

# APARATURA

## BADAWCZA I DYDAKTYCZNA

### Zastosowanie promieniowania UV-C do higienizacji skorup jaj zanieczyszczonych bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae*

TOMASZ SZABLEWSKI, RENATA CEGIELSKA-RADZIEJEWSKA, ANNA KACZMAREK,  
JACEK KIJOWSKI

UNIwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Zarządzania Jakością Żywności

#### STRESZCZENIE

Celem prezentowanych badań było określenie skuteczności higienizacyjnej promieniowania UV-C wobec bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* inokulowanych na powierzchni skorupy jaj konsumpcyjnych. Zastosowano pięć różnych poziomów inokulacji powierzchni skorupy jaj od  $10^4$ - $10^8$  komórek/g skorupy i tak przygotowane próby naświetlano dawką 0, 4, 7, 11, 19, 26 J/m<sup>2</sup> stosując urządzenie UV 254 (CompArt). Przeprowadzone badania potwierdziły znaczną skuteczność higienizacyjną promieniowania UV-C 254 nm wobec *S. enteritidis* i *E. coli* w przypadku wszystkich zastosowanych w eksperymencie poziomów inokulacji powierzchni skorupy jaj tymi bakteriami. Wykazano, że poziom inokulacji wpływa na skuteczność inaktywacyjną promieni UV-C 254 nm. Największy spadek liczby badanych drobnoustrojów stwierdzono po naświetlaniu powierzchni skorupy dawką 4 J/m<sup>2</sup>.

#### UV-C light higienization of eggshell contaminated with *Enterobacteriaceae*

#### ABSTRACT

The aim of the conducted study was to measure the effect of UV-C irradiation on *Enterobacteriaceae* inoculated on the eggshell. Five level of eggshell inoculation from  $10^4$  to  $10^8$  cell/g eggshell were applied and samples were exposed to UV irradiation in egg radiator 254 UV Compact was inoculated. Different dose of egg shell irradiation were applied: 0, 4, 7, 11, 19, 26 J/m<sup>2</sup>.

It was found that high higienization efficiency of the UV-C 254 nm light on the *S. enteritidis* and *E. coli* was achieved on all contaminated levels. It was proven that the contamination level influences for the higienization effect. The highest reduction of the *Enterobacteriaceae* number was observed after the 4 J/m<sup>2</sup> dose of irradiation.

## 1. WPROWADZENIE

Bezpieczeństwo zdrowotne żywności jest ważnym elementem składającym się na jakość żywności. Istotnym problemem stwarzającym zagrożenie zdrowia dla konsumenta są zanieczyszczenia mikrobiologiczne żywności związane z doborem nieodpowiednich surowców, złymi warunkami magazynowania przedprodukcyjnego i obróbki technologicznej oraz brakiem higieny osobistej personelu. Wszystko to negatywnie wpływa na bezpieczeństwo produktu, stwarzając realne zagrożenie zdrowotne dla konsumenta, dlatego najważniejszą rolę w zapewnianiu bezpieczeństwa produktów spożywczych odgrywają przetwórcy i producenci żywności [1].

W większości krajów mimo niewątpliwej poprawy ogólnych warunków higienicznych, liczba bakteryjnych zatruc pokarmowych powodowanych bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae* jest wciąż wysoka. Należy dodać, że większość dużych ognisk zatruc i zakażeń pokarmowych jest rejestrowana, ale indywidualne przypadki szczególnie te o lżejszym przebiegu nie zawsze są odnotowywane. Nie ulega więc wątpliwości, że rzeczywista liczba zatruc pokarmowych jest znacznie większa od liczby przypadków faktycznie zarejestrowanych. Najczęstszą przyczyną występowania zatruc pokarmowych są bakterie z rodzaju *Salmonella* oraz *Escherichia coli*. Szczepy *Salmonella*, a w szczególności *S. enteritidis* wywołują ostre zatrucia pokarmowe, wśród których salmonellozy zajmują czołowe miejsce. Rezerwuarem bakterii są organizmy zwierząt, zaś nośnikiem żywność zanieczyszczona odchodami zwierzęcymi m.in. jaja [2, 3, 4].

