

Stanovení minimálních hodnot aktivity vody pro přežívání bakterií v kultivačním médiu

LIBOR ČERVENKA - JARMILA VYTRASOVÁ
- DAVID JELÍNEK - PAVEL BŘEZINA

SOUHRN. Pro vybrané bakteriální kmeny byly stanoveny minimální hodnoty aktivity vody (a_w) pro jejich přežívání za laboratorních podmínek v BHI bujónu za optimálního pH a kultivační teploty. Minimální hodnoty a_w pro přežívání bakterií byly závislé na typu humektantu (látky ovlivňující aktivitu vody a_w). V prostředí s glycerolem byly a_{wmin} nejnižší ve srovnání s ostatními humektanty. *Enterococcus faecalis* byl schopen růstu při $a_w > 0,76$ (6. den) zatímco v prostředí NaCl byla $a_w > 0,93$. *Pseudomonas fluorescens* rostl při $a_w > 0,95$ (glycerol, 6. den) a při $a_w > 0,98$ (NaCl, 6. den). Buňky *Escherichia coli* byly vitální při $a_w > 0,93$ (glycerol, 6. den) zatímco v prostředí NaCl rostly při $a_w > 0,96$. Sacharidy působily inhibičně na *Escherichia coli* a *Pseudomonas fluorescens* ($a_w > 0,97$ resp. 0,98, 6. den.) ve srovnání s *Enterobacter aerogenes* či *Enterococcus faecalis* ($a_w > 0,96$ resp. 0,93, sacharosa, 6. den).

KLÍČOVÁ SLOVA: aktivita vody; růst mikroorganismů; přežívání mikroorganismů

Voda je jedním z nejdůležitějších faktorů, které ovlivňují mikrobiální stabilitu potravin. Informace o množství vody v prostředí však není dostačující pro určení využitelnosti vody pro růst a metabolickou aktivitu mikroorganismů. Tuto využitelnost reprezentuje hodnota aktivity vody a_w , která má kromě toho vliv i na strukturu potravin, jejich barvu, chuť a aktivitu enzymů [1].

Každý mikroorganismus má odlišné nároky na aktivitu vody a_w v prostředí. Plísňe a kvasinky jsou v obecném měřítku tolerantní k nízkým hodnotám

Ing. Libor ČERVENKA, Katedra analytické chemie, Chemickotechnologická fakulta, Univerzita Pardubice, Štrossova 239, 530 03 Pardubice, Česká republika.

Ing. Jarmila VYTRASOVÁ, CSc., Ing. David JELÍNEK, Katedra biologických a biochemických věd, Chemickotechnologická fakulta, Univerzita Pardubice, Štrossova 239, 530 03 Pardubice, Česká republika.

Prof. Ing. Pavel BŘEZINA, CSc., Katedra ekonomiky a hygieny výživy, Fakulta ekonomiky obrany státu, Vysoká vojenská škola pozemního vojska, Váta Nejedlého, 682 03 Vyškov 3, Česká republika.

Korešpondující autor: Ing. Libor ČERVENKA, e-mail: libor.cervenka@upce.cz

a_w [2]. Bakterie jsou však citlivější ke změnám vodní aktivity v prostředí a platí, že gramnegativní bakterie jsou ve srovnání s grampozitivními bakteriemi senzitivnější [3]. V principu existuje pouze jeden způsob jak změnit aktivitu vody a_w v prostředí. Podle fyzikální definice [4] můžeme aktivitu vody a_w ovlivnit změnou koncentrace rozpustných látek v roztoku a to sušením, zmrazováním nebo přidávkem rozpustných látek (humektantů). Za přesně definovaných podmínek existuje pro každý mikroorganismus tzv. minimální hodnota aktivity vody a_w [5]. Pokud je v potravině dosaženo hodnoty nižší než je minimální hodnota a_w , mikroorganismus již není schopen růstu, dochází k inaktivaci a počet buněk se s časem mnohonásobně redukuje [6].

Cílem této práce bylo zjištění minimálních hodnot a_w pro přežívání vybraných druhů patogenních a podmíněně patogenních bakterií v závislosti na typu přidané látky, čase a počáteční koncentraci buněk.

