Vplyv úderov elektrického napätia na mikroflóru charakteristickú pre koreň cukrovej repy

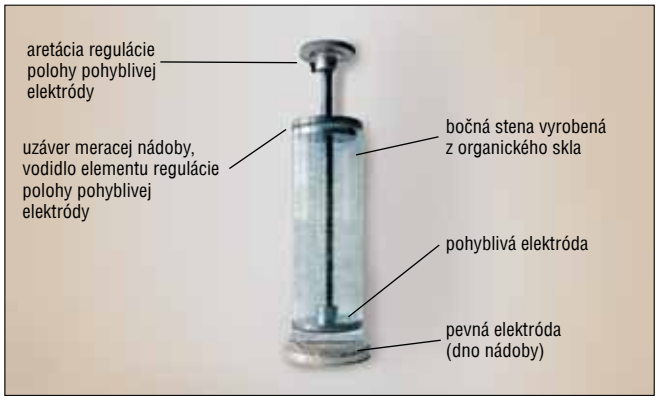
THE INFLUENCE OF PULSED ELECTRIC FIELDS ON THE TYPICAL MICROFLORA OF SUGAR-BEET ROOT

Stanisław Wawro, Radosław Gruska, Alina Kunicka-Styczyńska – Technická univerzita Lodž, Polsko

Mikroorganizmy patria k základným zložkám pôdy. Určujú pôvodnú úroveň, intenzívne sa rozvíjajúcu v pôde upravenej dodatočne obohatenej hnojením. Z tohto pohľadu v spracovateľskom priemysle využívajúcom rastlinnú surovinu je častým problémom otázka mikrobiologickej nákazy, ktorá je výsledkom nedostatočného očistenia rastlín od zbytkov zeminy, ako aj zlej dezinfekcii. Tento problém sa taktiež dotýka aj európskeho cukrovarníctva, ktoré na výrobu sacharózy využíva cukrovú repu. V tomto prípade zdrojom kontaminácie sú mikroorganizmy, ktoré prichádzajú do technologického procesu v dôsledku nedostatočného vyčistenia cukrovej repy v pračke. Zostatky na kôre sladkých rezkov okamžite prechádzajú do extraktora a sú hlavnou príčinou veľkých strát sacharózy. Vzhľadom na podmienky panujúce v počas skladovania a prania cukrovej repy ako aj extrakcie sacharózy z rezkov, mikrobiologické straty sacharózy môžu vznikať pôsobením mikroorganizmov rovnako aeróbnych, anaeróbnych ako aj mezofilných a termofilných. Väčšinou sú straty sacharózy spojené so spotrebovaním sacharózy v metabolických procesoch mikroorganizmov a sú príčinou zníženia výťažnosti sacharózy tvorbou vysokomelasotvorných metabolitov mikroorganizmov. Medzi najviac rozšírené spôsoby vedúce k zabráneniu nadmerného rozvoja mikroorganizmov v priebehu získania sacharózy patria:

– krátke doby skladovanie cukrovky,
– použitie vápna na miesta skladovanie cukrovky,
– dôkladné odstránenie nečistôt (zeminy) priľnutej na koreni,
– pridávanie aseptických látok do repnej pračky a extraktora (napr. formaldehydu,oxidu siričitého, peroxidu vodíka),
– sparovanie sladkých rezkov a ich rýchle ohriatie v extraktore na teplotu nad 70 °C.

Obr. 1. Merací prístroj, v ktorom boli mikroorganizmy podrobené účinku bleskových elektrických výbojov elektrického poľa



V priemyselnej praxi najlepšie efekty sa dosahujú aplikáciou všetkých vyššie uvedených spôsobov. Napriek tomu sa však ukazuje, že skutočnosť uvedených činnosti je nedostačujúca, najmä vtedy. ak sa z dôvodov ekonomických alebo zmenou iných podmienok obmedzí napr. použitie chemikálií. Vtedy sa ukáže nutnosť hľadania dodatočného činiteľa , ktorý by umožnil udržanie nízkej hladiny mikrobiologickej kontaminácie (1).