Według raportu Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) z czerwca 2006 Polska zajmuje czołowe miejsce wśród krajów, w których zakażenie kurników całkowitą mikroflorą, a w szczególności bakteriami Gram (-) jest znaczące – ponad 55% i może być potencjalną przyczyną zagrożenia zdrowotnego dla konsumentów. Wobec tego EFSA przyjęła strategię, mającą na celu redukcję i kontrolę mikroorganizmów, a w szczególności bakterii z rodzaju *Salmonella* występujących powszechnie u drobiu. 31 lipca 2006 r. Rozporządzeniem Komisji (WE) nr 1168/2006 w odniesieniu do wspólnotowego celu ograniczenia częstości występowania niektórych serotypów *Salmonella* w stadach kur niosek gatunku *Gallus Gallus*, nałożono na nasz kraj obowiązek redukcji częstości występowania pałeczek *Salmonella* do 1%. Konsekwencją tego było opracowanie i wdrożenie w 2008 roku Krajowego programu zwalczania niektórych serotypów *Salmonella* w stadach

hodowlanych gatunku kura (*Gallus Gallus*). Aktualnie obowiązuje Krajowy program zwalczania niektórych serotypów *Salmonella* w stadach niosek gatunku kura (*Gallus Gallus*) z 22 września 2009. Program wprowadzono do realizacji na terytorium naszego kraju w latach 2009-2010.

Wydaje się, że jednym z lepszych rozwiązań kontroli zanieczyszczenia mikrobiologicznego na powierzchni skorupy jaj konsumpcyjnych jest mycie jaj. Jednak na terenie Unii Europejskiej istnieje zakaz mycia jaj klasy A – jaj konsumpcyjnych. Wyjątkiem jest Szwecja, w której proces ten jest stosowany. Placówki, w których jaja stanowią składnik oferowanej konsumentom żywności (restauracje, stołówki, szpitale i inne zakłady zbiorowego żywienia), mają obowiązek mycia i dezynfekowania jaj w skorupkach. W Raporcie EFSA zaproponowano, żeby jaja po procesie mycia poddawać dodatkowym zabiegom higienizacyjnym, tj. zabiegom polepszającym stan mikrobiologiczny powierzchni skorupy. Jedną z zalecanych metod higienizacyjnych jest stosowanie promieniowania ultrafioletowego (UV-C) o określonej dawce. Autorzy we wcześniejszych badaniach wykazali, że naświetlanie powierzchni jaj konsumpcyjnych promieniowaniem UV-C nie przyczynia się do powstawania niekorzystnych zmian oraz znacząco redukuje natywną mikroflorę powierzchni skorupy [5]. W pracy podjęto badania mające określić skuteczność higienizacyjną promieniowania UV-C powierzchni skorupy jaj konsumpcyjnych celowo zanieczyszczonych bakteriami z rodziny *Enterobacteriaceae*.

## 2. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Do badań wykorzystano jaja konsumpcyjne klasy A z obrotu detalicznego. Przygotowanie jaj do badań polegało na sterylizacji powierzchni skorupy za pomocą 70% roztworu alkoholu etylowego przez 30 minut. Przygotowane w ten sposób jaja przeniesiono w jałowych warunkach do sterylnych pojemników. W badaniach wykorzystano szczepy *S. enteritidis* PCM 843 i *E. coli* PCM 318 pochodzące z IITD PAN we Wrocławiu. Inokulaty bakterii przygotowano poprzez pobranie pojedynczej kolonii z selektywnego podłoża chromogenego, przeniesie do 3 mL bulionu odżywczego (BTL) i inkubowanie przez 16 godzin w 37°C. Następnie 1 mL hodowli przeniesiono do 99 mL świeżego bulionu odżywczego i inkubowano 4 i 2 godziny w temperaturze 37°C, co odpowiada logarytmicznej fazie wzrostu badanego szczepu komórek bakterii odpowiednio dla *S. enteritidis* i *E. coli* (warunki te ustalono empirycznie). Odpowiednią koncentrację komórek do inokulacji powierzchni