Materiál a metody

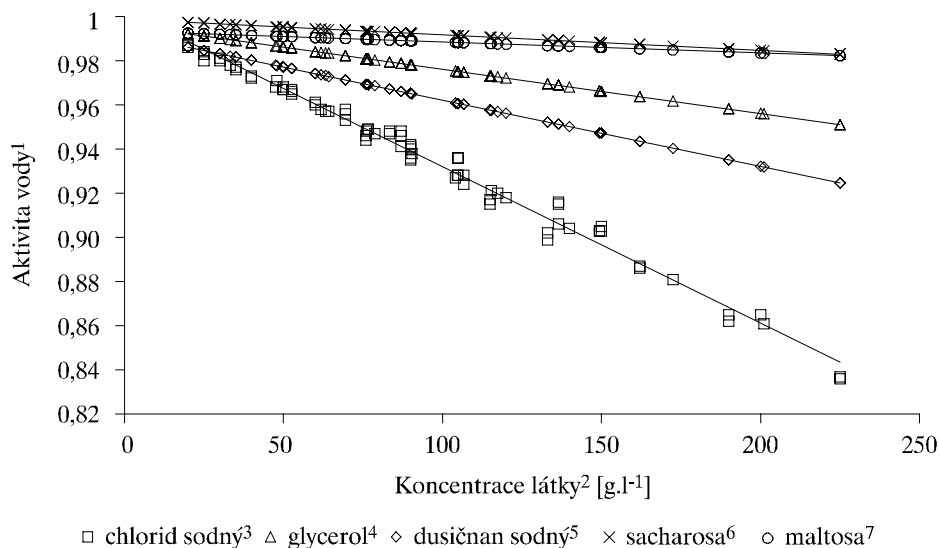
Byly testovány bakterie, které se nejčastěji vyskytují ve vodách a potravinách: *Escherichia coli* CCM3954, *Enterobacter aerogenes* CCM2531, *Enterococcus faecalis* CCM4224 a *Pseudomonas fluorescens* CCM1074 (Čs. sbírka mikroorganismů, Brno, ČR).

Jako růstové médium byl připraven bujón s mozko-srdcovou infúzí (BHI Broth; HiMedia, Bombay, India) s přidávkem NaCl (0,99–0,75 a_w), glycerolu (0,99–0,45 a_w), NaNO₃ (0,99–0,90 a_w), sacharosy (0,99–0,92 a_w) a maltosy (0,99–0,96 a_w) v 0,005 a_w intervalech. Do zkumavek (15 ml) s takto připraveným sterilním roztokem bylo napipetováno 50 μ l 24-hodinové bakteriální suspenze tak, aby počáteční koncentrace buněk byla 10⁴ KTJ.ml⁻¹ resp. 10⁷ KTJ.ml⁻¹. Kultivace proběhla při 37 °C s výjimkou *P. fluorescens* (30 °C). Obsah zkumavek byl vyočkován 1., 3. a 6. den kultivace na živný agar č. 2 (HiMedia, Bombay, India). Aktivita vody připravených půd byla měřena na přístroji AW-Sprint TH 500 (fy Novasina, Švýcarsko). Celý experiment byl proveden ve třech nezávislých sériích.

Výsledky a diskuse

Látky, které v roztoku disociují (NaCl , NaNO_3), mají značný vliv na snížení a_w v daném koncentračním rozmezí ve srovnání s vysokomolekulárními látkami (glycerol, sacharosa, maltosa) (obr. 1). Tyto rozdíly lze vysvětlit různou afinitou molekul látek k molekulám vody. Aktivita vody je také závislá na molekulové hmotnosti rozpuštěné látky a rozpouštědla a proto se křivky těchto závislostí u sacharosy a maltosy téměř překrývají (molekulová hmotnost obou sacharidů je totožná).

V tab. 1 až 4 je uvedeno, jak koreluje počáteční koncentrace buněk s minimální hodnotou a_w . Vliv počáteční koncentrace buněk na změny minimální hodnoty a_w během 6 dnů kultivace byl prokázán u *Escherichia coli*, kde byla a_w ovlivněna přidavky NaCl a sacharosy, *Enterobacter aerogenes* (a_w byla ovlivněna glycerolem) a *Enterococcus faecalis* (a_w ovlivněna NaNO_3). Všechny testované kmeny vykazovaly větší toleranci k nízkým hodnotám a_w v prostředí, které bylo upravené glycerolem. V roztocích s přidavkem dusičnanu sodného se inhibiční účinek projevil převážně antimikrobiálním vlivem této



OBR. 1. Vliv přidavných látek na aktivitu vody v BHI bujónu.