Materiál a metodika výskumu

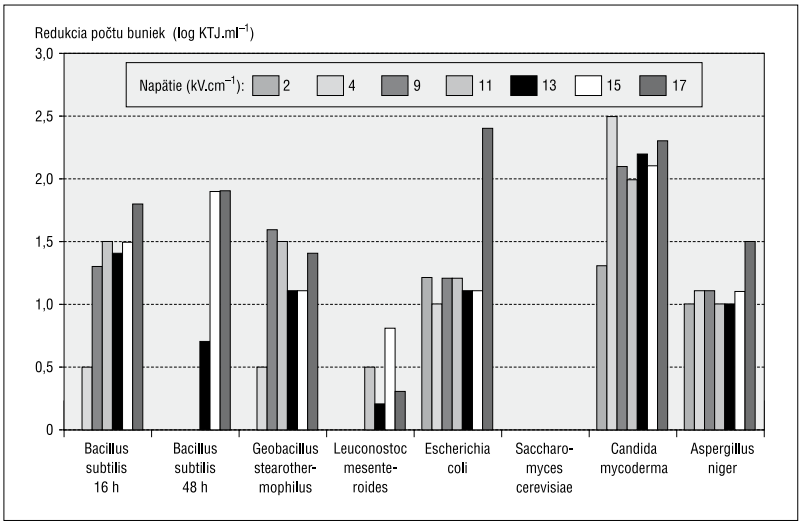
Pre výskum sa použili štyri druhy baktérií: *Bacillus subtilis, Geobacillus stearothermophilus, Leuconostoc mesenteroides a Escherichia coli;,* dva druhy kvasiniek: *Saccharomyces cerevisiae,* a *Candida mycoderma* ako aj plesni *Aspergillus niger.* Mikroorganizmy pochádzali z Banky čistých kultúr Inštitútu fermentácie a mikrobiologie Politechniky Łódzkej LOCK 103. Baktérie boli kultivované na substráte (Trypticase soy Broth) Oxoid. Pre kvasinky bol použitý substrát YPG, plesne pestované 5 PLG pivovarskej sladibne s prídavkom 1,5 % agaru. Určený objem (50 ml, 80 ml, 120 ml a 200 ml) daného substrátu bol inokulovaný aktívnou kultúrou baktérií, alebo plesní a inkubovaný 24 hodín pri teplote 30 °C alebo pri teplote 55 °C (baktérie *Geobacillus stearothermophilus).* Suspenzie mikroorganizmov boli štandardizované na úroveň 5–6.10^6 jtk.ml^{-1} pomocou sterilného substrátu. Kultivácia plesní *Aspergillus niger* bola vykonaná v trvaní 5 dní pri teplote 25 °C pričom zo šikmého povrchu sa zbierali konídiá a útržky húb do čistého substrátu ZPG. Suspenzie boli štandardizované podobne ako v prípade baktérií. Takisto bol sledovaný vplyv bleskových napäťových výbojov na prežitie baktérií *Geobacillus stearothermophilus ATTC 10149.* Vegetatívne formy boli zlikvidované zahriatím suspenzie biomasy na teplotu 81 °C v trvaní 10 minút. Suspenzie s jedincami, ktorí prežili, boli uchovávané pri teplote 4 °C. Počet prežívajúcich spór bol stanovený štandardnou povrchovou metódou na substráte TSB. Inkubácia bola vykonaná v trvaní 48 hodín pri teplote 85 °C.

Suspenzia mikroorganizmov, umiestnená v špeciálnej nádobe (obr. 1.), bola podrobená účinku elektrických výbojov v oblasti napätia elektrického poľa 2–60 kV.cm^{-1}, merali sa jednotlivé impulzy v niekoľkonásobnom opakovaní počtu impulzov 3, 5, 10 i 20×.

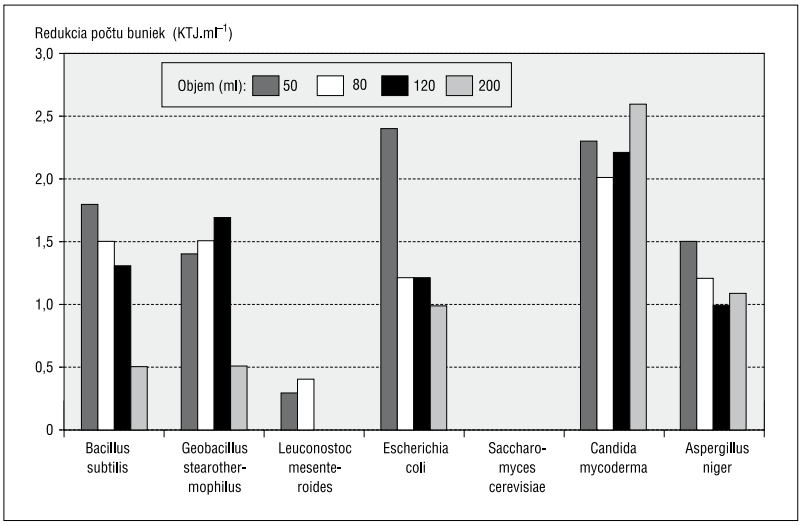
Elektrické výboje produkoval generátor elektrického napätia, ktorého schému možno nájsť v skorších publikáciách (1). Dodatočne, podľa elektrických výbojov v oblasti od napätia elektrického poľa 20–60 kV.cm^{-1} testoval sa vplyv druhu emulgátora na prežitie kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* a baktérií *Geobacillus stearothermophilus,* suspendujúc bunky mikroorganizmov v sterilnom substráte alebo sterilnej destilovanej vode.

Štandardná suspenzia kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida mycoderma* o objemu 5 ml sa nanášala na povrch koliesok očisteného koreňa cukrovej repy a bola podrobená účinku elektrického poľa o napätí v intervale 2–17 kV.cm^{-1}. Podľa sústavy usporiadania tkaniva koreňa cukrovej repy, suspenzia kvasiniek a počty výbojov elektrického poľa o napätí 9–17 kV.cm^{-1} sa zväčšili niekoľkokrát, 3–5×. Počty živých buniek mikroorganizmov v suspenziách sa stanovili impedimetrickou metódou, s použitím impedimetričného systému Bactomer M64 (bioMerieux). Na kultiváciu baktérií sa použil aj prídavok agarovej živnej pôdy PGM-Plus (bioMerieux), kvasinky a plesne boli kultivované na živnej pôde YMM (bioMerieux). Počty živých buniek boli stanovené v jednotkách tvoriacich sa kolón, pripadajúcich na 1 ml (KTJ.ml^{-1}). Prezentované sú výsledky počtov populácie o aritmetickom priemere z 3 opakovaných meraní. Štandardná odchýlka neprekročila ±0,01 logaritmickej jednotky.

