

MARCIN SZULC, ANNA STEFANIAKOWA, JAN TROPIŁO, BOŻENA STAŃCZAK,
JANINA PEĆCONEK, HALINA MIERZEWSKA, JULITTA BIELECKA

Wpływ napromieniowania bakterii na ich ciepłooporność

Z Katedry Higieny Produktów Zwierzęcych Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR w Warszawie

Obróbka cieplna środków spożywczych, będąca najbardziej energiczną metodą utrwalania, nie zapewnia jednak pełnej likwidacji drobnoustrojów, co ma bardzo poważne znaczenie zarówno dla technologii, jak i dla higieny żywności.

Zwiększenie rygorów zabiegu, przez podniesienie temperatury lub przedłużenie czasu jej oddziaływania, nie jest możliwe ze względu na wywoływanie niepożądanych zmian organoleptycznych, fizykochemicznych i chemicznych w otrzymywanych produktach.

W tej sytuacji, oprócz przestrzegania zasad higieny, należy prowadzić badania nad możliwościami obniżenia ciepłooporności drobnoustrojów w surowcach i produktach spożywczych. Niewykluczone, że jedną z dróg prowadzących do tego celu może być zastosowanie promieniowania jonizującego.

Chociaż mechanizmy niszczenia drobnoustrojów przez wysoką temperaturę i przez promieniowanie są całkowicie różne, to jednak bakterie odporne na temperaturę są również często odporne na promieniowanie i odwrotnie.

Określaniu radiowrażliwości poszczególnych gatunków bakterii poświęcono wiele badań (np. 3, 4, 8, 9).

Badania nad efektami połączonego napromieniowania i ogrzewania bakterii nieprzetwarzających są wg dostępnej literatury nieliczne. Nieco więcej takich prac poświęcono bakteriom przetrwalnikującym.

Kempe (3) podaje, że przy połączonym napromieniowaniu i ogrzewaniu zastosowanie 1/3 dawki sterylizacyjnej promieniowania powoduje zmniejszenie o 1/4 ilości ciepła koniecznego do sterylizacji. Pallas i Hamdy stwierdzili w 1976 r. (5), że równoczesne działanie promieniowania i temperatury (tzw. thermoradiation) powoduje intensywne niszczenie niektórych bakterii oraz, że zabieg ten może znaleźć zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym i spożywczym. Kilku autorów zwróciło uwagę na synergetyczne działanie napromieniowania i ogrzewania niektórych gatunków bakterii (1, 3, 5, 7).

W piśmiennictwie krajowym nie znaleziono żadnych danych wynikających z oryginalnych prac w omawianym temacie i o ile wiadomo — badania takie nie były dotychczas w Polsce prowadzone.

Opisywana praca jest pierwszym zadaniem badawczym tematu związanego z wpływem promieniowania jonizującego na cechy bakterii

szczególnie istotne dla higieny i technologii żywności, podjętego przez Katedrę Higieny Produktów Zwierzęcych SGGW-AR w Warszawie, w ramach rządowego programu badawczo-rozwojowego PR-4: „Optymalizacja produkcji i spożycia białka”.

Podstawowym celem pracy, związanym bezpośrednio z jej tytułem jest:

1. Poznanie i określenie wpływu napromieniowania bakterii różnymi dawkami promieniowania X na ciepłooporność tych drobnoustrojów.

Dalszymi celami są:

2. Porównanie radiowrażliwości badanych bakterii w stosunku do promieniowania X.

3. Porównanie wrażliwości badanych szczepów na podniesioną temperaturę.

4. Określenie wpływu skojarzonego napromieniowania i ogrzewania bakterii.

5. Określenie wpływu białka w środowisku na radiowrażliwość i ciepłowrażliwość badanych bakterii.

Materiał i metody

Bakterie i badania wstępne. Badania przeprowadzono na następujących bakteriach: *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis*. Do doświadczeń używane były zawsze 24 godzinne hodowle szczepów z podłoża stałych.