FIG. 1. Influence of humectants on water activity in BHI broth.

1 - water activity, 2 - concentration of the humectant, 3 - sodium chloride, 4 - glycerol, 5 - sodium nitrate, 6 - sucrose, 7 - maltose.

TAB. 1. Minimální hodnoty a_w pro přežívání *Pseudomonas fluorescens* v BHI bujónu při pH 7,4 a 30 °C v závislosti na typu humektantu a počáteční koncentraci buněk.

TAB. 1. Minimum a_w values for the survival of *Pseudomonas fluorescens* in BHI broth at pH 7.4 and 30 °C as affected by the type of humectant and initial cell concentration.

Typ látky ¹	Doba kultivace [dny] ²	Minimální a_w ³	Doba kultivace [dny]	Minimální a_w
	PKB - 10 ⁴ KTJ.ml ⁻¹		PKB - 10 ⁷ KTJ.ml ⁻¹	
glycerol ⁴	1	0,920	1	0,920
	3	0,950	3	0,940
	6	0,950	6	0,950
chlorid sodný ⁵	1	0,970	1	0,970
	3	0,980	3	0,980
	6	0,980	6	0,980
dusičnan sodný ⁶	1	0,995	1	0,990
	3	0,995	3	0,990
	6	0,995	6	0,995
sacharosa ⁷	1	0,970	1	0,970
	3	0,970	3	0,970
	6	0,970	6	0,970
maltosa ⁸	1	0,980	1	0,980
	3	0,985	3	0,980
	6	0,985	6	0,980

PKB - počáteční koncentrace buněk [KTJ.ml⁻¹].

PKB - initial cell concentration [CFU.ml⁻¹].

1 - type of humectant, 2 - time of incubation [days], 3 - minimum a_w , 4 - glycerol, 5 - sodium chloride, 6 - sodium nitrate, 7 - sucrose, 8 - maltose.

látky. Dusičnany se používají v masných výrobcích pro potlačení růstu a tvorby toxinu bakterie *Clostridium botulinum*. Dusičnany jsou redukovány některými mikroorganismy v potravinách nebo střevní mikroflórou (in vivo) na dusitany, kterým se připisuje hlavní podíl na baktericidním účinku. Bakterie *Escherichia coli* je inhibována koncentrací 400 µg.ml⁻¹ dusitanů ve směsi s 6% NaCl (10 °C, pH 5,6). Koncentrace 200 µg.ml⁻¹ (pH 6) stačí k inhibici bakterií rodu *Enterobacter* a *Pseudomonas* [7]. *Pseudomonas fluorescens* je citlivý ke změnám a_w prostředí a přežíval pouze při vyšších hodnotách ($a_w > 0,97$). Podobných výsledků bylo dosaženo také s bakteriemi rodu *Arco-bacter* ($a_w > 0,98$) [8]. Bakterie tohoto rodu byly izolovány ze vzorků masa

[9] a jsou dávány do souvislosti s enteritidami u lidí [10]. Pro izolaci arko-bakterů z potravin dosud neexistuje žádná standardní metoda. Velmi nízkých minimálních hodnot a_w (0,92–0,95) ve srovnání s ostatními humektanty bylo dosaženo v prostředí s glycerolem. Výsledky jsou shrnuty v tab. 1. Odolnost *Pseudomonas fluorescens* vůči nízké a_w ovlivněné glycerolem byla prokázána také při růstu této bakterie v laboratorním médiu obsahující glukosu, chlorid sodný a stopové prvky [11]. Rozdíl mezi působením NaCl, glycerolu a glukosy na dynamiku růstu byl popsán také u halotolerantní bakterie *Brevibacterium linens*. Bylo zjištěno, že glycerol a glukosa vyvolaly u tohoto mikroorganismu významné prodloužení lag-fáze, po které následo-

TAB. 2. Minimální hodnoty a_w pro přežívání *Enterococcus faecalis* v BHI bujónu při pH 7,4 a 37 °C v závislosti na typu látky a počáteční koncentraci buněk.

TAB. 2. Minimum a_w values for the survival of *Enterococcus faecalis* in BHI broth at pH 7.4 and 37 °C as affected by the type of humectant and initial cell concentration.