Obr. 2. Vplyv napätia elektrického poľa na prežitie mikroorganizmov



Obr. 3. Vplyv objemu média na prežitie mikroorganizmov (napätie generátora 17 kV)



Výsledky

Vplyv elektrického poľa na prežitie mikroorganizmov

Vplyv výbojov elektrického napätia na prežitie mikroorganizmov sa skúmal v modelových podmienkach, kde sa testovali druhy mikroorganizmov, vyselektovaných ako mikroflóra znečistenia koreňov cukrovej repy. Boli vybrané tri druhy Gram-pozitívnych baktérií: kyslíkové baktérie *Bacillus subtilis,* všeobecne sa nachádzajúce v prírodnom prostredí, kyslíkové termofilné baktérie *Geobacillus stearothermophilus* a tiež uznávaný mezofyl *Leuconostoc mesenteroides.* Baktérie *Geobacillus stearothermophilus* ako aj *Leuconostoc mesenteroides* sa vyznačujú vysokou odolnosťou voči účinku vysokých teplôt, prežívajú operácie o vysokej teplote pri výrobe cukru a tvoria slizovité zrazeniny. Gram-negatívne baktérie *Escherichia coli* boli vybrané ako mikroorganizmy indikátorov sanitárnej čistoty hotového produktu, ktoré môžu byť privedené pôdou i vodou. Testovanie druhov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida mycoderma* ako aj plesne *Aspergillus niger* sú prinášané surovinami a potenciálne môžu byť príčinou znečistenia finálneho výrobku. Vysokoteplotné operácie technologického procesu a vysoké osmotické tlaky pôsobia redukčné na mikroflóru privádzanú surovinou. Pozoruje sa jednak výstup druhov odolných vysokej teplote i zvýšeniu osmotického tlaku. Uvedené mikroorganizmy môžu byť podstatnou príčinou strát cukru predovšetkým v dôsledku spotrebovania cukru v metabolických procesoch ako aj zníženie výťažnosti cukru účinkom prívodu melasotvorných produktov metabolizmu do šťavy. Výsledky výskumu sú uvedené na obr. 2.

Baktérie *Bacillus subtilis* sa ukázali pomerne odolné účinkom napäťových výbojov.

V prírodnom prostredí populácia baktérií *Bacillus subtilis* sa nachádza obvykle v podobe zmesi buniek vegetatívnych aj prežívajúcich, čo v modelových podmienkach sme získali predlžením času kultivácie zo 16 na 48 hodín. V použitom rozsahu napätia elektrického poľa 2–17 kV.cm^{-1} po 48hodinovej kultivácii dosiahla sa malá redukcia iba pri napätí elektrického poľa 13 kV.cm^{-1}. V prípade 16hodinovej kultivácie prvé známky poklesu populácie sa dosiahli už pri napätí elektrického poľa 4 kV.cm^{-1}, pričom najväčšia redukcia mikroorganizmov, 1,8 logaritmickej jednotky, sa dosiahla pri napätí elektrického poľa 17 kV.cm^{-1}. V populácii po 48hodinovej kultivácii baktérie *Bacillus subtilis* podrobenej účinku elektrického poľa 15 kV.cm^{-1} sa dosiahla redukcia počtu buniek 1,9 logaritmickej jednotky, pričom zvýšenie napätia elektrického poľa na 17 kV.cm^{-1} nezmenilo prežitie populácie (obr. 2). Účinkom napäťových elektrických výbojov o napätí elektrického poľa v rozsahu 0–600 kV.cm^{-1} a počtu 1–25 na suspenziu prežívajúcich *Geobacillus stearothermophilus,* nedosiahlo sa podstatného zníženia ich počtu. Svedčí to prakticky o necitlivosti spór na elektrické pole v rozsahu do 60 kV.cm^{-1}.

Inakšie sa chová populácia obsahujúca rovnako bunky vegetatívne aj prežívajúce baktérie *Geobacillus stearothermophilus,* vykazujú citlivosť na účinok elektrického poľa v rozsahu 4–17 kV.cm^{-1}. Viditeľná redukcia počtu populácii (1,6 logaritmickej jednotky) bola zaznamenaná už pri použitiu napätia

Tab. I. Vplyv počtu impulzov na prežitie mikroorganizmov (napätie elektrického poľa 17 KV.cm^{-1}, objem 50 ml)

Mikroorganizmus	Počet impulzov					
	1	3	5	10	20	5**
	Redukcia počtu buniek (log KTj.ml^{-1})					
Bacillus subtilis	1,8	1,0	3,9	1,3	0,9	0,4
Geobacillus stearothemophilus	1,4	0,8	0,8	0,9	0,3	0,5
Leuconostoc mesenteroides	0,3	0	0	0,1	0	0
Escherichia coli	2,4	1,7	1,7	2,1	1,7	1,0
Saccharomyces cerevisiae	0	0	0	0,5	0,7	0,7
Candida mycoderma	2,3	2,3	2,5	2,8	2,8	1,1
Aspergillus niger	1,5	1,1	1,1	1,5	1,1	1,1