We wstępnej fazie doświadczeń określano radioporność i ciepłooporność badanych szczepów bakteriowych w 2 różnych środowiskach (PBS i bulion), w celu ustalenia odpowiednich dawek promieniowania oraz odpowiednich temperatur ogrzewania szczepów, we właściwych doświadczeniach. Wielkości dawek napromieniowania oraz ogrzewania bakterii dobierano w taki sposób, aby czynniki te pojedynczo stosowane powodowały wyraźne zmniejszenie się liczb bakterii, lecz aby nie doprowadzały do całkowitego zniszczenia szczepów.

Napromieniowanie bakterii. Bakterie napromieniano promieniami X przy następujących parametrach pracy aparatu: napięcie lamp 200 kV, natężenie 20 mA, filtracja promieni 1 mm Al, moc dawki 11 radów/sek. (wg układu SI: 1 rad=0,01 grej=0,01 Gy).

W wyniku ustaleń z badań wstępnych wszystkie badane bakterie napromieniano dawkami: 100 radów, 1000 radów, 5000 radów i 10 000 radów, w próbkach o pojemności 1 ml, w 2 różnych środowiskach, tj. w:

- zbuforowanym roztworze fizjologicznym (PBS),
- bulionie o zawartości ok. 1% białka.

Bakterie nie napromienowane i napromienowane przetrzymywano w identycznych warunkach do chwili ogrzewania.

Ogrzewanie bakterii. Zarówno bakterie nie napromienowane jak i napromienowane (w PBS i bulionie) poddawano ogrzewaniu bezpośrednio po napromieniowaniu, w tym samym czasie i w tych samych ultratermostatach. Temperatura ogrzewania bakterii

wynosiła: *E. coli* — 48°C, *Pr. vulgaris* — 48°C, *S. typhimurium* — 50°C, *Staph. aureus* — 47°C oraz *Str. faecalis* — 55°C.

Posiewy bakteriologiczne. Bezpośrednio po zakończeniu ogrzewania i po ochłodzeniu próbek z zawiesinami (w zimnej wodzie) do temp. pokojowej, wykonywano posiewy na podłoża stałe (agar odżywczy, podłoże Nogrady — *Pr. vulgaris*), wysiewając po 0,2 ml zawiesiny. Posiewy inkubowano w temp. 37°C przez 24 godziny, a następnie odczytywano wyniki.

Liczby serii doświadczalnych. Doświadczenia z poszczególnymi gatunkami bakterii wykonano w następujących liczbach serii (uzależnionych od powtarzalności otrzymywanych wyników):

— *Escherichia coli* 6 serii — 504 próbki
 — *Proteus vulgaris* 4 serie — 336 próbek
 — *Salmonella typhimurium* 8 serii — 672 próbki
 — *Staphylococcus aureus* 4 serie — 336 próbek
 — *Streptococcus faecalis* 4 serie — 336 próbek

Układ doświadczeń każdej serii, wraz z liczbami badanych próbek, przedstawiono w tab. 1.

Wyniki i omówienie

Opracowanie wyników. Uzyskane wyniki, po obliczeniu średnich arytmetycznych dla każdej serii oddzielnie oraz dla wszystkich serii (powtórzeń) łącznie, wyrażano w ostatecznej for-

mie wartościami względnymi, w stosunku do kontroli — tj. do bakterii nie napromieniowanych i nie ogrzanych, dla których wartości względne równe są 100%.

Zmiany ciepłooporności bakterii pod wpływem napromieniowania stosowanymi dawkami promieni X wyrażano w wartościach procentowych, w postaci stosunku wyników dla bakterii poddanych ogrzewaniu do nie ogrzanych, zarówno nie napromieniowanych (kontrola I) jak i napromieniowanych poszczególnymi dawkami.

Opracowane wyniki przedstawiono w tab. 2 i 3.

