

**monografia****Bacillus subtilis oraz enterokoki jako mikroflora konserw mięsnych**

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Instytutu Weterynarii,  
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

\* Wydział Technologii Żywności AR, ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań

Zasadniczą cechą żywności utrwalonej cieplnie jest jej trwałość, którą warunkuje stopień wyeliminowania mikroflory. Wiadomo jednakże, że stosowana rutynowo w przemyśle mięsnym obróbka cieplna nie zapewnia jałowości konserw, a jedynie stan mniej lub bardziej pogłębionej anabiozy (semibiozy). Przyczyną trudności otrzymania konserw mięsnych całkowicie jałowych może być również duża oporność cieplna niektórych przetrwalników lub bakterii (7, 14, 37).

Z punktu widzenia trwałości mikrobiologicznej konserw, podstawowe znaczenie mają bakterie przetrwalnikujące gramdodatnie, tworzące przetrwalniki o bardzo dużej, w stosunku do swoich komórek wegetatywnych, oporności termicznej. W takich przypadkach parametry termobakteriologiczne podaje się zawsze dla ich przetrwalników. Wśród bakterii przetrwalnikujących rozróżnia się tlenowce bezwzględne (obligatoryjne) oraz bez-tlenowce względne (fakultatywne) należące do rodzaju *Bacillus* oraz beztlenowce bezwzględne należące do rodzaju *Clostridium*. W warunkach niedostatku tlenu w konserwach znaczenie tlenowców bezwzględnych jest znacznie ograniczone. Również ich termooporność jest bardzo niska (30, 41).

Do najczęściej wykrywanych w konserwach tlenowców przetrwalnikujących należą gatunki z rodzaju *Bacillus* spp., np. *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. cereus*, a rzadziej *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis*, *B. polymyxa*, czy też *B. stearothermophilus*. Obok wymienionych bakterii występują także beztlenowce przetrwalnikujące, takie jak *Cl. perfringens*, *Cl. putrificus* i *Cl. sporogenes* (28, 29). Oprócz wymienionej mikroflory w konserwach pasteryzowanych bardzo często stwierdza się ciepłooporne ziarniaki, takie jak: *Streptococcus faecalis*, czy też *Str. faecium* (24).

Psucie się konserw spowodowane jest przez drobnoustroje, które przeżyły proces obróbki cieplnej lub stanowią zanieczyszczenie wtórne, następujące głównie podczas fazy chłodzenia produktu w wodzie przez mikronieszczelności puszki. Przyczyną nieszczelności są też wady fabryczne lub nieodpowiednie obchodzenie się z konserwą np. rzucanie czy też zniekształcenia mechaniczne (1, 17, 23, 30).

Po obróbce cieplnej stwierdza się przede wszystkim przetrwalniki bakteryjne, szczególnie jeżeli żywność poddana była ogrzewaniu w temperaturze powyżej 100°C. W przypadku, gdy produkty mięsne poddane były pasteryzacji, psucie się ich może być związane z rozwojem różnych gatunków bakterii przetrwalnikujących oraz termoopornych bakterii nieprzetrwalnikujących (22). Zabezpieczenie jakości zdrowotnej produktów mięsnych pasteryzowanych uzyskuje się głównie poprzez użycie wysokiej jakości surowców oraz ograniczony okres przechowywania w warunkach chłodniczych.

**Bacillus subtilis**

*Bacillus subtilis* należy do rodzaju *Bacillus*. Znamienną cechą tych drobnoustrojów jest wytwarzanie przetrwalników bardzo opornych na działanie czynników chemicznych i fizycznych. Protoplasty przetrwalników zawierają 5—19% kwasu dwupikolinowego (DPA), który uważa się jako odpowiedzialny za ich wysoką termooporność (13, 14).