Typ látky ¹	Doba kultivace [dny] ²	Minimální a_w ³	Doba kultivace [dny]	Minimální a_w
	PKB - 10 ⁴ KTJ.ml ⁻¹		PKB - 10 ⁷ KTJ.ml ⁻¹	
glycerol ⁴	1	0,550	1	0,550
	3	0,660	3	0,550
	6	0,760	6	0,760
chlorid sodný ⁵	1	0,865	1	0,835
	3	0,880	3	0,860
	6	0,935	6	0,930
dusičnan sodný ⁶	1	0,960	1	0,940
	3	0,960	3	0,940
	6	0,960	6	0,940
sacharosa ^{7*}	1	0,925	1	0,925
	3	0,925	3	0,925
	6	0,925	6	0,925
maltosa ^{8*}	1	0,960	1	0,960
	3	0,960	3	0,960
	6	0,960	6	0,960

PKB - počáteční koncentrace buněk [KTJ.ml⁻¹], * - minimální a_w nezjištěny.

PKB - initial cell concentration [CFU.ml⁻¹], * - minimum a_w not determined.

1 - type of humectant, 2 - time of incubation [days], 3 - minimum a_w , 4 - glycerol, 5 - sodium chloride, 6 - sodium nitrate, 7 - sucrose, 8 - maltose.

TAB. 3. Minimální hodnoty a_w pro přežívání *Enterobacter aerogenes* v BHI bujónu při pH 7,4 a 37 °C v závislosti na typu látky a počáteční koncentraci buněk.

TAB. 3. Minimum a_w values for the survival of *Enterobacter aerogenes* in BHI broth at pH 7.4 and 37 °C as affected by the type of humectant and initial cell concentration.

Typ látky ¹	Doba kultivace [dny] ²	Minimální a_w ³	Doba kultivace [dny]	Minimální a_w
	PKB - 10 ⁴ KTJ.ml ⁻¹		PKB - 10 ⁷ KTJ.ml ⁻¹	
glycerol ⁴	1	0,890	1	0,855
	3	0,890	3	0,890
	6	0,910	6	0,900
chlorid sodný ⁵	1	0,905	1	0,905
	3	0,915	3	0,905
	6	0,950	6	0,930
dusičnan sodný ⁶	1	0,975	1	0,975
	3	0,975	3	0,975
	6	0,975	6	0,975
sacharosa ⁷	1	0,925	1	0,925
	3	0,925	3	0,925
	6	0,960	6	0,940
maltosa ^{8*}	1	0,960	1	0,960
	3	0,960	3	0,960
	6	0,960	6	0,960

PKB - počáteční koncentrace buněk [KTJ.ml⁻¹], * - minimální a_w nezjištěna.

PKB - initial cell concentration [CFU.ml⁻¹], * - minimum a_w not determined.

1 - type of humectant, 2 - time of incubation [days], 3 - minimum a_w , 4 - glycerol, 5 - sodium chloride, 6 - sodium nitrate, 7 - sucrose, 8 - maltose.

vala strmá logaritmická fáze. Osmoučinná látka NaCl nezpůsobila prodloužení lag-fáze a logaritmická fáze růstu byla totožná s růstem v kontrolním pokusu [12]. *Enterococcus faecalis*, který také náleží do skupiny bakterií tolerantních k vyšším koncentracím solí, je schopen přežít v prostředí s NaCl ($a_w > 0,93$) nebo glycerolem ($a_w > 0,76$) i po 6. dni kultivace. Tato skutečnost je v rozporu se zjištěním, že při podobných hodnotách a_w halotolerantní bakterie více inhibuje glycerol než NaCl [13]. Během doby kultivace došlo k výraznému zvýšení minimální hodnoty a_w v prostředí upravené NaCl. Dynamika změn minimálních hodnot a_w tohoto kmenu je uvedena

TAB. 4. Minimální hodnoty a_w pro přežívání *Escherichia coli* v BHI bujónu při pH 7,4 a 37 °C v závislosti na typu látky a počáteční koncentraci buněk.

TAB. 4. Minimum a_w values for the survival of *Escherichia coli* in BHI broth at pH 7.4 and 37 °C as affected by type of humectant and initial cell concentration.