Wrażliwość bakterii na promieniowanie X. Wyniki przedstawione w tab. 2 wskazują, że wszystkie poddane badaniom gatunki bakterii charakteryzują się dużą wrażliwością na promieniowanie X.

Ze względu na cele i układ doświadczeń, w badaniach nie stosowano dużych dawek promieniowania, które niszczyłyby w całości badane szczepy. Jak wskazano w metodyce pracy, wielkości dawek były dobrane w ten sposób,

Tab. 1. Układ doświadczeń (jeden gatunek bakterii, jedna seria)

Próbki bakterii	Liczby próbek (próbówek) zawiesiny bakterii w doświadczeniu											
	Bakterie nie napromieniowane (kontrola)		Bakterie napromieniowane w dawkach								Razem	
			100 radów		1000 radów		5000 radów		10 000 radów			
	PBS	B	PBS	B	PBS	B	PBS	B	PBS	B	PBS	B
Bakterie nie ogrzewane	5	5	3	3	3	3	3	3	3	3	17	17
Bakterie ogrzewane	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	25	25
Razem	10	10	8	8	8	8	8	8	8	8	42	42

Tab. 2. Wpływ napromieniowania i ogrzania bakterii (% przeżycia)

Gatunek bakterii	Temp. ogrzew. °C	Bakterie nie naprom. %		Bakterie napromieniowane dawkami, %							
				100 radów		1000 radów		5000 radów		10 000 radów	
		PBS	B	PBS	B	PBS	B	PBS	B	PBS	B
<i>E. coli</i>	—	100	100	84,0	86,5	57,8	61,1	12,6	27,6	3,0	11,1
<i>Pr. vulgaris</i>	—	100	100	81,9	84,3	44,7	64,8	15,7	44,6	2,1	7,8
<i>S. typhimurium</i>	—	100	100	86,9	86,2	68,4	67,5	24,1	28,9	11,2	11,3
<i>Staph. aureus</i>	—	100	100	98,2	102,5	70,4	93,9	21,5	56,5	7,7	26,3
<i>Str. faecalis</i>	—	100	100	96,2	92,0	72,1	81,1	64,2	78,1	53,5	71,9
<i>E. coli</i>	48	70,8	82,3	59,5	68,6	38,2	45,4	6,6	17,4	1,2	6,5
<i>Pr. vulgaris</i>	48	68,6	86,0	49,1	64,3	23,2	50,6	5,8	31,4	0,2	4,3
<i>S. typhimurium</i>	50	70,2	85,5	64,8	70,8	46,5	50,5	12,7	19,9	6,0	6,5
<i>Staph. aureus</i>	47	62,3	94,9	55,3	87,1	34,1	80,0	7,8	44,1	1,7	17,3
<i>Str. faecalis</i>	55	50,7	78,3	40,4	68,6	24,7	53,5	13,4	47,6	7,2	31,2

aby można było prześledzić skutki połączonego napromieniowania i ogrzewania bakterii.

Godny podkreślenia jest fakt, że już najmniejsza stosowana dawka promieni X, wynosząca 100 radów, powodowała uchwytne obniżenie się liczby komórek bakteryjnych wszystkich szczepów poddanych badaniom (tab. 2). W dostępnym piśmiennictwie nie spotkano danych o takich obserwacjach. W miarę zwiększania dawek napromieniowania ich działanie bakteriobójcze ulegało systematycznemu i intensywnemu wzrostowi (tab. 2).

Radiowrażliwość poddanych badaniom gatunków bakterii różni się dość znacznie (tab. 2). Badane szczepy mogą być pod względem tej cechy, od wrażliwości największej do najmniejszej, uszeregowane w następującej kolejności: *Pr. vulgaris*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Staph. aureus*, *Str. faecalis*. Na podkreślenie zasługuje fakt znacznie większej oporności na promieniowanie X szczepu *Str. faecalis*. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi z piśmiennictwa. Wg tych danych bakterie z rodziny *Enterobacteriaceae* oraz *Staphylococcus aureus* oceniane są jako średnio wrażliwe na promieniowanie, a rodzaj *Streptococcus* jako bardziej odporny (4, 8, 9).