*** Objem suspenzie bol 120 ml.*

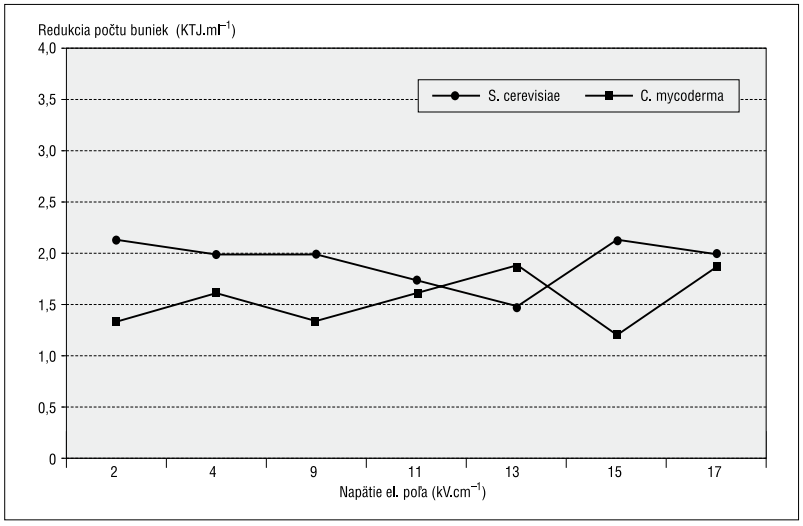
elektrického poľa 9 kV.cm^{-1} (obr. 3.). Uvedené výsledky sa porovnávali s výskumami Cserhalmi et al. (2) o prežití spór a kyslíkových baktérii *Bacillus cereus*. Spóry *Bacillus cereus* podrobené účinkom vysokonapäťového elektrického poľa o napätí 0–25 kV.cm^{-1} ostali prakticky neporušené. Počet vegetatívnych buniek týchto baktérií bol 1,1 logaritmických jednotiek pri účinku elektrického poľa o napätí 20 kV.cm^{-1} pri počte vysokonapäťových impulzov rovný 4. Baktérie *Bacillus subtilis* a *Geobacillus stearothermophilus* patria do tej istej skupiny prežívajúcich kyslíkových baktérií ako *Bacillus cereus*. Citlivosť vegetatívnych buniek *Bacillus cereus* na účinok elektrického poľa o napätí 15–20 kV.cm^{-1} (2) je podobná ako pri 16hodinovej kultivácii *Bacillus subtilis*. Výrazné rozdiely citlivosti 48hodinovej populácii *Bacillus subtilis* i *Geobacillus stearothermophilus* vyplývajú z odlišného účinku elektrického poľa na vegetatívne i prežívajúce bunky baktérií.

Zvýšenie napätia elektrického poľa na 20, 30 a 40 kV.cm^{-1} nespôsobilo podstatnú redukciu počtu populácie baktérií *Geobacillus stearothermophilus* a ich počet bol iba 1,6–1,7 logaritmických jednotiek (tab. II.). Redukcia počtu buniek a spór baktérií o 2,0 a 2,2 logaritmické jednotky sa dosiahla pri použití napätia elektrického poľa odpovedajúcemu 50 a 60 kV.cm^{-1}. Výskumy Marqueza et al. (3) ukazujú, že zvýšenie napätia elektrického poľa na 50 kV.cm^{-1} súviselo s inaktiváciou spór baktérií *Bacillus cereus* i nad 5 logaritmických jednotiek Zmena uchovania populácie vegetatívnych buniek a spór termorezistentných baktérií *Geobacillus stearothermophilus* môže byť spôsobená aj prítomnosťou komponentov stien prežívajúcich baktérií, ktoré spôsobujú ich termorezistenciu.

Baktérie *Leuconostoc mesenteroides* preukázali odolnosť na účinok elektrického poľa v rozsahu 2–9 kV.cm^{-1}. Zvýšenie napätia elektrického poľa na 17 kV.cm^{-1} spôsobilo redukciu počtu buniek neprevyšujúcu jednu logaritmickú jednotku. Nezískala sa korelácia medzi úrovňou redukcie populácie a napätím elektrického poľa (obr. 3.). Podľa výskumov Aronssona et al. (4) baktérie *Leuconostoc mesenteroides* boli jednými z mikroorganizmov s najväčším odporom pri účinku elektrického poľa o vysokom napätí, ktoré vykázali redukciu populácie o 3 logaritmické jednotky pri napätí elektrického poľa 30 kV.cm^{-1} a násobku impulzov na 20.

Gram-negatívne tyčinky *Escherichia coli* sú považované za jedny z najviac citlivých druhov baktérií, ktoré boli podrobené pôsobeniu vysokonapäťového elektrického poľa. Po použití jednotlivých napäťových výbojov o napätí poľa v rozsahu 2–15 kV.cm^{-1}, zistila sa redukcia populácie baktérií *Escherichia coli* o 1 až 1,2 logaritmických jednotiek. Elektrické pole o napätí17 kV.cm^{-1} spôsobilo cca dvojnásobne väčší efekt a počet populácií bol o 2,4 logaritmické jednotky nižší (obr. 3.). Literárne údaje uvádzajú, že elektrické pole účinne pôsobí na baktérie *Escherichia coli* pri prekročení napätia 25–30 kV.cm^{-1} (4, 5, 6) v prípade predlženia času trvania impulzov dokonca na 200–300 μs (7). Takáto zmena parametrov elektrického poľa umožnila zvýšenie efektu odolnosti na 4 až 6,5 logaritmických jednotiek. Elektrické pole v rozsahu 2–17 kV.cm^{-1} pri použití jednotlivých napäťových impulzov nevplývalo na veľkosť populácie kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* (obr. 2.). Zvýšenie napätia elektrického poľa na 50 a 60 kV.cm^{-1} spôsobilo redukciu počtu živých buniek kvasiniek o 0,8 až 1,3 logaritmických jednotiek (tab. II.). Inaktivácia buniek kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* závisela od napätia použitého elektrického poľa i počtu impulzov poľa (2). Významná redukcia počtu populácii kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, od 4 do 6 logaritmických jednotiek bola zaznamená až pri napätí elektrického poľa 25–35 kV.cm^{-1} a zvýšeniu počtu impulzov na 40.