skorupy jaj uzyskano przez rozcieńczanie hodowli świeżym bulionem odżywczym. Przygotowane jaja umieszczone w jałowych pojemnikach zalano w jałowych warunkach 40 mL przygotowanego inokulum bakterii inkubowano w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Następnie zawiesinę komórek ziano i tak przygotowane jaja suszono w jałowych warunkach około 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Dalej jaja poddano działaniu promieni UV-C 254 nm stosując różne dawki promieniowania: 0, 4, 7, 11, 19, 26 J/m<sup>2</sup>. Jaja po naświetlaniu oraz próby kontrolne (jaja inokulowane, nie naświetlane) wybijano, a skorupy umieszczono w sterylnych workach. Pojedynczą próbę stanowiły skorupy z 3 jaj. Skorupy następnie kruszono i przenoszono 10 g do kolby z 90 mL zbuforowanej wody peptonowej. Przygotowaną w ten sposób próbę wytrząsano przez 15 minut w celu wymycia bakterii z porów skorupy. Z uzyskanego rozcieńczenia 10<sup>-1</sup> przygotowano kolejne rozcieńczenia dziesiętne. Każdy wariant naświetlania wykonano dla 5 różnych poziomów inokulacji powierzchni skorupy komórkami badanych bakterii w 6 seriach badań. Następnie liczbę drobnoustrojów w poszczególnych próbach oznaczono klasyczną metodą zalewową z wykorzystaniem Agar odżywczo (BTL). Próby inkubowano w temperaturze 37°C przez dobę, a do obliczeń przyjęto rozcieńczenia z płytek na których liczba koloni była między 30-300. Wyniki wyrażono w jtk/g skorupy.

Efekt bakteriobójczy promieniowania UV-C wyrażono w stosunku do dawki emisyjnej promieniowania J/m<sup>2</sup>. W tym celu zmierzono dla każdej z lamp naświetlacza CompArt 254 natężenie promieniowania UV-C

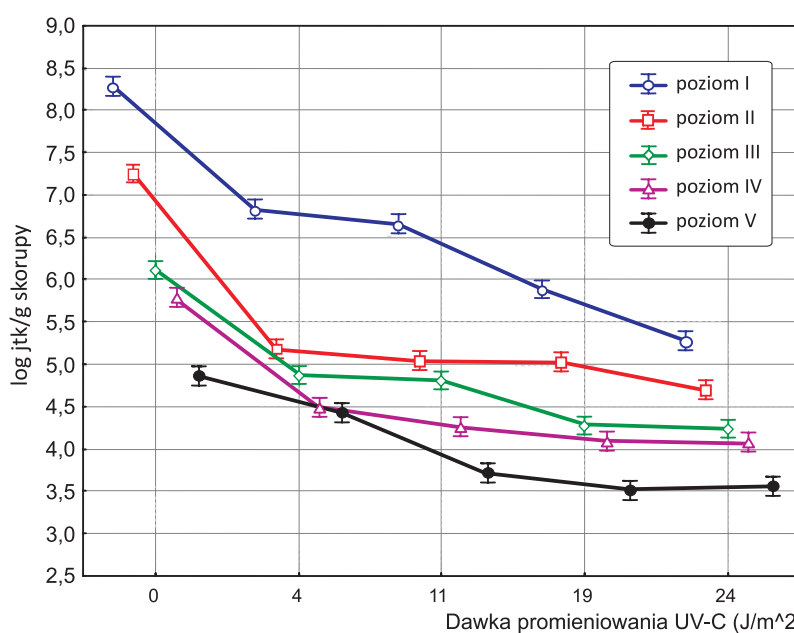
w odległości 1 cm od lampy przy pomocy miernika promieniowania HD 2102.1 z sondą LP471 UVC, ELTA. Następnie natężenie emisyjne W/m<sup>2</sup> dla każdej z 4 lamp obliczono ze stosunku intensywności natężenia promieniowania UV-C do wartości 4π (emisja promieniowania następuje promieniście) i kwadratu odległości powierzchni czujnika od lampy emitującej UV-C (natężenie promieniowania jest funkcją kwadratową od źródła promieniowania) [6].

Dawkę emisyjną (J/m<sup>2</sup>) obliczono sumując natężenie emisyjne lamp (W/m<sup>2</sup>) i mnożąc przez czas naświetlania (s). Ustalono, że cykl naświetlania 30 sekundowy odpowiada dawce 4 J/m<sup>2</sup>, 60 sekundowy dawce 7 J/m<sup>2</sup>, 90 sekundowy dawce 11 J/m<sup>2</sup>, 150 sekundowy dawce 19 J/m<sup>2</sup> i 250 sekundowy dawce 26 J/m<sup>2</sup>.