Wrażliwość bakterii na temperaturę. Wyniki przedstawione w tab. 2 wskazują, że pod względem ciepłooporności — od najmniejszej do największej — badane szczepy mogą być uszeregowane w następującej kolejności (przy ogrzewaniu w środowisku bezbiałkowym): *Staph. aureus*, *Pr. vulgaris*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Str. faecalis*.

Wpływ białka w środowisku na radiowrażliwość i ciepłowrażliwość bakterii. Wyniki przedstawione w tab. 2 i 3 wskazują jednoznacznie, że wszystkie badane szczepy bakteryjne, poddawane napromieniowaniu jak również ogrzewaniu w bulionie o zawartości ok. 1% białka, wykazywały większą radiooporność i większą ciepłooporność.

Liczby bakterii, które pozostawały żywe po napromieniowaniu dawką 10 000 radów w śro-

dowisku białkowym (bulion) były dla gatunków *E. coli*, *Pr. vulgaris* i *Staph. aureus* średnio 3,5—4-krotnie wyższe niż w środowisku bezbiałkowym (PBS). Mniejsze efekty stwierdzono w doświadczeniach ze szczepem *Str. faecalis*, a najmniejsze ze szczepem *S. typhimurium*.

W odmiennej kolejności układa się wielkość wpływu białka w środowisku na ciepłooporność badanych szczepów (tab. 2).

Wpływ obecności białka w środowisku na efekty skojarzonego napromieniowania i ogrzania bakterii uwidacznia się w doświadczeniach ze wszystkimi pięcioma szczepami bakteryjnymi oraz przy wszystkich czterech dawkach promieniowania, z tym, że w miarę wzrostu dawki staje się coraz większy (tab. 2 i 3).

Zwiększona ciepłooporność bakterii ogrzewanych w środowisku białkowym jest faktem znany, często sygnalizowanym w literaturze.

Nieliczne dane piśmiennictwa (2) wskazują, że obecność białka w środowisku podnosi zwykle również radiooporność bakterii.

W dostępnym piśmiennictwie nie spotkano natomiast danych o wpływie obecności białka w środowisku na efekty skojarzonego napromieniowania i ogrzania bakterii.

Efekty skojarzonego napromieniowania i ogrzania bakterii. Wyniki przedstawione w tab. 2 wskazują, że efekty napromieniowania i następującego bezpośrednio po nim ogrzania bakterii są bardzo wyraźne.

Na specjalne podkreślenie zasługuje fakt, że działanie bakteriobójcze skojarzonego w ten sposób napromieniowania i ogrzania każdego z badanych gatunków bakterii jest znacznie intensywniejsze niż suma skutków działania każdego z tych czynników oddzielnie stosowanego.

I tak obserwowany synergizm skojarzonego napromieniowania i ogrzania badanych bakterii w środowisku bezbiałkowym zwiększał efekty działania przy napromieniowaniu dawką 10 000 radów, w stosunku do sumy efektów oddzielnego napromieniowania i ogrzania poszczególnych szczepów o: *E. coli* — 1,8×, *Pr. vulgaris* — 7,2×,