Typ látky ¹	Doba kultivace [dny] ²	Minimální a_w ³	Doba kultivace [dny]	Minimální a_w
	PKB - 10 ⁴ KTJ.ml ⁻¹		PKB - 10 ⁷ KTJ.ml ⁻¹	
glycerol ⁴	1	0,915	1	0,915
	3	0,930	3	0,930
	6	0,930	6	0,930
chlorid sodný ⁵	1	0,950	1	0,940
	3	0,960	3	0,950
	6	0,960	6	0,960
dusičnan sodný ⁶	1	0,975	1	0,970
	3	0,975	3	0,970
	6	0,975	6	0,970
sacharosa ⁷	1	0,960	1	0,925
	3	0,970	3	0,940
	6	0,970	6	0,970
maltosa ^{8*}	1	0,970	1	0,960
	3	0,975	3	0,970
	6	0,975	6	0,970

PKB - počáteční koncentrace buněk [KTJ.ml⁻¹].

PKB - initial cell concentration [CFU.ml⁻¹].

1 - type of humectant, 2 - time of incubation [days], 3 - minimum a_w , 4 - glycerol, 5 - sodium chloride, 6 - sodium nitrate, 7 - sucrose, 8 - maltose.

v tab. 2. *Enterobacter aerogenes*, významný producent histaminu, byl schopen přežít 6. den kultivace v prostředí, kde byla a_w ovlivněna NaCl (0,93–0,95) a glycerolem (0,90–0,91). Data jsou uvedeny v tab. 3. Minimální hodnoty a_w pro přežívání *Escherichia coli* se během 6 dnů kultivace zvýšily v prostředí, kde byla a_w ovlivněna NaCl, z 0,93 na 0,96 a z 0,915 na 0,93 v přítomnosti osmoučinné látky glycerolu, jak je uvedeno v tab. 4. Tato zjištění jsou v souladu a růstem patogenního kmenu *Escherichia coli* O157:H7, který byl uměle inokulován do salámu (pH 4,86, a_w 0,95). Po 32 dnech skladování při 20 °C (v závislosti na počáteční denzitě buněk) však byly tyto bakterie stále vitální

a mohly by tak způsobit vážné alimentární intoxikace [14]. Bakterie *Enterococcus faecalis* a *Enterobacter aerogenes* byly schopny růstu také v médiu s nasyceným roztokem maltosy a sacharosy i 6. den kultivace, proto zde nebyly stanoveny minimální hodnoty a_w , jak je patrné z tab. 2 a 3. Vitalita enterokoků při těchto hodnotách a_w může negativně ovlivnit kvalitu potravin s nízkou hodnotou a_w , zejména při sekundární kontaminaci při výrobě či distribuci. Bakterie *Enterococcus faecalis* byly schopny růstu při překvapivě nízkých hodnotách a_w ovlivněných NaNO_3 ($a_w > 0,96$ resp. $a_w > 0,94$). Tento bakteriální kmen byl obecně nejodolnější k nízkým hodnotám a_w v prostředí, zatímco *Pseudomonas fluorescens* byl na ztrátu množství využitelné vody velice citlivý.

Závěr

Minimální hodnota aktivity vody a_w pro přežívání bakterií je závislá na typu humektantu přidaného do prostředí. Výrazně nižší minimální hodnoty a_w dosažené s použitím glycerolu ve srovnání s ostatními látkami lze vysvětlit rozdílným mechanismem působení na bakteriální buňky. Používali se pro úpravu některých potravin glycerol, je nutné vzhledem k nízkým minimálním a_w pro přežívání určitých bakterií striktně dodržovat hygienu při výrobě a skladování. Závislost počáteční koncentrace buněk na minimální a_w v prostředí byla prokázána pouze při růstu *Enterococcus faecalis* v přítomnosti osmoučinné látky NaNO_3 , nicméně v tomto případě se jedná spíše o antimikrobiální účinek dusičnanů. Jestliže nízká hodnota a_w inhibuje růst kultury, celkový počet buněk se sníží a to má za následek zvýšení minimální a_w .

Práce mohla vzniknout za finanční podpory grantu GA ČR 203/99/0044.

Literatura

1. VALÍK, L. - GÖRNER, F.: Metódy merania aktivity vody. Bulletin potravinárského výskumu, 35, 1996, č. 1-2, s. 79-85.
2. CHIRIFE, J. - BUERA, M. P.: Water activity, water glass dynamics, and the control of microbiological growth in foods. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36, 1996, č. 5, s. 465-513.