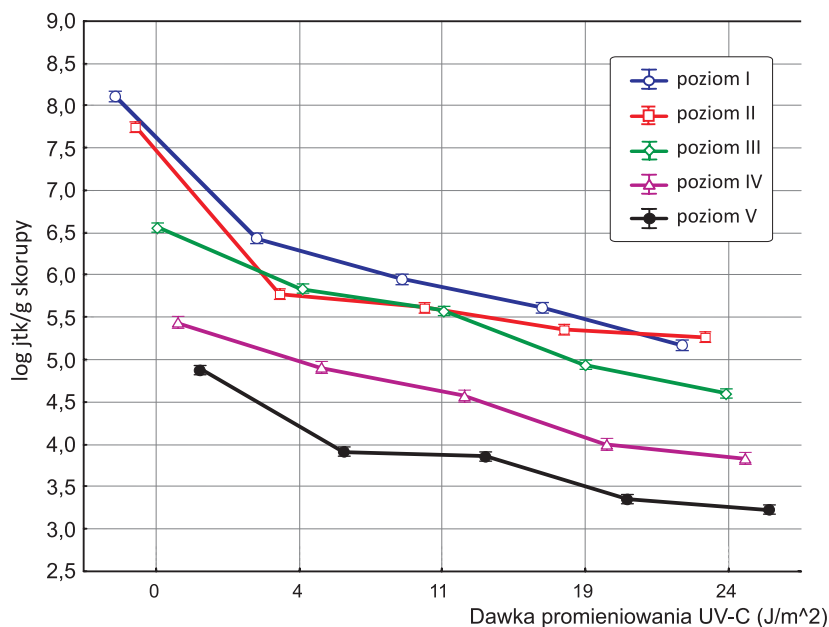
### 3. OMÓWIENIE WYNIKÓW

Analiza danych eksperymentalnych wskazuje na znaczącą redukcję bakterii obu badanych bakterii pod wpływem promieniowania UV-C 254 nm. Obserwuje się istotną zmianę liczności komórek bakterii w zależności od dawki promieniowania UV-C przy jednoczesnym zastosowaniu różnych poziomów inokulacji skorupy jaj bakteriami (Rysunek 1 i 2).

Przeprowadzona statystyczna analiza danych przy pomocy testu Tukeya wskazuje na istotne statystyczne różnice dla zastosowanych dawek promieniowania jak również poziomu inokulacji badanego szczepu. Badania wskazują, że najwyższą redukcję liczby bakterii (o ok. 3 cykle log) uzyskano w przypadku zastosowania najwyższego poziomu inokulacji. W przypadku pozostałych zmiany te wynoszą kolej-



**Rysunek 1.** Wpływ promieniowania UV-C 254 nm ilość komórek bakterii *S. enteritidis* (poziom I – 10<sup>8</sup> jtk/g skorupy, poziom II – 10<sup>7</sup>, poziom III – 10<sup>6</sup>, poziom IV – 10<sup>5</sup>, poziom V – 10<sup>4</sup>)



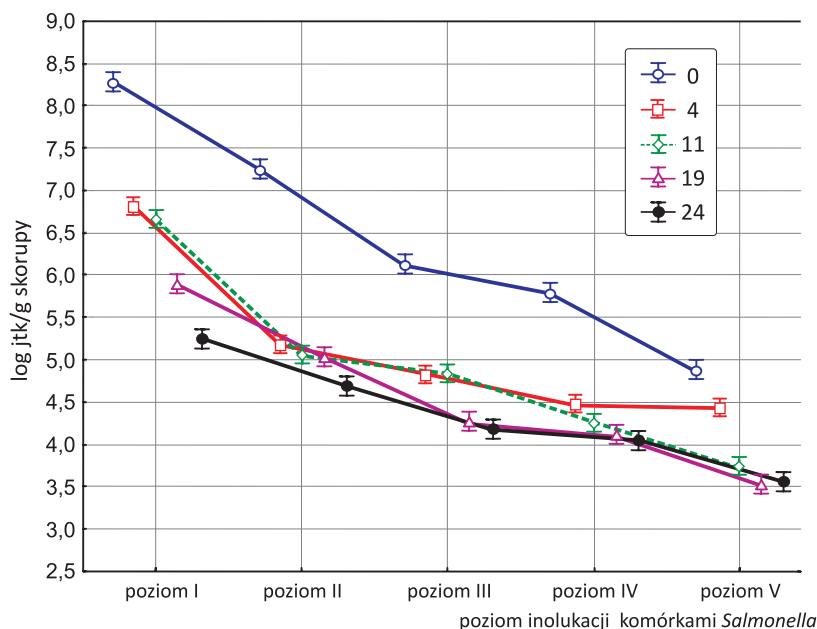
**Rysunek 2.** Wpływ promieniowania UV-C 254 nm ilość komórek bakterii *E. coli* (poziom I –  $10^8$  jtk/g skorupy, poziom II –  $10^7$ , poziom III –  $10^6$ , poziom IV –  $10^5$ , poziom V –  $10^4$ )

