

Ogólna liczba drobnoustrojów oraz salmonelli na powierzchni skóry tuszek kurcząt brojlerów po sonikacji

DARIUSZ M. STASIAK, ZBIGNIEW J. DOLATOWSKI, MONIKA KORDOWSKA-WIATER*

Katedra Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością, *Katedra Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii AR, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin

Stasiak D. M., Dolatowski Z. J., Kordowska-Wiater M.

Total number of bacteria and Salmonella on the skin of broiler chicken carcasses after sonication

Summary

The influence of low frequency (40 kHz) and medium intensity ($2 \text{ W}\cdot\text{cm}^{-2}$) ultrasound on the total number of bacteria and Salmonella on the skin of chicken broilers before chilling was investigated. Chicken wings were used for the study. The first part of raw wings was used for total number of bacteria investigation. The second part was contaminated with Salmonella. The changes of total number of bacteria (OLD) and number of Salmonella (SALM) after sonication were determined. Ultrasound treatment was conducted in distilled water (AQ) or 1% lactic acid aqueous solution (LA) at 20°C . The sonication time of a sample was 1, 3 or 6 minutes. The sonicated samples were compared with parallel, untreated samples. The obtained results show that OLD on wings' skin decreased more than 1.8 log after 6 min of sonication in AQ and SALM decreased 3.6 log in LA. The effect was caused by the ultrasonic cavitation and microflows in the ultrasonic field. The phenomena removed the bacteria from the skin and passed it to the solution and become inactivated. It was concluded that the sonication effect was amplified by the LA. It was supposed that LA stimulates sonobiological phenomena in cell membranes and, in effect, decreases its vital functions and causes the death of bacteria. The cleanness of chicken carcass' (wing) skin was increasing with the longer duration of sonication. But it was supposed at the same time that the temperature of the liquid (AQ, LA) in the ultrasonic field increases directly in proportion to the time of exposure, 4.5°C in 6 min. The low frequency and medium intensity ultrasound decreases the microbial load on carcass skin, especially the Salmonella, while treated in aqueous lactic acid solution. Sonication should be conducted before the chilling of the carcass. The utilization possibility of chicken carcass decontamination ultrasonic method is confirmed.

Keywords: ultrasound, bacteria, chicken

Mięso drobiowe zwykle zawiera więcej drobnoustrojów niż mięso innych zwierząt rzeźnych. Mikroorganizmy występujące na powierzchni świeżych tuszek drobiowych przed wychłodzeniem pochodzą najczęściej z piór ptaków, skóry, przewodu pokarmowego, a także z linii technologicznych. Przemysłowe technologie uboju nie są w stanie skutecznie ograniczyć zakażeń. Wśród wielu rodzajów bakterii izolowanych z tuszek drobiowych istotny problem stanowią pałeczki *Salmonella* obecne zwykle w przewodzie pokarmowym i układzie rozrodczym ptaków, a także *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria*, *Aeromonas* (3, 12, 15). Powszechność występowania salmonelli sprawia, że są jedną z najczęstszych przyczyn zakażeń pokarmowych u ludzi. W Polsce w 2005 r. na ogólną liczbę 20 251 zarejestrowanych przypadków zatruc, typy odzwierzęce pałeczek *Salmonella* były

przyczyną 78,1% przypadków (1). Serowarem *Salmonella enterica* odpowiedzialnym za ok. 85% salmonelloz była *S. Enteritidis*. Według danych amerykańskich udział drobiu w notowanych corocznie przypadkach salmonelloz wynosi 10-20% (4). Zmniejszenie liczby zatruc pokarmowych można osiągnąć poprzez ograniczenie stopnia zakażenia mięsa metodami chemicznymi i fizycznymi, z których najmniej kontrowersyjną budzą metody termiczne, elektryczne oraz sonikacja, czyli poddawanie wpływowi ultradźwięków (10).