Obr. 4. Vplyv napäťových impulzov na prežitie kvasiniek na buľve cukrovej repy



Kvasinky *Candida mycoderma* boli citlivé na činnok napäťových úderov o napätí elektrického poľa v rozsahu 2–17 kV.cm^{-1}. Redukcia počtu populácií bola diferencovaná a vykazovala od 1,3 do 2,5 logaritmických jednotiek (obr. 2.). Nedostatočná korelácia medzi napätím elektrického poľa a efektívnosťou jeho účinku na kvasinky *Candida mycoderma* môže súvisieť so schopnosťou tých kvasiniek, ktoré tvoria skupinové rozvetvené retiazkové formy rôznej veľkosti. Bez štandardizácie času populácie použitých v experimentoch nie je možné predpokladať morfologickú rovnorodosť skupinovej tvorby buniek.

Inaktivácia plesní *Aspergillus niger* nezávisela od napätie elektrického poľa bleskových výbojov a redukcia populácie bola 1,0 až 1,1 logaritmických jednotiek podľa napätia poľa v intervale 2–15 kV.cm^{-1}. Najväčší vplyv poľa na plesne, zníženie testovanej populácie o 1,5 logaritmickej jednotky, sa zistil pri použití napätia poľa 17 kV.cm^{-1} (obr. 3.).

Vplyv počtu napäťových úderov na prežitie mikroorganizmov

Pri napätí elektrického poľa 17 kV.cm^{-1} skúmal sa vplyv násobkov impulzov 3, 5, 10 a 20 na prežitie mikroorganizmov. Spomedzi testovaných druhov baktérií iba pre prežívajúce tyčinky *Bacillus subtilis* bol zaznamenaný pokles počtu populácií o 2,9 logaritmické jednotky pri 5násobnom opakovaní vysokonapäťových impulzov (tab. I.). Podobné výsledky pre baktérie *Bacillus cereus* získali Cserhalmi et al. (2) , ktorí potvrdili maximálnu redukciu počtov živých buniek pri použití 4 impulzov elektrického poľa o napätí 20 kV.cm^{-1} vo vzorke, pričom vzrast počtu impulzov na 10 nespôsobil zásadnú zmenu počtu populácii týchto baktérií.

Pre baktérie *Geobacillus stearothermophilus, Leuconostoc mesenteroides* a *Escherichia coli* zvýšenie počtu impulzov na 20 spôsobilo zníženie efektu odolnosti (tab. I.) čo sa však nezhoduje s výsledkami Aronssona et al. (4) alebo Pothkamury et al. (7). Rozdiely medzi našimi výsledkami a literárnymi údajmi môžu pochádzať z rôznych parametrov použitého elektrického poľa. Vo výskumoch citovaných prác obvykle sa používalo napätie elektrického poľa viac ako 25 kV.cm^{-1} a počet impulzov v rozsahu 30–100.

Zníženie hladiny živých buniek kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* o 0,5 až 0,7 logaritmických jednotiek sa pozorovalo pri použití zodpovedajúcich 10 a 20 napäťových impulzov. Postupný nárast efektu odolnosti bol zaznamenaný pre kvasinky *Candida mycoderma.* Populácia živých buniek kvasiniek za týchto podmienok sa zmenšila o 2,3 až 2,8 logaritmických jednotiek (tab. I.). Literárne údaje ukazujú na kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ako na jedny z najcitlivejších mikroorganizmov na účinok vysokonapäťového elektrického poľa, predsa len použitie zmien parametrov elektrického poľa sťažuje vniesť do výsledkov jednoznačné závery.

Nepotvrdil sa zásadný vplyv počtu napäťových impulzov na množstvo populácií plesne *Aspergillus niger* (tab. I.).

Vplyv objemu média na prežitie mikroorganizmov

Pri ustálenom napätí nabíjania generátora (17 kV), pozoroval sa vplyv napätia elektrického poľa bleskových impulzov dosiahnutých vďaka použitiu rôznych objemov média na prežitie buniek štandardizovanej emulzie mikroorganizmov. V meracej nádobe o stálom priemeru boli umiestnené rôzne objemy suspenzie, a týmto spôsobom sa získali zmeny vzdialenosti medzi elektródou stanovenou dnom nádoby a elektródou dotýkajúcou sa povrchu tekutiny. Uvažujúc objem 50 ml ako parameter referenčný objem, objem média bol zvýšený na 80, 120 a 120 ml.

