

Přístroj k měření závislosti úhynu mikroorganismů na teplotě

576.8.035.15

Ing. JAN ŠAVEL - Ing. MARIE PROKOPOVÁ, Jihočeské pivovary, n. p., České Budějovice

Úvod

Četné studie tepelného úhynu mikroorganismů prokázaly, že se úhyn vegetativních forem mikroorganismů řídí kinetikou prvního řádu. Průběh této reakce se studuje klasickými metodami chemické kinetiky, upravenými v některých detailech pro práci s mikroorganismy.

Úhyn mikroorganismů se nejčastěji měří izotermním způsobem. Směs mikroorganismů se vnáší přímo nebo v ampulích do lázně známé teploty a po určité době se zjistí počet přežívajících mikroorganismů. Experimentálních obměn této metody je velké množství a podrobně se jimi zabývají přehledné práce [1–5].

Izotermní metoda je dostatečně přesná a spolehlivá, ale její nevýhodou je přílišná pracnost, neboť hodnoty letálních rychlostí se měří při různých teplotách. Z výsledků měření se stanoví konstanty charakteristické pro určitý mikroorganismus.

Obtíže, které se vyskytovaly při studiu chemických reakcí izotermními metodami, vedly k hledání rychlejších způsobů studia závislosti rychlosti reakcí na teplotě. V minulých letech se v chemické kinetice rozšířily tzv. neizotermní metody. Systém, v němž probíhá neizotermní reakce, je vystaven působení teploty po známé teplotní křivce a sleduje se závislost koncentrace některé složky v čase. Vhodnými matematickými metodami se z jednoho nebo několika málo měření určí kinetické konstanty popisující tuto reakci [6, 7].

Neizotermní metody se rozšířily zejména v termogravimetrii, kde vhodné experimentální metody umožnily přesné kontinuální zaznamenávání změn složení studovaného systému.

Také úhyn mikroorganismů se může měřit neizotermním způsobem, ale použitelnost metody snižují nevýhody spojené s kontinuálním nebo častým diskontinuálním stanovením přežívajících mikroorganismů. Proto jsme vypracovali novou metodu měření, kterou lze dobře aplikovat nejen při studiu chemických, ale zejména biochemických a biologických reakcí, kde je kontinuální sledování změn koncentrace reagujících složek často obtížné.

Princip metody

Vzorek, v němž má příslušná reakce probíhat, se vneše do přesně definovaného teplotního pole tak, aby různé části vzorku získaly různou teplotu. Po zvolené reakční době se ochlazením průběh reakce zastaví a zjistí se koncentrace některé reagující složky v jednotlivých místech vzorku. Mezi částmi vzorku přitom nesmí docházet k přenosu hmoty. Vhodnými experimentálními podmínkami se rovněž zajistí, aby se teplotní pole ve vzorku ustálilo co nejdříve po zahájení reakce.

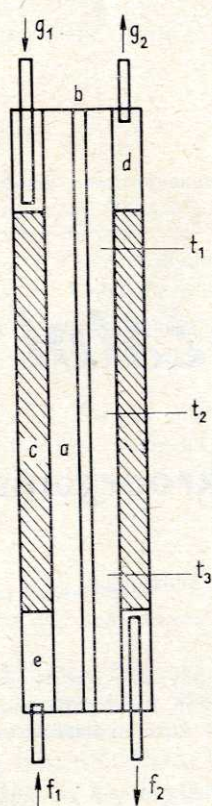
Tato metoda se může různě obměňovat. Definované teplotní pole se např. vytvoří v bloku z pevného mate-

riálu, jehož konce se udržují na konstantních teplotách. V dobře izolovaném bloku se teplota mění lineárně se vzdáleností mezi oběma konci bloku. Nelineární teplotní pole se vytvoří v kapalinovém výměníku, v němž se mění teplota v závislosti na délce výměníku exponenciálně apod.