Ultradźwięki są falami sprężystymi o częstotliwości przewyższającej 20 kHz, nie rejestrowanymi przez słuch człowieka. Górna granica widma ultradźwięków (1 GHz) wyznaczona jest przez techniczne możliwości ich wytwarzania. Rozchodząc się w ośrodkach rzeczywistych (dyssypatywnych), takich jak np. tkanki, podlegają zjawiskom odbicia i załamania oraz tłumienia w miarę rozchodzenia się. Po przekroczeniu tzw.

prugu kawitacji wywołują w cieczach zjawisko polegające na rozrywaniu ciągłości ośrodka. Pęcherzyki kawitacyjne w fazie implozji generują znaczne gradienty ciśnienia, którym towarzyszą złożone, nie do końca poznane zjawiska o charakterze fizykochemicznym. O ich intensywności decydują przede wszystkim: właściwości akustyczne ośrodka oraz źródła fal (14).

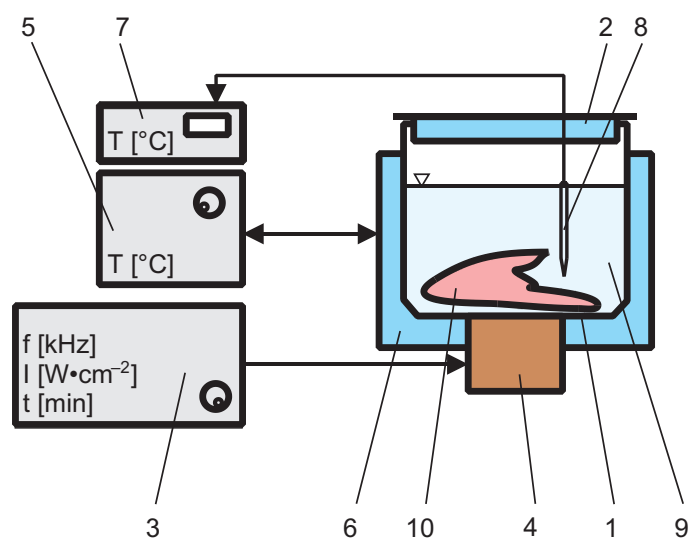
Celem badań było określenie skuteczności ultradźwiękowej metody oczyszczania skóry kurcząt brojlerów w wodzie i wodnym roztworze kwasu mlekowego, na podstawie ogólnej liczby drobnoustrojów oraz bakterii rodzaju *Salmonella* na świeżym surowcu.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na skrzydełkach kurcząt brojlerów pobieranych z linii ubojowej zakładu drobiarskiego bezpośrednio po uboju przed wychłodzeniem.

Sonikację prowadzono przy pomocy urządzenia ultradźwiękowego (ryc. 1) z prostopadłościenną komorą roboczą wykonaną z blachy kwasoodpornej. Pod dnem komory umocowany był przetwornik piezoelektryczny (typ sandwich) pracujący przy częstotliwości 40 kHz i natężeniu ok. $2 \text{ W} \cdot \text{cm}^{-2}$. Nominalna pojemność komory wynosiła 1 dm^3 . Bezpośrednio przed doświadczeniem komorę wypełniano sterylną wodą destylowaną lub sterylnym 1% wodnym roztworem kwasu mlekowego. Początkowa temperatura cieczy w zbiorniku wynosiła $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Temperaturę cieczy w zbiorniku mierzono przy pomocy termopary typu K (ryc. 1).

W pierwszym etapie badań określano zmianę ogólnej liczby drobnoustrojów (OLD) naturalnie występujących na powierzchni skrzydełek po sonikacji. Świeże skrzydełka układano na dnie zbiornika urządzenia tak, aby były całkowicie zanurzone w cieczy. Sonikację prowadzono przez czas 1, 3 lub 6 min. w porównaniu do tzw. próbek kontrolnych,



Ryc. 1. Schemat stanowiska do sonikacji

Objaśnienia: 1 – zbiornik; 2 – pokrywa zbiornika; 3 – generator ze wzmacniaczem; 4 – przetwornik „sandwicz”; 5 – kontroler temperatury; 6 – płaszcz termostabilizacyjny; 7 – rejestrator temperatury; 8 – termopara; 9 – komora robocza; 10 – próbka

które pozostawały zanurzone w cieczy przez taki sam czas przy wyłączonym generatorze ultradźwięków. Po zakończonej sonikacji z powierzchni skóry próbki wykonywano wymazy zgodnie z PN-ISO 3100-1:1999. Ogólną liczbę drobnoustrojów (OLD) oznaczano na powierzchni próbek oraz w roztworach roboczych, stosując metodę płytkową wg PN-A-82055-6:1994.

