej na 15 minut w wodnych roztworach 1% i 2% kwasu cytrynowego nie stwierdzono pałeczek *Salmonella*.

Przy kontaminacji 10² jtk pałeczek *Salmonella* Enteritidis na powierzchni części tuszki indyjskiej i zanurzeniu jej na 15 minut w wodnym roztworze 1% lub 2% kwasu cytrynowego powodowały zmniejszanie się liczby próbek, w których wykryto pałeczki *Salmonella*, w stosunku do liczby próbek kontrolnych. Przy 10³ jtk na powierzchni tuszki indyjskiej zanurzonej w 1% i 2% kwasie cytrynowym nie stwierdzono ich wpływu na wykrywalność pałeczek *Salmonella*.

Dotychczasowe badania (5, 10, 18) nad eliminowaniem pałeczek *Salmonella* pod wpływem czynników chemicznych na tuszkach drobiowych miały na celu w pierwszym etapie zniszczenie mikroflory towarzyszącej, np. poprzez promieniowanie ultrafioletowe, a następnie zanieczyszczenie ich pałeczkami *Salmonella*. Dzięki temu możliwe było w dalszym etapie stosowanie nieselektywnych pożywek, które pozwalały na wykrycie uszkodzonych pałeczek *Salmonella* pod wpływem substancji chemicznych (2). Wszystkie wymienione badania wskazują, że stosowany w nich układ doświadczalny daleko odbiegał od rzeczywistych spo-

Ryc. 1. Wzrost pałeczek *Salmonella* na podłożu agarowym z dodatkiem różnych ilości kwasu cytrynowegoTab. 2. Liczba próbek z elementów tuszek indyjskich, poddanych działaniu kwasu cytrynowego, na których stwierdzono pałeczki *Salmonella* Enteritidis (n = 10)

Stężenie (%)	Czas działania (minuty)	<i>Salmonella</i> Enteritidis nr 33/66				
		rozcieńczenia (inoculum)				
		4	5	6	7	8
Liczba dodatnich wyników						
0	15	10	10	10	10	0
1	15	10	10	6	0	0
2	15	10	10	5	0	0

sobów naturalnego zanieczyszczenia tuszek pałeczkami *Salmonella* oraz warunków ich przechowywania. W badaniach własnych określono wpływ 1% i 2% kwasu cytrynowego na pałeczki *Salmonella* w warunkach najbardziej zbliżonych do naturalnych, czyli na tuszkach drobiowych pochodzących bezpośrednio z zakładów drobiarskich, nie poddawanych w laboratorium jakimkolwiek procesom zmierzającym do zlikwidowania mikroflory towarzyszącej. Na podstawie wyników uzyskanych w badaniach własnych stwierdzono, że hamujący wpływ kwasu cytrynowego na pałeczki *Salmonella* w podłożach bakteryjnych może mieć również miejsce na tuszkach drobiowych. Niekorzystne działanie tych związków w stosunku do bakterii *Salmonella* było silniejsze w podłożach bakteryjnych niż w tuszkach drobiowych. W dostępnym piśmiennictwie brak jest szczegółowych danych o wpływie kwasu cytrynowego na różną wyjściową liczbę pa-

łeczek *Salmonella* na tuszkach indyczych. Z danych, jakie uzyskano z badań własnych wynika, że skuteczność przeciwbakteryjnego działania kwasu cytrynowego jest zróżnicowana i zależy od wyjściowej liczby pałeczek *Salmonella* na tuszkach indyczych.

Mechanizm unieszkodliwiającego działania kwasu cytrynowego na pałeczki *Salmonella* związany jest z obecnością zdysocjowanych cząstek oraz z niskim pH kwasów (2). Wielu autorów (3, 4, 16, 18) wskazuje, że im wyższe jest stężenie kwasów organicznych, tym większa jest ich efektywność w stosunku do pałeczek *Salmonella*. W przypadku wysokiego stężenia kwasów w roztworach unieszkodliwiających pojawiają się w tuszkach zmiany organoleptyczne (9). Obserwowano zmiany, takie jak bladeść skóry oraz nieprzyjemny zapach przy stężeniu testowanych kwasów równym bądź większym niż 2%.

Z przeprowadzonych badań własnych wynika, że istnieje możliwość unieszkodliwiania pałeczek *Salmonella* na tuszkach drobiowych poprzez naniesienie na jego powierzchnię 1% kwasu cytrynowego. Ta substancja chemiczna powoduje zahamowanie namnażania się pałeczek *Salmonella* i nie powoduje zmiany zapachu i barwy mięsa. Zmierzając do ograniczenia niebezpieczeństwa spowodowanego spożyciem żywności zanieczyszczonej pałeczkami *Salmonella*, spośród substancji dodatkowych potencjalnie możliwych do dodawania do wody zraszającej tuszki drobiowe podczas procesu schładzania powietrzem, należy rozważyć także działanie kwasu cytrynowego.