Vzorek se do teplotního pole vnáší v tenkostěnných kovových nebo skleněných kapilárách, v pouzdrech tvaru tenké destičky apod. Po ukončení reakce se vzorek rozdělí na části, které se analyzují odděleně, nebo se vhodnou metodou (např. spektrofotometricky) proměří změny složení v závislosti na délce vzorku.

Probíhá-li reakce v kapalně fázi, zamezí se přenosu hmoty konvekci zvýšením viskozity kapaliny, zgelováním systému, nebo se kapalnou fází napustí vhodný inertní nosič (silikagel, celulóza apod.). Volbou krátké reakční doby se omezí vliv difúze.

Popis přístroje



Obr. 1. Přístroj pro měření tepelné rezistence mikroorganismů

a, kovový válec, b) reakční komůrka, c) izolace, d) ohřívací komůrka, e) chladič komůrka, f₁, f₂ — vstup (výstup) chladič vody, g₁, g₂ — vstup (výstup) ohřívací vody, t₁, t₂, t₃ — teploměry.

Tepelná rezistence mikroorganismů se měřila v přístroji podle obr. 1. Svisle umístěný, podélně provrtaný (d = 4 mm), hliníkový válec (d = 40 mm, l = 300 mm) byl zapuštěn do novodurové trubky. Vodotěsné přepážky na koncích trubice vymezovaly ohřívací a chladič komůrku. Voda z ultratermostatu U 10 (NDR), která cirkulovala komůrkami, udržovala konce válce na konstantních teplotách. Do spodní komůrky se přiváděla chladnější, do horní teplejší voda. Část válce mezi komůrkami byla izolována pěnovým polyuretanem.

Teploty ve válci měřily tři teploměry, uložené v šikmo vrtaných jímkách vyplněných glycerinem. Před měřením se otvor válce (reakční komůrka) vyplnil glycerinem.

Po ustálení teplot se do komůrky vkládal vzorek v skleněné trubičce (vnitřní průměr = 2 mm) se zataveným spodním koncem. Po uplynutí zvolené reakční doby se trubička vyjmula a ochladila vodou z vodovodu.

Úhyn mikroorganismů se měřil v agarovém gelu. Při sledování úhynu přímo v živné půdě se mikroorganismy rozmíchaly v roztavené agarové půdě ochlazené na teplotu 42 °C a suspenze se nasála do skleněné trubičky, jejíž spodní konec se po ztuhnutí půdy zatavil. Po ukončení reakce se trubičky s půdou inkubovaly v termostatu.

Při měření úhynu mikroorganismů v jiném prostředí (např. v pufru) se roztavený vodný agar nebo agar v příslušném prostředí (pufru) smísil se suspenzí mikroorganismů v takovém poměru, aby výsledná směs obsahovala 0,5–2 % agaru, a směs se nasála do trubiček jako při měření úhynu mikroorganismů v živné půdě. Po ukončení reakce a ochlazení se vzorek po odříznutí zataveného konce trubičky vytěsnil (směrem ke konci trubičky, na nějž působila vyšší teplota) vzduchem na plotnu živné půdy a inkuboval v zavěšené poloze.

Do agarové trubičky z živné půdy difundovaly živiny a neusmrcené mikroorganismy rostly v místech, která byla při reakci vystavena teplotě nižší, než je letální teplota.

Jednotlivým místům vzorku se přiřadila teplota označením místa vzorku, kryjícího se s horním okrajem válce (ryskou na trubičce). Vzdálenost se měřila od horního okraje kovového válce směrem dolů, jednotlivým teploměrům příslušely vzdálenosti x₁, x₂, x₃ a teploty t₁, t₂, t₃. V lineárním teplotním poli závisí teplota na vzdálenosti podle vztahu $t = ax + b$; tohoto vztahu se použilo při výpočtu teploty v jednotlivých místech vzorku.

Ve zvolené reakční době se zaznamenalo 10–20 trojic (t₁, t₂, t₃) teplot. Teplota na teploměrech kolísala v průběhu měření v rozmezí 0,1 °C.