W drugim etapie badań skrzydełka poddawano zakażeniu poprzez zanurzenie na 1 min. w hodowli (zawiesina $1 \cdot 10^7 \div 18 \cdot 10^8$) pałeczek *Salmonella anatum*. Zakażone próbki zawijano w wysterylizowaną folię aluminiową i pozostawiano na 60 min. w temperaturze $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Po tym czasie usuwano folię i zakażone próbki poddawano sonikacji w warunkach identycznych, jak w etapie pierwszym. Następnie oznaczano liczbę pałeczek *Salmonella* w wymazach pobranych ze skrzydełek i z roztworów po sonikacji. Oznaczenie wykonano metodą płytkową na podłożu BGA, posiewając odpowiednio rozcieńczony materiał badawczy. Po inkubacji w 37°C liczono kolonie charakterystyczne dla badanych pałeczek i wyniki przeliczano zgodnie z pośrednią metodą liczenia.

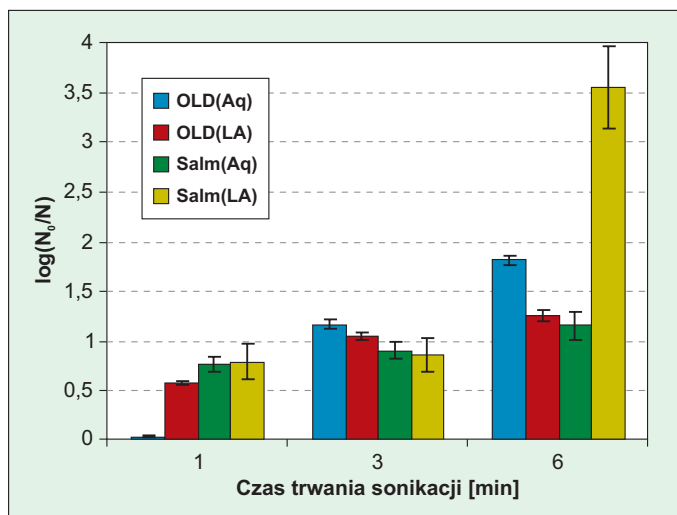
Doświadczenie zrealizowano w 6 powtórzeniach ($n = 6$). Dane poddano analizie statystycznej obliczając 95-procentowe przedziały ufności średnich $\log(N_0/N)$, gdzie N oznacza liczbę jtk po sonikacji, a N_0 przed sonikacją. Obliczono współczynniki korelacji (r) między czasem sonikacji a wielkością redukcji liczby mikroorganizmów.