no: 2,5, 2 i 1 cykl log dla dwóch ostatnich poziomów inokulacji. Dane te wskazują na zależność wielkości redukcji liczby komórek na skorupie od poziomu inokulacji, im wyższy zastosowany poziom inokulacji skorupy komórkami badanych drobnoustrojów tym większa była ich redukcja (Rysunek 1 i 2). To zjawisko można uzasadnić specyfiką budowy skorupy jaja. Skorupa ma na swej powierzchni od ok. 7-17 tyś. porów przez które dochodzi m. in. do wymiany gazowej zarodka ze środowiskiem [7]. Stwierdzono, że pory są miejscem, które bakterie mogą zasiedlać – unikając w efekcie szkodliwego wpływu m.in. promieniowania UV-C 254 nm ze względu na jego małą przenikliwość [8]. Przy każdym z poziomów inokulacji prawdopodobnie dochodzi do podobnego zasiedlenia porów skorupy jaj przez bakterie, przez co dodatkowo – niezależnie od poziomu inokulacji skorupy – zmieniała się koncentracja komórek na powierzchni. Dlatego też uzyskaną lepszą skuteczność higienizacyjną promieniowania UV-C 254 nm w przypadku zastosowania wyższego poziomu inokulacji upatruje się w większej koncentracji komórek na powierzchni skorupy. W tym przypadku znacznie większa liczba bakterii poddana jest ekspozycji na szkodliwe działanie promieniowania.

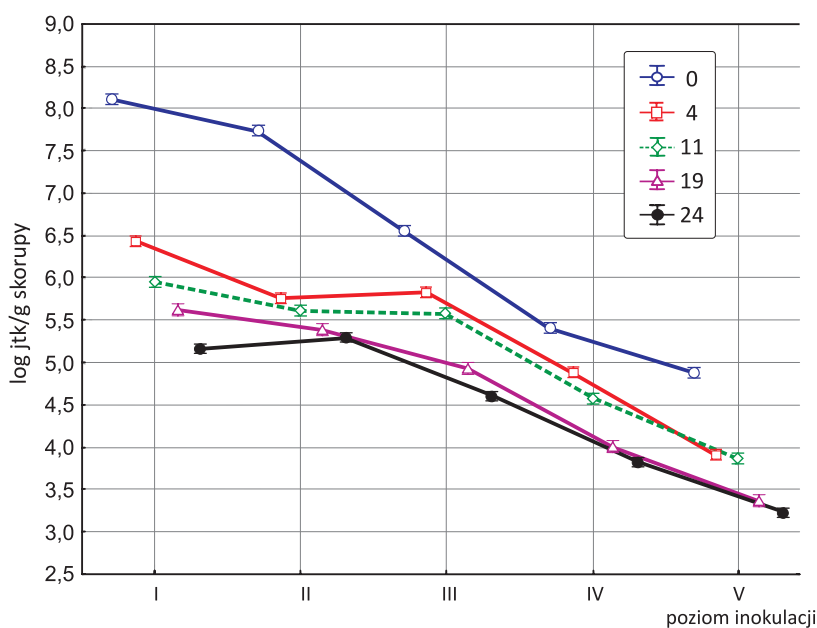
Analizując dane eksperymentalne zaobserwowano również wpływ dawki promieniowania UV-C na redukcję liczby bakterii *S. enteritidis* i *E. coli*. Niezależnie od poziomu inokulacji największy spadek ilości komórek badanych bakterii następuje po naświetleniu dawką 4 J/m<sup>2</sup> tj. 30 sekundach naświetlania powierzchni skorupy promieniowaniem UV-C 254 nm. Zastosowane inne warianty dawek powodowały

redukcję poziomu bakterii na powierzchni skorupy, lecz nie tak dynamiczną jak w przypadku 4 J/m<sup>2</sup> (Rysunek 3 i 4).