Při měření s vytlačení agaru trubičky po reakci se agar do skleněné trubičky nasával pouze tak vysoko, aby se při ohřevu celý agarový sloupec nacházel uvnitř válce. Vzdálenost mezi ryskou (horním okrajem válce) a horním okrajem půdy se přičítala k vzdálenosti měřené od okraje agarové trubičky při vyhodnocování pokusu.

Z hodnot teploty se vypočetly průměry a metodou nejmenších čtverců se určily konstanty lineární závislosti teploty na vzdálenosti. Tabulka 1 porovnává změřené hodnoty s hodnotami vypočtenými z rovnice $t = ax + b$ po zpětném dosazení vzdáleností x₁, x₂, x₃. V našich pokusech bylo x₁ = 86 mm, x₂ = 159 mm, x₃ = 235 mm. Údaje v tabulce potvrzují lineární tvar teplotního pole (tab. 1).

Tabulka 1. Teploty v měrných bodech přístroje (ve vzdálenostech x₁ = 86 mm, x₂ = 159 mm, x₃ = 235 mm)

Pokus	Průměrné teploty [°C]			Konstanty lineární závislosti		Vypočtené teploty [°C]		
	t ₁	t ₂	t ₃	a (°C mm ⁻¹)	b (°C)	t ₁	t ₂	t ₃
1.	56,50	54,90	53,49	-0,020190	58,194	56,46	54,98	53,45
2.	58,83	56,95	55,27	-0,023880	60,838	58,78	57,04	55,23
3.	58,86	55,85	52,98	-0,039451	62,209	58,82	55,94	52,94
4.	59,17	54,92	50,25	-0,059877	64,350	59,21	54,83	50,29
5.	62,47	54,75	46,72	-0,105704	71,559	62,47	54,75	46,72

Měření letálních teplot mikroorganismů

V přístroji pro měření tepelné rezistence mikroorganismů se velmi jednoduše stanovují letální teploty mikroorganismů při konstantní době ohřevu. Suspenze mikroorganismů v agarovém gelu nebo přímo v živném agaru

se vnese do teplotního pole přístroje a po inkubaci se odečte vzdálenost, ve které roste poslední kolonie mikroorganismu (letální vzdálenost). Po dosažení vzdálenosti do rovnice lineárního teplotního pole se vypočte letální teplota.

Při stanovení letálních teplot se musí přesně specifikovat podmínky měření, jako počáteční koncentrace mikroorganismů, prostředí, v němž jsou mikroorganismy rozptýleny, inkubační podmínky a půda k stanovení přežívajících mikroorganismů, doba působení teploty apod.

Při měření tepelné odolnosti laktobacilů a pediokoků (izoláty z piva) se čisté kmeny mléčných bakterií kultivovaly 3 dny (28 °C) v tekuté půdě MRS [8]. 0,3 ml suspenze (10^7 – 10^8 buněk/ml) se rozmíchalo v 9,7 ml půdy B- [8], směs se nasála do skleněných trubiček, trubičky se vložily do přístroje a po 15 min se vyjmuly a inkubovaly 5–6 dní při 28 °C. Výsledky uvádí tab. 2.

Výsledky vykazují dobrou reprodukovatelnost při opakovaném měření se stejnou suspenzí mléčných bakterií. Větší rozdíly mezi letálními teplotami stejného kmene při opakovaném měření s různými suspenzemi, jsou pravděpodobně způsobeny rozdílnými podmínkami při různých pokusech, např. rozdílnou počáteční koncentrací mikroorganismů, která se přesně nestanovovala, ale pouze odhadovala. Přesto umožnily výsledky měření přesně rozlišit jednotlivé kmeny podle jejich tepelné odolnosti. Letální teploty nezávisely na velikosti nastaveného teplotního spádu, neboť mezi spádem teploty ($0,02$ – $0,10$ °C mm⁻¹) a letální teplotou se neprokázala závislost (tab. 2).