Wyniki i omówienie

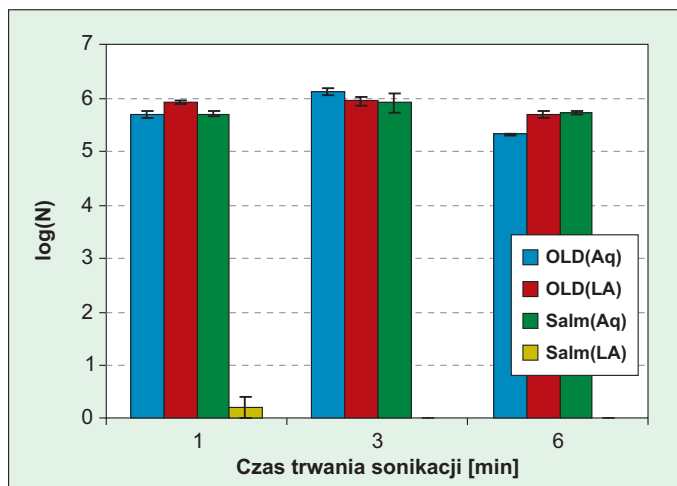
Ogólna liczba drobnoustrojów (OLD) na skrzydełkach po trwającej 6 min. sonikacji w środowisku wodnym uległa redukcji o wartość ponad 1,8 log. Krótsze ekspozycje wywoływały słabszy efekt dekontaminacji: 1 min. – 0,2 log, 3 min. – 1,2 log (ryc. 2). Skuteczność ultradźwiękowego oczyszczania skóry w roztworze kwasu mlekowego była najwyższa przy najdłuższym czasie oddziaływania (6 min.). Redukcja OLD wynosiła niemal 1,3 log. Stwierdzono słabszy efekt oddziaływania ultradźwięków w środowisku 1% wodnego roztworu kwasu mlekowego na OLD na powierzchni skóry (ryc. 2).

Liczba bakterii rodzaju *Salmonella* na skrzydełkach poddanych sonikacji w wodzie uległa obniżeniu o 1,2 log po 6 min. ekspozycji (ryc. 2). Sonikacja przeprowadzona w 1% wodnym roztworze kwasu mlekowego wykazała liczbę jtk niższą o 3,6 log (ryc. 2). Uzyskane wyniki badań są porównywalne i zbliżone do wyników innych autorów (6-9, 16), którzy stwierdzają, że dłuższym czasem oddziaływania ultradźwięków towarzyszą wyższe wartości redukcji liczby mikroorganizmów.

Stwierdzono, że ogólna liczba drobnoustrojów (OLD) w cieczach, w których zanurzane były skrzydełka wzrastała po 1 min. sonikacji o $5,3 \div 6,1$ log (ryc. 3). Liczba bakterii rodzaju *Salmonella* określana w wodzie wynosiła $5,7 \div 5,9$ log (ryc. 3). Na szczególną uwagę zasługuje fakt braku obecności pałeczek *Salmonella* już po upływie 1 min. sonikacji skrzydełek w roztworze kwasu mlekowego.



Ryc. 2. Wpływ czasu trwania sonikacji na ogólną liczbę drobnoustrojów (OLD) oraz *Salmonella* (Salm) na powierzchni skóry (Aq – w wodzie, LA – w 1% roztworze kwasu mlekowego)



Ryc. 3. Wpływ czasu trwania sonikacji na ogólną liczbę drobnoustrojów (OLD) oraz *Salmonella* (Salm) w wodzie (Aq) i 1% roztworze kwasu mlekowego (LA)

Można przypuszczać, że redukcja liczby mikroorganizmów na powierzchni skóry odbywa się dwutorowo. Oscylacje ciśnienia w cieczy oraz uderzeniowe fale poimplozyjne pęcherzyków kawitacyjnych pokonują siły adhezji mikroorganizmów na powierzchni skóry. W efekcie obserwuje się przechodzenie bakterii z powierzchni do środowiska cieczy roboczej. Jednocześnie miejscowe zmienne zagęszczenia i rozrzedzenia ośrodka zachodzące z częstotliwością fal oraz zapadanie się pęcherzyków mogą wywoływać m.in. przyspieszenie procesów wymiany masy przez błony komórkowe oraz ruchy i przemieszczenia struktur wewnątrzkomórkowych. Różnica impedancji akustycznej pomiędzy cieczą a warstwą skóry sprzyja powstawaniu kawitacji w bezpośrednim sąsiedztwie skóry. W rezultacie kawitacji w komórkach i w ich najbliższym otoczeniu mogą powstawać duże gradienty