3. ROIG-SAGUÉS, A. X. - HERNÁNDEZ-HERRERO, M. M. - LÓPEZ-SABATER, E. I. - RODRÍGUEZ-JEREZ, J. J. - MORA-VENTURA, M. T.: Microbiological events during the elaboration of „fuet“, a Spanish ripened sausage. *European Food Results Technology*, 209, 1999, s. 108-112.
4. SCOTT, W. J.: Water relations of food spoilage microorganisms. *Advances in Food Research*, 7, 1957, s. 83-127.
5. NOLAN, D. A. - CHAMBLIN, D. C. - TROLLER, J. A.: Minimal water activity levels for growth and survival of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. *International Journal of Food Microbiology*, 16, 1992, s. 323-335.
6. JUNG, Y. S. - BEUCHAT, L. R.: Survival of multidrug-resistant *Salmonella typhimurium* DT104 in egg powders as affected by water activity and temperature. *International Journal of Food Microbiology*, 49, 1999, s. 1-8.
7. SINGHAL, R. S. - KULKARWI, P. R.: Permitted preservatives - nitrate and nitrite. In: ROBINSON, R. K. (Ed.): *Encyclopedia of food microbiology*. Bath, UK : Academic Press, 2000, s. 1762-1769.
8. ČERVENKA, L. - VYTRÁSOVÁ, J.: Optimalizace růstu rodu *Arcobacter*. In: *Mikrobiologie potravin a výhledy do 3. tisíciletí*, 24.-25.5.2001, Třešť, ČR. Praha : Akademie věd ČR, 2001, s. 65-67.
9. COLLINS, C. L. - WESLEY, I. V. - MURANO, E. A.: Detection of *Arcobacter* spp. in ground pork by modified plating methods. *Journal of Food Protection*, 59, 1996, s. 448-452.
10. KIEHLBAUCH, J. A. - BRENNER, D. J. - NICHOLSON, M. A. - BAKER, C. N. - PATTON, C. M. - STEIGERWALT, A. G. - ANDWACHSMUTH, I. K.: *Campylobacter butzleri* sp. nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness. *Journal of Clinical Microbiology*, 29, 1991a, s. 376-385.
11. PRIOR, B. A.: The effect of water activity on the growth and respiration of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Applied Bacteriology*, 44, 1978, s. 97-106.
12. VALÍK, L. - ZEMANOVIČ, J. - GÖRNER, F.: Vplyv glycerolu, glukózy a NaCl na rast *Brevibacterium linens*. *Bulletin potravinárského výskumu*, 33 (13), 1994, č. 3-4, s. 205-212.
13. MARSHALL, B. J. - OHYE, D. F. - CHRISTIAN, J. H. B.: Tolerance of bacteria to high concentrations of NaCl and glycerol in the growth medium. *Applied Microbiology*, 21, 1971, č. 2, s. 363-364.
14. CLAVERO, M. R. S. - BEUCHAT, L. R.: Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influences by pH, water activity and temperature and suitability of media for its recovery. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1996, č. 8, s. 2735-2740.

Do redakcie došlo 6.11.2001.

Determination of minimum water activity values for the survival of bacteria in a culture medium

ČERVENKA, L. - VYTRÁSOVÁ, J. - JELÍNEK, D. - BŘEZINA, P.:
Bull. potrav. Výsk., 41, 2002, p. 59-68.

SUMMARY. Minimum water activity (a_w) values for the survival of selected bacterial strains were determined in BHI broth at optimum pH and culture temperature. Minimum a_w for the survival of bacteria depended on the type of humectant (a compound affecting the water

activity). A_{wmin} were lowest in the broth adjusted with glycerol as compared with other humectants tested. *Enterococcus faecalis* was able to grow at $a_w > 0.76$ (6th day) while at $a_w > 0.93$ in the broth adjusted with NaCl. *Pseudomonas fluorescens* was able to grow at $a_w > 0.95$ (glycerol, 6th day) and at $a_w > 0.98$ (NaCl, 6th day). Cells of *Escherichia coli* were vital at $a_w > 0.93$ (glycerol, 6th day) while in the presence of NaCl grew at $a_w > 0.96$. Saccharides inhibited *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens* ($a_w > 0.97$ and 0.98 , respectively, 6th day) more than *Enterobacter aerogenes* or *Enterococcus faecalis* ($a_w > 0.96$ and 0.93 , respectively, sucrose, 6th day).

KEYWORDS: water activity; growth of microorganisms; survival of microorganisms