Tab. 3. Ciepłooporność bakterii przy stałych warunkach ogrzewania

Gatunek bakterii	Środowisko	Ciepłooporność bakterii, %				
		nie naprom.	100 radów	1000 radów	5000 radów	10 000 radów
<i>E. coli</i>	bezbiałkowe	70,8	70,9	66,0	52,1	40,8
	białkowe	82,3	79,2	74,3	63,2	58,4
<i>Pr. vulgaris</i>	bezbiałkowe	68,6	60,0	51,9	37,1	9,9
	białkowe	86,0	76,2	78,1	70,4	55,5
<i>S. typhimurium</i>	bezbiałkowe	70,2	74,6	67,9	52,8	53,3
	białkowe	85,5	82,1	74,8	69,1	58,0
<i>Staph. aureus</i>	bezbiałkowe	62,3	56,3	48,4	36,4	22,0
	białkowe	94,9	84,9	85,1	78,0	65,7
<i>Str. faecalis</i>	bezbiałkowe	50,7	42,0	34,2	20,9	13,5
	białkowe	78,3	74,5	66,0	60,9	43,4

Str. faecalis — 3,8×, *S. typhimurium* — 1,3×, *Staph. aureus* — 2,8×. Największe działanie synergetyczne połączonego napromieniowania i ogrzania wystąpiło więc u *Pr. vulgaris*, najmniejsze u *S. typhimurium*.

Efekty skojarzonego napromieniowania i ogrzania bakterii wzrastały wraz ze zwiększeniem dawki promieniowania i to zarówno w środowisku bezbiałkowym, jak i białkowym.

Wpływ napromieniowania bakterii na ich ciepłoporność. Wyniki przedstawione w tab. 3 wskazują, że ciepłoporność wszystkich badanych szczepów ulega systematycznemu obniżeniu wraz ze zwiększeniem dawki napromieniowania. W znacznej większości przypadków już dawka 100 radów powodowała uchwytne obniżenie ciepłoporności badanych bakterii w stosunku do ich ciepłoporności bez napromieniowania. Po napromieniowaniu bakterii dawką 10 000 radów ich ciepłoporność ulegała największemu obniżeniu.

Wyniki zestawione w tab. 3 wskazują, że efekty obniżenia ciepłoporności bakterii napromieniowanych przy obecności białka w środowisku (bulion) są niemal z reguły mniejsze. Jedynym wyjątkiem był tu szczep *S. typhimurium*.

W dostępnej literaturze nie spotkano podobnie ujętych danych, dotyczących obserwacji obniżenia się ciepłoporności bakterii pod wpływem napromieniowania. Na podstawie analizy uzyskanych wyników można jednak stwierdzić, że synergizm połączonego napromieniowania i ogrzewania bakterii, obserwowany przez niektórych badaczy (1, 3, 5, 6, 7) oraz wykazany w niniejszej pracy jest właśnie wynikiem omawianego zjawiska obniżenia się ciepłoporności bakterii napromieniowanych.

Wnioski

1. Wszystkie poddane badaniom gatunki bakterii charakteryzują się dość dużą wrażliwością na działanie promieniowania X. Pod względem radiowrażliwości, od największej do najmniejszej, badane gatunki mogą być uszeregowane w następującej kolejności: *Pr. vulgaris*, *S. coli*, *S. typhimurium*, *Staph. aureus*, *Str. faecalis*.

2. Obecność białka mięsnego w środowisku zmniejsza radiowrażliwość, ciepłowrażliwość oraz efekty skojarzonego napromieniowania i ogrzania bakterii. Najmniejszymi różnicami pod tym względem cechuje się *S. typhimurium*.

3. Skutki skojarzonego napromieniowania i ogrzania wszystkich badanych gatunków bakterii wzrastają wraz ze zwiększeniem dawki napromieniowania.

Działanie bakteriobójcze skojarzonego napromieniowania i ogrzewania bakterii jest intensywniejsze niż suma skutków działania każdego z tych czynników pojedynczo stosowanego. Występuje więc wyraźne zjawisko synergizmu skutków napromieniowania i ogrzania bakterii.

4. Napromieniowanie bakterii: *E. coli*, *Pr. vulgaris*, *S. typhimurium*, *Staph. aureus* i *Str.*

faecalis promieniami X w dawkach 100, 1000, 5000 i 10 000 radów obniża ich ciepłoporność.