Pri baktériách *Bacillus subtilis* sa zistili zmeny prežitia buniek i spór v oblasti objemov 50–200 ml, pričom prežitie buniek i spór rástlo pri klesajúcich hodnotách elektrického poľa (nárast objemu suspenzie). So zvyšujúcim sa objemom suspenzie baktérií *Geobacillus stearothermophilus* na 120 ml získali sa nepodstatné (0,3 logaritmické jednotky) nárastu efektu. odolnosti. Pri populáciách baktérií *Escherichia coli* a plesne *Aspergillus niger* potvrdil sa nárast prežitia odpovedajúci 1,4 až 0,5 logaritmických jednotiek. Zmena objemu média z 50 do 200 ml , nemala prakticky vplyv na životnosť populácií baktérií *Leuconostoc mesenteroides* ani na kvasinky (obr. 3.). V prípade kvasiniek *Candida mycoderma* spolu so zvyšujúcim sa objemom média nedošlo k zníženie efektu odolnosti, dokonca ani pri neveľkom náraste prežitia o 0,6 logaritmických jednotiek pri objeme 200 ml. Znamená to, že kvasinky *Candida mycoderma* sú obzvlášť citlivé na účinok bleskových napäťových impulzov a mechanizmus inaktivácie s najväčšou pravdepodobnosťou vystupuje v „čistej“ forme pôsobenia elektrického potenciálu bez termických efektov.

Pri všetkých testovaných mikroorganizmoch, s výnimkou kvasiniek *Candida mycoderma,* pri objeme 200 ml potvrdilo sa 2–3 násobné zníženie efektu odolnosti účinkom vysokonapäťového elektrického poľa (obr. 3.). Skoršie prezentované literárne údaje (4, 2 ,7) dotýkajú sa suspenzie o objeme neprevyšujúcej l ml. Vyššie prežitie mikroorganizmov v porovnaní s údajmi v literatúre, môže byť taktiež výsledkom 50–200násobného zväčšenia objemu média. Literárne údaje sa nevzťahujú na zväčšenie objemu média podrobovaného účinku napäťových úderov.

Tab. II. Vplyv emulgátora na prežitie mikroorganizmov podrobených účinku bleskových úderov

Mikroorganizmus	Emulgátor	Napätie el. poľa (kV.cm^{-1})	Redukcia počtu buniek (log KTj.ml^{-1})
Saccharomyces cerevisiae	voda	60	0,3
	živná pôda		1,3
	voda	50	0,5
	živná pôda		0,8
	voda	40	0,2
		30	0,2
		20	0,2
Geobacillus stearothermophilus	voda	60	0,9
	živná pôda		2,2
	voda	50	0,6
	živná pôda		2,0
	voda	40	0,5
	živná pôda		1,7
	voda	30	0,3
	živná pôda		1,7
	voda	20	0,4
	živná pôda		1,6

Tab. III. Vplyv počtu napäťových impulzov na prežitie kvasiniek Saccharomyces cerevisiae osadených na pletive koreňa cukrovej repy

Emulgátor	Napätie el. poľa (kV.cm^{-1})	Redukcia počtu buniek (log KTj.ml^{-1})
1	9	2,5
3		2,5
5		2,5
1	17	2,5
3		2,5
5		2,5

Vplyv druhu emulgátora na prežitie mikrooganizmov

Študoval sa vplyv druhu emulgátora na prežitie kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* a baktérií *Geobacillus stearothermophilus.* Emulzie mikroorganizmov sa pripravovali v sterilnej destilovanej vode ako v aj v sterilnej výživnej pôde určenej na prípravu kultivačnej pôdy pre vymedzenú skupinu mikroorganizmov. Výživná pôda vzhľadom na obsahujúce iónové zlúčeniny, predstavuje dobrý elektrolyt, usnadňujúci prechod elektrického prúdu. Rovnako pre kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ako aj baktérie *Geobacillus stearothermophilus* lepší efekt odolnosti sa ukázal v prípade emulzií v kultivovaných médiách. Súčasne redukcia populácií mikroorganizmov bola proporcionálna k napätiu elektrického poľa. Zvýšenie napätia poľa na 50 a 60 kV.cm^{-1} spôsobilo primerané zníženie počtov populácie kvasiniek 0,3 až 1,3 logaritmickej jednotky. Počet živých buniek baktérií bol o 1,6 až 2,2 logaritmických jednotiek nižší pri zmene napätia elektrického poľa v rozsahu 20–60 kV.cm^{-1} (tab. II.).

Účinok napäťových úderov na prežitie mikroorganizmov usadených na pletive koreňa cukrovej repy

Štandardizované emulzie kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* a *Candida mycoderma* boli osadené na sterilnom tkanive cukrovej repy. Takto pripravený systém, predstavujúci model simulujúci prírodné podmienky, bol podrobený účinku napäťových úderov v rozsahu napätia poľa 2–17 kV.cm^{-1} po dobu 2–3 µs. Nezávisle od použitého napätia poľa počet živých buniek kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* klesol o 2,1÷2,6 logaritmických jednotiek. Podobné výsledky sa dosiahli pre kvasinky *Candida mycoderma* pričom populácia kvasiniek sa znížila o 1,9 až 2,4 logaritmických jednotiek (obr. 4.).