Tab. 1. Współczynnik korelacji (r) między czasem sonikacji a osiąganą redukcją liczby drobnoustrojów w wodzie (Aq) i 1% roztworze kwasu mlekowego (LA)

| Próbka | Środowisko | OLD | <i>Salmonella</i> |
|------------|------------|---------|-------------------|
| Skrzydełko | Aq | 0,956** | 0,564* |
| | LA | 0,899** | 0,835** |
| Ciecz | Aq | -0,514* | 0,017 |
| | LA | -0,522* | -0,233 |

Objaśnienia: * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$

ciśnienia, temperatury i potencjału elektrycznego. Mogą one prowadzić do nieodwracalnych zmian fizycznych i chemicznych w obrębie cytoplazmy komórki bakteryjnej, wzrostu przepuszczalności błony komórkowej, zachwiania równowagi jonowej, osmotycznej, koloidalnej, a w efekcie powodować inaktywację mikroorganizmów (5, 11).

Przypuszcza się, że w przypadku sonikacji prowadzonej w roztworze kwasu mlekowego synergia ultradźwięków i obniżonego pH sprzyja nietypowym zjawiskom sonobiologicznym prowadzącym do ograniczenia funkcji życiowych i inaktywacji bakterii. Podobne spostrzeżenia poczynili także inni autorzy (1, 7, 8), którzy potwierdzają wzmocnienie efektu sonikacji przez synergia metod fizycznych i chemicznych. Przyczyn zróżnicowanej podatności mikroorganizmów na sonikację upatruje się w bogactwie form mikroflory powierzchniowej drobiu. Dowiedziono, że oporność drobnoustrojów na ultradźwięki zależy od budowy ściany komórkowej, kształtu komórek i zdolności do wytwarzania form przetrwalnych (6, 13).

Na podstawie wyników badań stwierdzono wysokie, dodatnie współczynniki korelacji r (tab. 1) ubytku liczby bakterii na powierzchni skóry wyrażanego w $\log(N_0/N)$ i czasu sonikacji.

Współczynnik korelacji ogólnej liczby drobnoustrojów (OLD) na skrzydełkach i czasu trwania sonikacji przyjmował istotnie statystycznie wartości z przedziału $0,564 \div 0,956$ (tab. 1). Oznacza to, że jest możliwe uzyskanie wysokich wartości redukcji liczby mikroorganizmów poprzez wydłużanie czasu sonikacji, co stanowi potwierdzenie wyników badań innych autorów (1, 6-9, 11, 16). Dłuższe ekspozycje wiążą się nierozdzielnie z kumulacją efektów pochłaniania i dysypacji energii fal ultradźwiękowych w komórce bakteryjnej. W czasie sonikacji prowadzonej w warunkach wymiany ciepła z otoczeniem (temp. otoczenia ok. 20°C) trwającej 6 min., zaobserwowano liniowy wzrost temperatury cieczy (Aq, LA) w komorze roboczej o ponad $4,5^\circ\text{C}$. Wzrost temperatury środowiska sonikacji należy uznać za zjawisko naturalne, świadczące o wysokiej energetyczności oddziaływania ultradźwięków. Wydłużanie czasu sonikacji, jakkolwiek sprzyja inaktywacji mikroorganizmów, wywołuje wzrost temperatury ośrodka (5, 11).

Podsumowanie

Skuteczna inaktywacja mikroflory skóry tuszki drobiowej ze względu na nierówność powierzchni wciąż pozostaje problemem otwartym. Naturalnie wysoki poziom zakażenia tuszek drobiowych, warunki środowiska sprzyjające rozwojowi mikroorganizmów, niemożność stosowania substancji bakteriobójczych w stosunku do mięsa, rosnące standardy wymagań higienicznych, to tylko niektóre z czynników wpływających na poszukiwania metod mogących skutecznie podnieść bezpieczeństwo zdrowotne mięsa drobiowego i jego przetworów. Sonikacja jako metoda wykorzystująca zjawiska o naturze mechanicznej jest ze wszech miar obiecująca. Jak wykazują wyniki przeprowadzonych badań, obniżenie stopnia zakażenia mikrobiologicznego tuszek kurcząt brojlerów przekracza 90%, a przy zastosowaniu kwasu mlekowego – nawet 99%. Czas sonikacji jest determinowany przede wszystkim oczekiwany stopniem obniżenia zakażenia tuszki i dopuszczalnym wzrostem jej temperatury. Przyjmując, że sonikacja tuszek będzie prowadzona przed ich wychłodzeniem, kilkustopniowy wzrost temperatury środowiska drgań ultradźwiękowych nie wpłynie istotnie na właściwości fizykochemiczne mięsa.

Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają możliwość obniżenia zanieczyszczenia powierzchni skóry tuszek kurcząt brojlerów metodą sonikacji ultradźwiękami o niskiej częstotliwości i średnim natężeniu, prowadzonej w 1% roztworze kwasu mlekowego.

Piśmiennictwo

1. Anon.: Główny Inspektorat Sanitarny, Meldunki o zachorowaniach na choroby zakaźne i zatruciach w Polsce w 2005 roku. PZH, Warszawa 2006.
2. Alvarez I., Manas P., Sala F. J., Condon S.: Inactivation of Salmonella enterica serovar Enteritidis by ultrasonic waves under pressure at different water activities. Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69, 668-672.
3. Bolder N. M.: Decontamination of meat and poultry carcasses. Trends Food Sci. Technol. 1997, 8, 221-227.
4. Daczkowska-Kozon E.: Salmonella w żywności pochodzenia zwierzęcego – wykrywanie, zwalczanie. Mag. Przem. Mięś. 2006, 8-9, 112-114.
5. Dolatowski Z. J., Stasiak D. M.: Czystość mikrobiologiczna mięsa i szynki parzonej po obróbce ultradźwiękowej. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 2002, 1, 55-65.
6. Earnshaw R. G., Appleyard J., Hurst R. M.: Understanding physical inactivation processes – combined preservation opportunities using heat, ultrasound and pressure. Int. J. Food Microbiol. 1995, 28, 197-219.
7. Lillard H. S.: Bactericidal effect of chlorine on attached Salmonellae with and without sonication. J. Food Prot. 1993, 56, 716-717.
8. Lillard H. S.: Ultrasonic applications in the food industry. Decontamination of poultry skin by sonication. Food Technol. 1994, 48, 72-73.
9. Manas P., Pagan R., Raso J., Sala F. J., Condon S.: Inactivation of Salmonella Enteritidis, Salmonella Typhimurium and Salmonella Senftenberg by ultrasonic waves under pressure. J. Food Prot. 2000, 63, 451-456.
10. Oziębłowski M., Kopeć W.: Pulsed electric fields (PEF) as an unconventional method of food preservation. Pol. J. Food Nutr. Sci. 2005, 55, SI 1, 31-35.
11. Pijaseña P., Moharem E., McKellar R. C.: Inactivation of microbes using ultrasound: a review. Int. J. Food Microbiol. 2003, 87, 207-216.
12. Piotr J., Kluczek S.: Występowanie bakterii z rodzaju Staphylococcus wyizolowanych z materiału biologicznego środowiska hodowlanego brojlerów. Acta Sci. Pol., Zootech. 2002, 1, 95-102.
13. Sams A. R., Feria R.: Microbial effects of ultrasonication of broiler drumstick skin. J. Food Sci. 1991, 56, 247-248.
14. Śliwiński A.: Ultradźwięki i ich zastosowania. WNT, Warszawa 2001.
15. Wojtoń B.: Surowce pochodzenia zwierzęcego jako źródło zagrożeń mikrobiologicznych. Mat. konf. Bezpieczeństwo mikrobiologiczne produkcji żywności. Warszawa 18-19.11.1997, s. 37-44.
16. Wrigley D. M., Llorca N. G.: Decrease of Salmonella Typhimurium in skim milk and egg by heat and ultrasonic wave treatment. J. Food Prot. 1992, 55, 678-680.

Adres autora: dr inż. Dariusz M. Stasiak, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin;
e-mail: dariusz.stasiak@ar.lublin.pl