Tabulka 2. Letální teploty laktobacilů (21, 32, 36) a pediokoků (835, P₁₁)

Kmen	Konstanty lineární závislosti a (°C mm ⁻¹) b (°C)	Letální teplota měření č. 1 2	(°C)	Průměrná letální teplota
21	—0,02388	60,84	57,5	57,5
21	—0,03288	61,59	58,1	58,2
21	—0,03945	62,21	59,1	59,0
21	—0,03998	62,48	57,4	57,6
21	—0,05922	64,27	59,3	58,8
21	—0,05988	64,36	57,9	58,3
21	—0,06361	65,17	58,2	58,6
21	—0,10570	71,56	58,6	58,1
32	—0,02019	58,19	55,6	55,8
32	—0,03945	62,21	55,3	55,5
32	—0,05922	64,27	55,2	55,0
32	—0,05988	64,36	53,9	54,1
32	—0,06361	65,17	54,8	54,5
32	—0,10570	71,56	55,2	55,2
36	—0,02019	58,19	55,5	55,6
36	—0,02750	57,80	55,4	55,2
36	—0,03945	62,21	55,3	55,2
36	—0,03998	62,48	55,0	55,4
36	—0,05922	64,27	55,1	55,5
36	—0,05988	64,36	54,5	54,4
36	—0,06361	65,17	54,7	54,5
36	—0,10570	71,56	55,6	55,2
835	—0,02911	61,39	58,9	58,8
835	—0,05922	64,27	58,9	58,5
P ₁₁	—0,05922	64,27	51,1	51,4
			51,3	51,3

Hlavní výhodou metody je určení letálních teplot z malého počtu měření, neboť nastavením dostatečně velkého rozdílu teplot mezi oběma konci přístroje se letální teplota stanoví z jediného měření. U jiných způsobů měření tepelné rezistence se letální teplota musí stanovovat zkušmo sérií měření, což je časově i pracově náročné. Počáteční koncentrace mikroorganismů i doba ohřevu se mohou snadno měnit a tím sledovat vliv těchto veličin na úhyn mikroorganismů.

Použitelnost metody

Kromě měření letálních teplot se metodou mohou řešit úlohy:

- stanovení konstant kinetických rovnic popisujících úhyn mikroorganismů,
- izolace tepelně rezistentních kmenů,
- měření optimální růstové teploty mikroorganismů,
- měření mikroorganismů s různou tepelnou odolností,
- charakterizace kmenů podle tepelné odolnosti nebo optimální růstové teploty,
- izolace mutantů mikroorganismů indukovaných teplem.

Literatura

- [1] STUMBO, C. R.: Advan. Food Res. 2, 1949, s. 47.
- [2] STUMBO, C. R.: Thermobacteriology in Food Processing. 2. vyd. New York, London 1973.
- [3] BALL, C. D. - OLSON, F. C. W.: Sterilization in Food Technology. New York, Toronto, London 1957.
- [4] AIBA, S. - HUMPHREY, A. E. - MILLIS, N. F.: Bioinženýrství. Praha 1972.
- [5] NICKERSON, J. T. - SINSKY, J. A.: Microbiology of Foods and Food Processing. New York, Amsterdam, London 1972.
- [6] BLAŽEK, A.: Termická analýza. Praha 1974.
- [7] ŠKVÁRA, F. ŠESTÁK, J.: Chem. listy 68, 1974, s. 225.
- [8] ŠAVEL, J. - PROKOPOVÁ, M.: Kvas. prům. 20, 1974, s. 49.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Přístroj k měření závislosti úhynu mikroorganismů na teplotě. Kvas. prům. 22, 1976, č. 2, s. 25–28.

Článek popisuje přístroj k měření závislosti úhynu mikroorganismů na teplotě. Do kovového bloku, jehož konce se udržují na stálých teplotách, se umístí suspenze mikroorganismů v agarovém gelu, čímž různá místa vzorku získají různou teplotu. Mezi teplotou a vzdáleností mezi konci bloku platí lineární vztah, podle něž se jednotlivým místům vzorku přiřadí různé teploty. Po ukončení reakce se vzorek vyjme, ochladí a inkubuje na vhodné živné půdě.