Vzhľadom na vyššie uvedené výsledky účinkov napäťových impulzov na emulzie kvasiniek potvrdil sa nárast efektu odolnosti pre *Saccharomyces cerevisiae* i zachovanie maximálnych hodnôt blízkych pre *Candida mycoderma* (obr. 2. a 4.). Nanesením suspenzie kvasiniek na pletivo koreňa cukrovej repy získal sa systém, v ktorom medzi elektródami sa nachádzalo pletivo o hrúbke 7 mm a roztok o strednej hrúbke vrstvy 3 mm. Pri tomto spôsobe 7milimetrovú vrstvu živnej pôdy, ktorá je dobrým elektrolytom, nahradilo repné pletivo o nižšej vodivosti. Teda časť energie impulzu sa premenila na teplo, čo môže ovplyvniť redukciu populácií kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* relatívne vzdorujúcich impulzom. Naproti tomu kvasinky *Candida mycoderma,* značne citlivejšie na impulzy, zareagovali podobne, ako to bolo v prípade experimentov iba s použitím živnej pôdy. Znásobenie počtu impulzov na 3 a 5, pri zachovaní napätia elektrického poľa 99 a 17 kV.cm^{-1} nemalo vplyv na prežitie kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* (tab. III.).

Závery

1. Citlivosť baktérií *Bacillus subtilis* na účinok jednotlivých napäťových impulzov je diferencovaná:

– po 16 hodinovej kultivácii malé zmeny počtov buniek sa ukázali už pri napätiu elektrického poľa 4 kV.cm^{-1},
– po 48 hodinovej kultivácii podobné zmeny sa dosiahli pri napätí elektrického poľa 1,3 kV.cm^{-1},
– odporom na účinok napäťových impulzov do napätia elektrického poľa 60 kV.cm^{-1} sa vyznačovali spóry *Geobacillus stearothermophilus,* dokonca ani pri 25násobnom opakovaní impulzov.

Najväčšie zmeny počtu populácií baktérií *Bacillus subtilis,* blízke 2 logaritmickým jednotkám, sa dosiahli pri napätí elektrického poľa 17 kV.cm^{-1}. Zvýšenie napätia elektrického poľa na niekoľko desiatok kV.cm^{-1} nevyvolalo už podstatné zmeny redukcie buniek baktérií.

Baktérie *Leuconostoc mesenteroides* sa vyznačovali značným odporom voči účinkom napäťových impulzov. Hoci zmeny odolnosti sa viditeľne prejavili už pri hodnote napätia elektrického poľa 11 kV.cm^{-1}, predsa neprekročili jednu logaritmickú jednotku. Z testovaných baktérií najviac citlivé na bleskové impulzy sa ukázali tyčinky *Escherichia coli*. Zmeny v počte populácií sa prejavili už pri napätiu elektrického poľa 2 kV.cm^{-1} (1,2 logaritmických jednotiek) a pri 17 kV.cm^{-1} boli 2,4 logaritmických jednotiek.

Inaktivácia plesní *Aspergillus niger* nebola závislá od hodnoty napätia impulzov a redukcia populácie predstavovala 1,0 až 1,5 logaritmických jednotiek,.

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* vykazovali celkový odpor voči účinkom napäťových impulzov v rozsahu napätia elektrického poľa 2–17 kV.cm^{-1}. Impulzy o napätí elektrického poľa 50 kV.cm^{-1} a 60 kV.cm^{-1} spôsobili pokles počtu buniek kvasiniek zodpovedajúci 0,8 až 1,1 logarimickým jednotkám.

Kvasinky *Candida mycoderma,* na rozdiel od *Saccharomyces cerevisiae,* boli citlivé na účinok napäťových impulzov už v rozsahu napätia elektrického poľa 2–17 kV.cm^{-1}. Redukcia početnosti populácií vykazovala od 1,3 do 2,5 logaritmických jednotiek pri nedostatku korelácie medzi hodnotami napätia elektrického poľa a efektom jeho účinku

2. Spomedzi testovaných druhov baktérií jedine pri prežívajúcich tyčinkách *Bacillus subtilis* sa dosiahol pokles počtu buniek o 3,9 logaritmických jednotiek pri 5násobnom opakovaní vysokonapäťových impulzov. Pre baktérie *Geobacillus stearothermophilus, Leuconostoc mesenteroides* a *Escherichia coli,* znásobenie impulzov na počet 20 spôsobilo zmenšenie efektu odolnosti. Zníženie hladiny živých buniek kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* o 0,5 až 0,7 logaritmickej jednotky sa pozorovalo pri použití 10 a 20 impulzov elektrického poľa. Postupný nárast efektu odolnosti pre 5,10 a 20 impulzov elektrického poľa sa zaznamenal pre kvasinky *Candida mycoderma.* Populácia živých buniek kvasiniek v týchto podmienkach sa zmenšila o 0,2 až 0,5 logaritmických jednotiek. Nepotvrdil sa podstatný vplyv počtu impulzov elektrického poľa na veľkosť populácií plesni *Aspergillus niger.*

3. Zmeny elektrického poľa vyvolané zmenami objemu média pri zachovaní rovnakých napätí nabíjania generátora spolu s nárastom objemu tekutiny spôsobovali v prípadoch:

1. Baktérií *Bacillus subtilis,*a *Escherichia coli* ako aj plesni *Aspergillus niger* nárast prežitia.
2. Baktérie *Leuconostoc mesenteroides* a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* nemajú vply na životnosť populácií.
3. Baktérie *Geobacillus stearothermophilus a* kvasinky *Candida mycoderma* znižujú prežitie len nepodstatne, len o 0,3 až 0,6 logaritmických jednotiek.
4. Pre kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a baktérie *Geobacillus stearothermophilus* lepší efekt odolnosti pri bleskových impulzoch sa zaznamenal v prípade suspenzií živných pôd

v porovnaní so suspenziami buniek v sterilnej destilovanej vode. Rovnako, redukcia populácií mikroorganizmov bola proporcionálna hodnote napätia poľa.