*B. subtilis* jest ruchliwą laseczką gramdodatnią o urzęsieniu perytrychialnym i należy do ścisłych tlenowców. Większość gatunków wytwarza katalazę. Maksymalna temperatura wzrostu 25—75°C. Posiada silne właściwości proteolityczne oraz rozkłada węglowodany. *B. subtilis* jest zdolny do tworzenia mutantów, które wzrastają w temperaturach wyższych od maksymalnej (36). Wśród tego gatunku występuje duża zmienność wyglądu kolonii i typu wzrostu. Barwa kolonii może być od kremowobiałej poprzez żółtą aż do pomarańczowej. Stwierdza się występowanie nici, form otoczkowatych, wytwarzanie śluzu i brak oraz niestałość barwienia (7). Wzrost jest możliwy w zakresie pH 4,5—9,0, przy czym optymalne pH wynosi 6,5—7,5. Nie rozwija się przy wartości aktywności wody  $a_w$  poniżej 0,949 (1, 20). Szczepy *B. subtilis* produkują 10 antybiotyków, w tym polipeptyd subtilinę, działającą bakteriostatycznie na bakterie gramdodatnie, o masie molekularnej wynoszącej 3200 (1, 4, 15).

Przetrwalniki są elipsoidalne, położone centralnie i nie deformują laseczki. Przeżywają one proces pasteryzacji i stanowią również mikroflorę resztkową w konserwach sterylizowanych. Konserwy zakażone *B. subtilis* psują się bez oznak bombażu, powodując zmianę konsystencji wsadu oraz zmianę zapachu. Występuje zmętnienie zalewy (7, 15, 30). Są także bardzo odporne na działanie mikrofal, promieniowania UV i jonizacyjnego (14, 18, 32).

*B. subtilis* redukuje azotany przy niedostatku tlenu w konserwie, uzyskując w ten sposób energię niezbędną do życia (oddychanie azotanowe). Z kolei obniżenie zawartości azotanów w konserwie zwiększa szansę rozwoju drobnoustrojów z rodzaju *Clostridium*, co stanowi dodatkowe zagrożenie zdrowotne (11, 12, 30). Również przyprawę, takie jak: pieprz czarny i czerwony, imbir, gorczyca i papryka są zakażone *B. subtilis* w ilości  $10^3$ — $10^7$ /g (34).

Kiełbasy zanieczyszczone *B. subtilis* wykazują charakterystyczny amoniakalno-śtechyły zapach oraz obecność nitek śluzu (7, 8). Poza tym występuje on w mleku, mące i pieczywie (1, 7) oraz w przecierach pomidorowych (9).

Współczynnik oporności cieplnej w zakresie temperatur pasteryzacyjnych wynosi 7—9,4°C (15, 20). Czasy redukcji dziesiętnej są dość zróżnicowane i wynoszą

przykładowo  $D_{60} = 55$  min. w buforze fosforanowym (15),  $D_{100} = 11,3$  min. w wodzie (5), czy też  $D_{100} = 1,7-6,7$  min. w wodzie (31).

### *Streptococcus faecium* i *faecalis*

*Streptococcus faecium* i *faecalis* należą do rodzaju *Streptococcus* i należą do grupy enterokoków wraz ze *Str. zymogenes*, *durans*, *liquefaciens* i *bovis*. Znane są też pod nazwą enterokoki. Wytwarzają swoisty wielocukier grupowy D, który jest antygenem. Barwią się gramododatnio, nie wytwarzają katalazy i rozkładają homofermentatywnie cukry z wytworzeniem prawoskrętnego kwasu mlekowego. Enterokoki mogą dawać hemolizę alfa lub beta, rosną w  $10^{\circ}$  i  $45^{\circ}\text{C}$ , przy  $= 9,6$  i  $6,5\%$  zawartości chlorku sodu, wytrzymują na ogół ogrzewanie w  $60^{\circ}\text{C}$  przez 30 min., rosną w obecności  $0,1\%$  błękitu metylenowego redukując go do leukozwiązku, tolerują  $0,06-0,1\%$  tellurynu sodowego. Rosną na podłożu zawierającym nawet  $40\%$  żółci. Na wybiórczym podłożu Slanetza tworzą kolonie (Str. *faecalis*) lub ciemnoróżowe z białą obwódką (Str. *faecium*) (1, 7).