Měřením letálních teplot mléčných bakterií v živné půdě z prokvašené sladiny a dalších přísad se pro 3 kmeny laktobacilů izolovaných z piva získaly hodnoty 55,0 °C, 55,2 °C a 58,3 °C a pro dva kmeny pediokoků teploty 51,3 °C a 58,8 °C. V závěru článku se uvádějí další možnosti použití přístroje při řešení různých úloh.

Шавел, Я. - Прокопова, М.: Прибор для определения зависимости между температурой и эффективностью умерщвления микроорганизмов. Квас. прум., 22, 1976, № 2, стр. 25–28.

Для определения зависимости между температурой и эффективностью умерщвления микроорганизмов был сконструирован прибор, имеющий форму металлического блока, на обоих концах которого поддерживается постоянная температура. Образец, подвергаемый испытанию — т. е. агаровый гель с суспензией микроорганизмов вкладывается в прибор и постепенно нагревается, причем температура в разных его местах зависит от расстояния от нагретых концов. Ввиду линейного характера этой зависимости можно температуру для любого отрезка образца точно рассчитать. После окончания испытания образец охлаждается и производится инкубация в питательной среде.

Результаты испытания молочнокислых палочек в среде состоящей из сброженного сусла с нужными добавками показали, что в трех штаммах молочнокислых палочек изолированных из пива все палочки умерщвляются при следующих температурах: 55,0 °C, 55,2 °C и 58,3 °C, в то время как для двух штаммов педиококков соответствующие температуры составляют: 51,3 °C и 58,8 °C. Описываемый прибор может быть использован при решении многих других исследовательских задач.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Instrument Measuring the Relation Between the Temperature and Death-rate of Microorganisms. Kvas. prům. 22, 1976, No. 2, pp. 25—28.

The authors describe a new instrument which has been developed for studying and measuring the relation between the temperature and death rate of microorganisms. It is essentially a metallic, massive vessel both ends of which are maintained at constant temperature. Microorganisms to be tested are put into the instrument as a suspension in agar gel. Different parts of the sample are therefore exposed to different temperatures. Since there is a linear relation between the temperature of any section of the sample and its distance from the vessel ends, it is easy to assess the effects of distance and, consequently of various temperatures. After a certain dwell the sample is taken out, cooled and surviving microorganisms incubated in an appropriate medium.

The results of experiments show that the lethal temperatures for three strains of lactobacilli in a medium consisting of fermented worth with a number of ingredients are: 55,0 °C, 55,2 °C and 58,3 °C, whereas for two strains of pediococci they are different, i. e. 51,3 °C and 58,8 °C. The instrument can help to solve many other problems.

Šavel, J. - Prokopová, M.: Apparat zur Messung der Abhängigkeit des Absterbens der Mikroorganismen von der Temperatur. Kvas. prům. 22, 1976, No. 2, S. 25—28.

In dem Artikel wird ein Apparat zur Messungen der Abhängigkeit des Absterbens der Mikroorganismen von der Temperatur beschrieben. In einem Metallblock, dessen Enden auf konstanten Temperaturen gehalten werden, werden Suspensionen der Mikroorganismen in Agar gel untergebracht, sodaß in der Probe in verschiedenen Stellen verschiedene Temperaturen erzielt werden. Zwischen der Temperatur und der Entfernung von den Blockenden gilt eine lineare Beziehung, nach der den einzelnen Stellen der Probe verschiedene Temperaturen zugeordnet werden. Nach dem Ende der Reaktion wird die Probe aus dem Apparat herausgenommen, abgekühlt und auf einem geeigneten Nährboden kultiviert.

Durch Messung der Lethaltemperaturen der Milchsäurebakterien in einem Nährboden aus vergärter Süßwürze mit weiteren Zugaben wurden für drei aus Bier isolierte Lactobazillenstämme die Werte 55,0 °C, 55,2 °C und 58,3 °C und für zwei Pediokokkenstämme die Temperaturen 51,3 °C und 58,8 °C ermittelt. Zum Schluß des Artikels werden weitere Möglichkeiten der Anwendung des Apparats für die Lösung verschiedener Aufgaben angeführt.