5. Počet živých buniek kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* osadených na pletive koreňa cukrovej repy a podrobených účinkom bleskových impulzov, sa znížil o 2,1 až 2,4 logaritmické jednotky. Podobné výsledky boli dosiahnuté pre kvasinky *Candida mycoderma*, pričom sa populácia znížila o 1,9 až 2,4 logaritmické jednotky. Vzhľadom na vyššie uvedené výsledky o výsledkoch účinku bleskových impulzov na emulzie kvasiniek, stanovilo sa zvýšenie efektu odolnosti pri *Saccharomyces cerevisiae* zachovanie maximálnych hodnôt pre *Candida mycoderma*. Znásobenie počtu impulzov na 3 a 5, pri zachovaní napätia elektrického poľa 9 a 17kV.cm^{-1}, nevplývalo na prežitie buniek kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* v osadení mikroorganizmov na pletivo koreňov cukrovej repy.
6. Ako ukazujú získané výsledky výskumu, použitie bleskových napäťových úderov pri spracovaní cukrovej repy nespĺnilo očakávanú mikrobiologickú čistotu suroviny a redukcia populácií testovaných mikroorganizmov nebola veľká. Okrem jednej výnimky dosiahla cca 2 logaritmické jednotky. Takéto spracovanie môžeme pokladať za pomocné, nie však zásadné.

Súhrn

Študoval sa vplyv bleskových úderov elektrického napätia na prežitie vybranej mikroflóry charakteristickej pre koreň cukrovej repy. Prežitie mikroorganizmov závisí od hodnoty elektrického poľa, počtu elektrických výbojov, obsahu média podrobovaného výbojom ako aj od druhu zmesi slúžiacej na prípravu suspenzie. Citlivosť sledovaných mikroorganizmov na účinok bleskových úderov elektrického poľa je rozličná. Spomedzi sledovaných mikroorganizmov najväčšiu citlivosť vykázali tyčinky *Escherichia coli* (redukcia počtu buniek o 2,4 log jkt.ml^{-1}). Podobná zmena počtu baktérii bola aj v prípade *Bacillus subtilis*. Analýza získaných výsledkov ukázala, že použitie bleskových napäťových výbojov elektrického poľa v rozsahu 2–60 kV.cm^{-1} na spracovanie koreňov cukrovej repy nespĺňa predpokladanú mikrobiologickú čistotu. Takýto zásah môžeme označiť iba za pomocný, ale nie zásadný účinok.

Kľúčové slová: napäťové výboje, korene cukrovej repy, baktérie, kvasinky, plesne.

Preklad: Alexander Dandár

Literatúra

1. Wawro, S.; Gruska, R.: Základné mechanické vlastnosti repného tkaniva po denaturácii bleskovými napäťovými impulzami. *Listy cukrov. řepař.*, 123, 2007 (12), s. 388–392.
2. Cserhalmi, Zs. et al.: Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus cereus* by pulsed elektric field technology. *Inn. Food Sci Emerging Technol.*, 3, 2003, s. 41–45.
3. Marquez, V. O.; Mittal, G. S.; Grffiths, M. V.: Destruction and inhibition of bacterial spores by high voltage elektric field. *J. Food Sci.*, 62, 1997, s. 399–401.
4. Aronsson, K. et al.: Inactivation of mikroorganisms using pulsed elektric fields: The influence of process parameters on *Escherichia coli*, *Listeria innocula*, *Leuconostoc mesenteroides* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Inn. Food Sci. Emerging Technol.*, 2001 (2), s. 41–54.
5. Zhang, Q. et al.: Inactivation of *E. coli* for food pasteurisation by high-strength pulsed electric fields. *J. Food Proc. Preserv.*, 19, 1994, s. 103–118.
6. Vega-Mercado, H. et al.: Inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* suspended in pea soup using pulsed elektric field. *J. Food Proc. Preserv.*, 29, 1996, s. 511–514.
7. Pothakamury, U. R. et al.: Inactivation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in model foods by pulsed electric field technology. *Food. Res. Int.*, 28, 1995 (2), s. 167–171.

Wawro S., Gruska R., Kunicka-Styczyńska A.: The Influence of Pulsed Electric Fields on the Typical Microflora of Sugar-Beet Root

In article was presented the effect of pulsed electric fields (PEF) on the survival selected microflora that is characteristic of the roots of sugar beet. The survival of microorganism were determined dependig on the value electric field, the number of pulses, volume and type of the medium that was undergone of PEP and the type of mixture used to prepare the suspension. The sensitivity of microorganisms to the PEF is varies. Among of the studied organisms, the most sensitive was *Escherichia coli* (reduction of the number cells of 2.4 log cfu.ml^{-1}). A similar change in the number of bacterias was observed in the case of *Bacillus substilis*. Analysis of the results obtained showed that the use of PEF with a value of 2–60 kV.cm^{-1} for the processing of sugar beet does not provide the desired microbiological purity. In sugar industry this method of microorganisms destruction may be used as additional process, not as the main method of sterilization.

Key words: pulsed electric fields, sugar beet roots, bacteria, yeast, mildew.

Kontaktná adresa – Contact address:

dr inż. Radosław Gruska, Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Instytut Chemicznej Technologii Żywności, Zakład Cukrownictwa, ul. B. Stefanowskiego 4/10, 90-924 Łódź, Polska, e-mail: radoslaw.gruska@p.lodz.pl