Ciepłoporność tych bakterii maleje wraz ze zwiększeniem dawki napromieniowania, przy czym uchwytne zmiany występują już po dawce 100 radów.

5. Wyniki niniejszej pracy stwarzają przesłanki do stwierdzenia, że poddanie produktów spożywczych przed ich obróbką cieplną (np. pasteryzacja) wpływowi małych dawek promieniowania jonizującego znacznie ułatwiłoby zniszczenie vegetatywnej flory bakteryjnej, a więc zwiększyłyby efekty sanitarno-higieniczne i działanie utrwalające ogrzewania.

Piśmiennictwo

1. Annelis A., Shattuck E. B., Rowley D. B., Ross E. W., Whaley D. N., Dowell V. R.: Appl. Microbiol. 30, 811, 1975.
2. Bridges B. S., Horne T.: J. appl. Bact. 22, 96, 1959.
3. Kempe L. L.: Nucleonics 18, 108, 1960.
4. Maxcy R. B., Thwari N. P.: Proc. IAEA, Radiation preservation of food. Vienna, 1973, s. 491.
5. Pallas J. E., Hamdy M. K.: Appl. enviro. Microbiol. 32, 250, 1976.
6. Report of Working Group 1: Food irradiation, Annual Meeting of ESNA, Warsaw, 1976.
7. Reynolds M. C., Brannen J. P.: Proc. IAEA, Radiation preservation of food. Vienna, 1973, s. 165.
8. Thornley M. J.: J. appl. Bact. 26, 334, 1963.
9. Welch A. B., Maxcy R. B.: Appl. Microbiol. 30, 242, 1975.

Adres autora: prof. dr Marcin Szulc, ul. Bielańska 3 m. 25, 00-086 Warszawa.

Шульц М., Стефанякова А., Тропило Я., Станьчак Б., Пенцонек Я., Межевская Г., Белецкая Ю. — Влияние облучения бактерий на их теплоустойчивость.

Определили влияние радиации X на теплоустойчивость бактерий. Исследования провели на: *E. coli*, *Pr. vulgaris*, *S. typhimurium*, *Staph. aureus* и *Str. faecalis*. Бактерии облучили в PBS (physiological buffer solution) и в бульоне (с содержанием ок. 1% белка) лучами X в дозах: 100, 1000, 5000 и 10 000 рад и непосредственно после этого нагревали в температурах, вызывающих отмирание части бактерий (таб. 2).

Полученные результаты указывают на то, что облучение исследуемых бактерий малыми дозами лучей X отчетливо понижает их теплоустойчивость. Обнаружили синергетическое действие облучения и нагревания бактерий, растущее с увеличением дозы облучения. Наибольшие изменения теплоустойчивости появились при *Pr. vulgaris*, наименьшие — при *S. typhimurium*. Понижение теплоустойчивости бактерий более сильно при облучении в безбелковой среде (PBS).

Szulc M., Stefaniakowa A., Tropiło J., Stańczak B., Penconek J., Mierzewska H., Bielecka J. — Influence of irradiation of bacteria on their thermoresistance.

The influence of X-radiation on thermoresistance of bacteria was determined. The studies were carried out on: *E. coli*, *Pr. vulgaris*, *S. typhimurium*, *Staph. aureus* and *Str. faecalis*. The bacteria were irradiated in PBS (physiological buffer solution) and in broth (containing about 1% of protein) with X-rays at radium absorbed doses of 100, 1000, 5000 and 10 000, which was followed immediately by heating at temperatures causing death of part of the bacteria (table 2). The results obtained indicate that irradiation of bacteria with small X-ray doses distinctly decreases their thermoresistance. Synergistic action of irradiation and heating of bacteria was observed, increasing with increased irradiation dose. The greatest changes of thermoresistance occurred with *Pr. vulgaris*, the smallest with *S. typhimurium*. Thermoresistance of bacteria decreased more strongly on their irradiation in protein-free medium (PBS).