*Str. faecium* i *faecalis* są składnikami prawidłowej mikroflory jelitowej człowieka oraz zwierząt. Stwierdzenie ich obecności w żywności stanowi jeden ze wskaźników zanieczyszczenia kałowego. Są lepszym wskaźnikiem stanu sanitarnego niż miano coli, szczególnie w odniesieniu do gotowego produktu spożywczego, ponieważ są odporne na działanie temperatury oraz innych czynników fizyko-chemicznych. Znaczna ich termooporność oraz zdolność do wzrostu w stosunkowo niskiej temperaturze powoduje psucie się konserw pasteryzowanych zawierających te drobnoustroje i może prowadzić do zatruc pokarmowych. W USA w latach 1972-76  $0,4\%$  ogółu zarejestrowanych zatruc pokarmowych, tj. 138 przypadków, było spowodowanych przez paciorkowce kałowe (1, 6, 7, 35). Zabite komórki *Str. faecalis* podawane wraz z pożywieniem przez dłuższy czas wywołują u zwierząt doświadczalnych zmiany anatomopatologiczne w wątrobie i nerkach oraz zaburzenia w metabolizmie (26, 27).

Paciorkowce kałowe działają antagonistycznie w stosunku do gronkowców oraz do *Cl. perfringens*. *Str. faecalis* podwyższa aktywność toksyny *Cl. botulinum* typ A. Są wrażliwe na chlorowanie i ulegają zniszczeniu po 15 sek. przy 100 ppm chloru i pH 8,4 lub po 2 min. przy 10 ppm chloru i pH 5,9 (1, 33). Paciorkowce kałowe są odporne również na działanie mikrofal (32).

Najczęściej spotyka się je w mięsie peklowanym i w magazynowanych szynkach pasteryzowanych (1, 4, 7, 25, 32). Obecność streptokoków w serze żółtym powoduje jego gorzknienie lub zmianę konsystencji. Znaleźć można je również w mleku świeżym i pasteryzowanym, masie jajowej, na powierzchni skorupki jaj, czy też w zbombażonych konserwach rybnych (3, 7, 10).

Skuteczność bakteriobójcza dymu wędzarniczego w stosunku do *Str. faecalis* zależy od stężenia formaldehydu (21). Ogrzewanie *Str. faecalis* w obecności  $0,01\%$   $\text{NaNO}_3$  w  $68^{\circ}\text{C}$  obniża jego termooporność (16). Czas redukcji dziesiątej  $D_{60}$  dla *Str. faecalis* w mięsie drobiowym wynosi  $9,6$  min., a w mleku  $3,3-10,0$  min. (38). Dla *Str. faecium*  $D_{63} = 144,8$  min.,  $D_{69} = 55,9$  min., zaś współczynnik oporności cieplnej  $z = 8,8-11,8^{\circ}\text{C}$  (19). Przy pH = 2,8

streptokoki wykazują najmniejszą termooporność wynoszącą  $D_{60} = 0,28$  min., przy pH 6,6 —  $D_{60} = 12,2$  min., zaś przy pH 7,0 —  $D_{60} = 4,9$  min. (20). Według badań szeregu autorów (4, 15, 20, 25, 38) współczynniki z mieszczą się w granicach od 5,0 do 12,3 min., jedynie Wojciechowski podaje znacznie wyższe wartości, tj. od 38 do 44 min. (39, 40). Graniczna wartość aktywności wody, przy której drobnoustroje te utrzymują się przy życiu, wynosi  $0,920-0,960$  (20).

Oporność komórek na letalne działanie podwyższonej temperatury uzależniona jest od temperatury inkubacji. Przy wyższej temperaturze inkubacji ciepłoooporność ulega podwyższeniu. *Str. faecium* jest bardziej termooporny niż *Str. faecalis* i dlatego jest częściej izolowany z konserw mięsnych pasteryzowanych (25, 31).