Na znaczącą redukcję liczebności komórek bakterii po dawce 4 J/m<sup>2</sup> promieniowania UV-C wpływ ma prawdopodobnie ich dostępność, tj.: ilość komórek bakterii na powierzchni skorupy. Większość bakterii na powierzchni skorupy ginie szybko, ze względu na bezpośrednie wystawienie na promienie UV-C. Największą redukcję badanych bakterii zaobserwowano już przy dawce promieniowania 4 J/m<sup>2</sup> tj. po 30 sekundowej ekspozycji, natomiast dalsza redukcja ilości komórek przebiega już mniej dynamicznie ponieważ znaczna ilość bakterii znajduje się w porach skorupy jaj [7]. Brak dostępu promieniowania UV-C 254 nm do wnętrza porów oraz jego mała przenikliwość (od 0,1 do 0,5 mm) uniemożliwiają zatem całkowitą inaktywację drobnoustrojów [9]. Ponadto w prowadzonych badaniach próby przygotowywano przez wytrząsanie skorup w zbuforowanej wodzie peptonowej przez co wymywano bakterie z porów które prawdopodobnie ze względu na niewielką przenikliwość promieniowania UV mogły przeżyć. Należy również brać pod uwagę fakt, że w pierwszej kolejności giną komórki szczególnie wrażliwe np. bezpośrednio po podziale albo komórki uszkodzone subletalnie, które najłatwiej wyeliminować [10]. Tego typu zagrożenia nie uwzględnia metoda alternatywna przygotowania prób mikrobiologicznych z powierzchni skorupy jaja, w której stosuje się zmywanie drobnoustrojów. Ten rodzaj pobierania prób ze skorupy jaj wykorzystał w swoich badaniach Szczawiński i in. (2006) [11]. W metodzie tej podczas splukiwania żywe komórki



**Rysunek 3.** Zmiana liczby komórek bakterii *S. enteritidis* w zależności od poziomu inokulacji powierzchni skorupy jaj bakteriami: poziom I odpowiada  $10^8$  komórek/g skorupy, poziom II –  $10^7$ , poziom III –  $10^6$ , poziom IV –  $10^5$ , poziom V –  $10^4$  i dawki promieniowania UV-C 254 nm ( $J/m^2$ )



**Rysunek 4.** Zmiana liczby komórek bakterii *E. coli* w zależności od poziomu inokulacji powierzchni skorupy jaj bakteriami: poziom I odpowiada  $10^8$  komórek/g skorupy, poziom II –  $10^7$ , poziom III –  $10^6$ , poziom IV –  $10^5$ , poziom V –  $10^4$  i dawki promieniowania UV-C 254 nm ( $J/m^2$ )

bakterii pozostają w porach skorupy, czego skutkiem jest otrzymanie 100% redukcji drobnoustrojów na powierzchni skorupy jaj poprzez zastosowanie promieniowania UV-C 254 nm. W badaniach Szczawińskiego (2006) [11] uzyskano całkowitą redukcję bakterii *S. enteritidis* z powierzchni skorupy po naświetlaniu jaj celowo zakażanych ( $10^6$  jtk/powierzchni skorupy) promieniowaniem UV-C 254 nm po 270 s. W badaniach innych autorów: Coufal i in. (2003)

[13], Rodriguez-Romo i Yousef (2004) [14] również uzyskano redukcję liczby drobnoustrojów w wyniku naświetlania powierzchni skorupy promieniowaniem UV-C. Jednakże porównanie uzyskanych wyników z danymi z piśmiennictwa jest utrudnione, ze względu na różnicę w metodyce badań prowadzonych przez różnych autorów. Stosowano zróżnicowany czas ekspozycji na promieniowanie, odmienne rodzaje lamp, sposoby przeliczania wyników, metody

celowego zanieczyszczania jaj, oraz pobierania z nich prób. W badaniach Coufal i in. (2003) uzyskano redukcje *S. enteritidis* o 4 log w czasie 4 minut naświetlania jaj promieniowaniem UV-C 254 nm [13]. Rodriguez-Romo i Yousef (2004) uzyskali redukcję *S. enteritidis* o 3,4; 3; 4,3 log po odpowiednio 1; 3 i 5 minutach ekspozycji jaj na promieniowanie UV-C 254 nm przy stężeniu początkowym 6,3 log/g skorupy [14].