Piśmiennictwo

1. Breen P. J., Salari H., Compadre C. M.: Elimination of Salmonella contamination from poultry tissues by cetylpyridinium chloride solutions. J. Food Prot. 1997, 60, 1019-1021.
2. Conner D. E., Bilgili S. F.: Skin attachment model for improved laboratory evaluation of potential carcass disinfectants for their efficacy against Salmonella attached to broiler skin. J. Food Prot. 1994, 57, 684-688.
3. Dickson J. S.: Acetic acid action on beef tissue surfaces contaminated with Salmonella typhimurium. J. Food Sci. 1992, 57, 297-301.
4. Dickson J. S., Anderson M. E.: Microbiological decontamination of food animal carcasses by washing and sanitizing systems: a review. J. Food Prot. 1992, 55, 133-140.
5. Dickson J. S., Nettles Cutter C. G., Siragusa G. R.: Antimicrobial effects of trisodium phosphate against bacteria attached to beef tissue. J. Food Prot. 1994, 57, 952-955.
6. Dorsa W. J., Cutter C. N., Siragusa G. R.: Effects of acetic acid, lactic acid and trisodium phosphate on the microflora of refrigerated beef carcass surface tissue inoculated with Escherichia coli O157:H7, Listeria innocua, and Clostridium sporogenes. J. Food Prot. 1997, 60, 619-624.
7. ISO 6579: 1993(E). Microbiology – General guidance on methods for the detection of Salmonella. International Organization of Standardization, Geneva, Switzerland.
8. Jetton J. P., Bilgili S. F., Conner D. E., Kotrola J. S., Reiber M. A.: Recovery of salmonellae from chilled carcasses as affected by rinse media and enumeration method. J. Food Prot. 1992, 55, 329-333.
9. Kotula K., Thelappurath R.: Microbiological and sensory attributes of retail cuts of beef treated with acetic and lactic acid solutions. J. Food Prot. 1994, 57, 665-670.
10. Lillard H. S.: Effect of trisodium phosphate on salmonellae attached to chicken skin. J. Food Prot. 1994, 57, 465-469.
11. Mikołajczyk A., Radkowski M.: Elimination of Salmonella spp. by lactic acid. Pol. J. Vet. Sci. 2002, 5, 139-143.
12. PN-ISO 6579 1998. Mikrobiologia. Ogólne zasady metod wykrywania pałeczek Salmonella.
13. Radkowski M., Mikołajczyk A.: Wpływ chlorku heksadecylopirydyniowego na unieszkodliwianie pałeczek Salmonella w mięsie. Medycyna Wet. 2004, 60, 150-253.
14. Rozporządzenie Ministra Zdrowia i Opieki społecznej z dnia 18 września 2008 r. w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych – wraz z załącznikami. Dz. U. 2008, nr 177 poz. 1094, z dnia 3 października 2008 r.
15. Russell S. M., Fletcher D. C., Walker J. M., Bailey J. S.: The effect of hydrogen peroxide and sodium bicarbonate rinses on the recovery of bacteria from broiler carcasses. Poultry Sci. 1993, 72 (suppl. 1), 190-193.
16. Sawaya W. N., Elnawawy A. S., Al-Zenki S., Al-Otaibi J., Al-Omirah I. I., Al-Amiri H.: Storage stability of chicken as affected by MAP and lactic acid treatment. J. Food Sci. 1995, 60, 611-614.
17. Smulders F. J. M., Upmann M.: Verminderung der bakteriellen Belastung auf frischem Fleisch. Fleischwirtschaft 2000, 80, 27-29.
18. Tamblyn K. C., Conner D. E.: Bactericidal activity of organic acids against Salmonella typhimurium attached to broiler chicken skin. J. Food Prot. 1997, 60, 629-633.
19. Tsai Y. W., Ingham S. C.: Survival of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella spp. in Acidic condiments. J. Food Prot. 1997, 60, 751-755.
20. Wang W.-Ch., Li Y., Slavik M., Xiong H.: Trisodium phosphate and cetylpyridinium chloride spraying on chicken skin to reduce attached Salmonella typhimurium. J. Food Prot. 1997, 60, 992-994.
21. Xiong H., Li Y., Slavik M. F., Walker J. T.: Spraying chicken skin with selected chemicals to reduce attached Salmonella typhimurium. J. Food Prot. 1998, 61, 272-275.

Adres autora: dr Anita Mikołajczyk, ul. Warszawska 30, 10-082 Olsztyn;
e-mail: anita.mikolajczyk@uwm.edu.pl