### Piśmiennictwo

- Banwart G. J.: Basic Food Microbiology. AVI, Westport 1979.
- Barr J. G.: J. appl. Bact. 39, 1, 1975.
- Batish V. K., Chander H., Rantganathan B.: J. Food Sci. 51, 834, 1986.
- Bersani C., Cantoni C., Bergogni C.: Ind. Alimentari 24, 227, 1985.
- Briggs G.: J. appl. Bact. 29, 90, 1966.
- Bryan F. L.: Infections and Intoxication Caused by Other Bacteria, w: Food-borne Infection and Intoxication. Riemann H. Bryan F. L. wyd. Academic Press, New York 1979.
- Burbińska M., Piłszka A., Burzyńska H.: Mikrobiologia Żywności PZWL, Warszawa 1983.
- Dłużewska I., Marczyński J., Ossowska K.: Roczniki PZH 4, 407, 1953.
- Fields M., Zamora A. F., Bradsher M.: J. Food Sci. 42, 931, 1977.
- Fields M.: Fundamentals of Food Microbiology. AVI, Westport, 1979.
- Gibson A. M., Roberts T. A., Robinson A.: J. Food Technol. 19, 29, 1981.
- Gibson A. M., Roberts T. A.: Int. J. Food Microb. 3, 195, 1986.
- Gould G. W., Dring G. J.: Adv. Microbial Physiol. 11, 137, 1974.
- Gould G. W.: J. appl. Bact. 42, 297, 1977.
- Gould G. W., Hurst A.: The Bacterial Spore. Academic Press, New York 1969.
- Greenberg R. A., Silliker J. H.: J. Food Sci. 26, 622, 1961.
- Hauschild A. W., Simonsen B.: J. Food Prot. 48, 997, 1985.
- Hollywood N. W., Naidoo R. I., Mitchell G. E., Dommert T. W.: Food Australia 43, 160, 1991.
- Houben J. H.: Fleischwirtschaft 62, 490, 1982.
- Hugo W. B.: Inhibition and Destruction of the Microbial Cell. Academic Press, New York, 1971.
- Incze K.: Fleischwirtschaft 45, 1309, 1965.
- Janota-Bassalik L.: Post. Mikrobiol. 9, 399, 1970.
- Kafel S.: Post. Mikrobiol. 9, 415, 1970.
- Leistner L., Kruger B.: Mh. Vet. Med. 21, 892, 1955.
- Magnus C. A., Ingledew W. H., McCurdy A. R.: Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 19, 62, 1986.
- Maleszewski J.: Roczniki PZH 16, 483, 1965.
- Maleszewski J.: Badania wpływu zabitych termicznie enterokoków (Str. faecalis) podawanych w paszy na organizm szczurów rasy Wistar. Praca hab., PZH, Warszawa 1971.
- Michalska I.: Postępy Mikrobiologii 9, 377, 1970.
- Michalski M., Różańska H.: Instytut Weterynarii, Program badawczy, B/III/1. 4.8, 1991, :prawozdanie.
- Murrell W. G.: CSIRO Food Res. Quart. 45, 73, 1985.
- Müller G.: Podstawy Mikrobiologii Żywności. WNT, Warszawa 1983.
- Nioła I.: Ind. Alimentari 29, 335, 1990.
- Odlaug T. E., Pfulg I. J.: J. Milk Food Microb. 39, 493, 1976.
- Palumbo S. A., Ribenburgh A. L., Smith J. L., Kissinger J. C.: J. appl. Bact. 38, 99, 1975.
- Reiss J.: Roczniki PZH 39, 203, 1988.
- Sietske de Boer A., Diderichsen B.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 1, 1991.
- Wallace M. J., Nordsiden K. L.: J. Food Sci. 43, 1738, 1978.
- Webster R. C., Esselen W. B.: J. Milk Food Technol. 19, 269, 1956.
- Wojciechowski J.: Fleischwirtschaft 60, 1726, 1980.
- Wojciechowski J.: Roczn. Nauk. AR Poznań, Zeszyt nr 101.
- Ziemia Z.: Podstawy cieplnego utrwalania żywności, WNT, Warszawa, 1980.