#### 4. WNIOSKI

1. Naświetlanie powierzchni skorupy jaj konsumpcyjnych promieniowaniem UV-C o długości fali 254 nm w badanym przedziale dawek znacząco redukuje ilość bakterii *S. enteritidis* i *E. coli* na każdym z 5 poziomów inokulacji zastosowanych w eksperymencie, przy czym skuteczność inaktywacyjna UV-C rośnie proporcjonalnie do ilości komórek bakteryjnych na gramie skorupy.

2. Największy stopień redukcji drobnoustrojów na powierzchni jaj celowo zanieczyszczanych bakteriami *S. enteritidis* i *E. coli* uzyskano po zastosowaniu dawki promieniowania UV-C o wielkości 4 J/m<sup>2</sup> tj. 30 sekundowej ekspozycji.

#### 5. PODSUMOWANIE

W przeprowadzonych badaniach wykazano, że promieniowanie UV-C 254 nm skutecznie inaktywuje bakterie *S. enteritidis* i *E. coli*. Mając na uwadze, że naturalne zakażenie skorupy jaj jest o kilka rzędów wielkości mniejsze od inokulatów zastosowanych w przeprowadzonych badaniach, można stwierdzić, że dla jaj wizualnie czystych, 30 sekundowa ekspozycja (4 J/m<sup>2</sup>) na promieniowanie UV-C 254 nm istotnie redukuje drobnoustroje z powierzchni skorupy jaj, przyczyniając się do zwiększenia poziomu bezpieczeństwa konsumenta.

#### LITERATURA

- [1] Kijowski J., Kołożyn-Krajewska D., Sikora T.: Jakość żywności i czynniki ją kształtujące. W: Kijowski J., Sikora T. (red.): Zarządzanie jakością i bezpieczeństwem żywności. Integracja i informatyzacja systemów. WNT, Warszawa 2003, s. 1-7.
- [2] Cox N. A., Richardson L. J., Buhr R. J., Musgrove M. T., Berrang M. E., Bright W.: Bacterial effect of several chemicals on hatching eggs inoculated with *Salmonella* serovar Typhimurium. J. Appl. Poult. Res. 2007, 16: 623-627.
- [3] Cogan T. A., Domingue G., Lappin-Scott H. M., Benson C. E., Woodward M. J., Humphrey T. J.: Growth of *Salmonella enteritidis* in artificially contaminated eggs: the effects of inoculum size and suspending media. Int. J. Food Microbiol. 2001, 70: 131-141.
- [4] Hutchinson M. L., Walters L. D., Gittins J., Drysdale L., Sparks N.: Egg washing using small-scale bucket washer. World's Poultry Sci. Assoc. 2006, 62: 259-265.
- [5] Szablewski T., Kijowski J., Cegielska-Radziejewska R., Dziedzic A., Kamińska A.: Wpływ promieniowania UV na stan mikrobiologiczny skorupy oraz jakość treści jaj. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość. 2009, 2, (63): 40-52.
- [6] Gardner D. W. M., Shama G.: UV intensity measurement and modeling and disinfection performance prediction for irradiation of solid surfaces with UV light. Trans IChemE. 1999, 77, C: 232-242.
- [7] Węsierska E.: Czynniki jakości mikrobiologicznej spożywczych jaj kurzych. Med. Wet. 2006, 62, 11: 1222-1228.
- [8] Bolton, J. R., and K. G. Linden.: Standardization of methods for fluence UV dose determination in bench-scale UV experiments. J. Environm. Eng. 2003, 129: 209-215.
- [9] Grzesińska W.: Wygrać z *Salmonellą*. Przegl. Gastronom. 2005, 2: 10-12.
- [10] De Reu K., Grijspeerdt K., Herman L., Heyndrickx M., Debevere J., Puterbaugh F. F., Bolder N. M.: The effect of a commercial UV disinfection system on the bacterial load of shell eggs. Lett. Appl. Microbiol. 2006, 42: 144-148.
- [11] Szczawiński J., Klusek A., Szczawińska M. E.: Parameters of growth curves of *Salmonella enteritidis* subjected to conventional heat or microwave treatment. Bull. Vet. Inst. Pulawy. 2009, 53: 627-632.
- [12] Coufal, C. D., C. Chavez, K. D. Knappe, and J. B. Carey.: Evaluation of ultraviolet light sanitation of broiler hatching eggs. Poult. Sci. 2003, 82: 754-759.
- [13] Rodriguez-Romo L. A., Yousef A. E.: Inactivation of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis on shell eggs by ozone and UV radiation. J Food Prot. 2005, 68: 711-717.