

STRESZCZENIE

Stan fizjologiczny wybranych patogenów w sokach z warzyw korzeniowych po procesie utrwalania wysokim ciśnieniem

Doniesienia literaturowe potwierdzają indukowanie niejednorodnej populacji drobnoustrojów po działaniu wysokiego ciśnienia (ang. high hydrostatic pressure - HHP), włączając populację uszkodzoną subletalnie. Komórki uszkodzone subletalnie charakteryzuje wydłużona faza zastoju, bardzo niski poziom aktywności metabolicznej i wrażliwość na składniki selektywne, co przekłada się na niedoszacowanie lub nawet niewykrycie żywych komórek w badanej próbce metodami klasycznymi. Stymulacja mechanizmów naprawczych w komórce i szybka umiejętność adaptacji do zmienionych warunków mogą przyczynić się do namnożenia mikroorganizmu w żywności szczególnie podczas niewłaściwego przechowywania.

Rozprawa doktorska poświęcona jest analizie stanu fizjologicznego komórek bakteryjnych *E. coli* oraz *L. innocua* poddanych działaniu HHP, ze szczególnym uwzględnieniem możliwości regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie w sokach z warzyw korzeniowych podczas 4-tygodniowego okresu przechowywania w dwóch temperaturach (5°C oraz 25°C).

Przebadano w jaki sposób parametry procesu wpływają na rodzaj indukowanych uszkodzeń w komórkach bakterii. Zbadano także wpływ rodzaju matrycy, temperatury, rodzaju drobnoustroju i specyfiki wywołanych zmian w komórce na proces regeneracji komórek uszkodzonych subletalnie. Dodatkowo praca została wzbogacona o aktualny stan wiedzy dotyczący uszkodzeń subletalnych wywołanych przez wysokie ciśnienie.

Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie, że działanie HHP w zakresie 300-500 MPa generuje niejednorodną populację bakterii. Analiza mikroskopowa udowodniła, że HHP wywołuje zmiany w obszarze cytoplazmy i genomu bakteryjnego. Potwierdzono, że stopień inaktywacji badanych szczepów zwiększa się wraz ze wzrostem zadanego ciśnienia, natomiast nie w każdym przypadku wydłużenie czasu ekspozycji przy zachowaniu stałego ciśnienia skutkowało zmniejszeniem liczby żywych komórek w populacji. Wykonane badania nie wykazały jednoznacznej zależności pomiędzy parametrami procesu HHP oraz rodzajem matrycy, a poziomem wywołanych uszkodzeń subletalnych w komórkach badanych bakterii. Udowodniono, że charakter medium oraz pochodzenie szczepów wpływają na wrażliwość populacji względem metody HHP.

Ostatnią część badań stanowiły próby przechowalnicze z wyznaczeniem potencjału wzrostu (δ) testowych bakterii oraz współczynnika regeneracji (R_r). Wykazano, że sok z marchwi wspomagał wzrost komórek *L. innocua* w temperaturze 5°C. Obserwowano regenerację komórek uszkodzonych subletalnie w soku z marchwi dla większości badanych szczepów. Nie odnotowano regeneracji ani wzrostu liczby komórek w populacjach badanych szczepów zawieszonych w soku z buraków ćwikłowych w czasie przechowywania w obydwu temperaturach. Pomimo iż analizy mikrobiologiczne przeprowadzono zgodnie z obowiązującymi normami, w których zapewniona była regeneracja komórek uszkodzonych subletalnie, wzrost *E. coli* na selektywnej pożywce TBX był słabszy niż na płytkach dwuwarstwowych TAL. Uzyskane wyniki potwierdzają zasadność zastosowania płytek dwuwarstwowych TAL do oceny bezpieczeństwa mikrobiologicznego badanych soków z warzyw korzeniowych poddanych działaniu HHP. Dodatkowo praca została wzbogacona o aktualny stan wiedzy dotyczący uszkodzeń subletalnych wywołanych przez wysokie ciśnienie.

Podsumowując, w pracy udowodniono zdolność komórek uszkodzonych subletalnie w wyniku działania HHP do regeneracji w soku z warzyw korzeniowych o pH bliskim obojętnemu.

Słowa kluczowe: uszkodzenia subletalne, wysokie ciśnienie hydrostatyczne (HHP), soki z warzyw korzeniowych, badania przechowalnicze, potencjał wzrostu, mikroskopia epifluorescencyjna (EFM), skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

ABSTRACT

The physiological state of selected pathogens in root vegetable juices after high-pressure processing

Scientific research has confirmed that high hydrostatic pressure (HHP) treatment induces a heterogeneous population of microorganisms, including the sublethally injured population. Sublethally injured cells are characterized by an extended stagnation phase, a very low level of metabolic activity and sensitivity to selective components. The above-mentioned may underestimate its presence or even not detect the living cells in the sample when classical methods are used. Stimulation of repair mechanisms as well as the quick cell ability to adapt to modified conditions may result in the multiplication of the microorganism in food, especially during improper storage.

The doctoral dissertation is devoted to the analysis of the physiological state of HHP-treated *E. coli* and *L. innocua* bacterial cells, with particular emphasis on the possibility of regeneration of sublethally injured cells in root vegetable juices during a 4-week storage at two temperatures (5°C and 25°C).

It was examined how the process parameters affect the type of induced damage in bacterial cells. The influence of the type of matrix, temperature, type of microorganism and the specificity of the induced changes in the cell on the regeneration of sublethally damaged cells was also determined.

The obtained results clearly indicate that the HHP method in the range of 300-500 MPa generates a heterogeneous population of bacteria. Microscopic analysis proved that HHP causes changes in the cytoplasm and bacterial genome. It was confirmed that the level of inactivation of the tested strains increases with the pressure. However, with a constant pressure and the extension of the exposure time, there was no correlation to the inactivation levels observed. The obtained results did not prove a clear relationship between the HHP parameters, the type of matrix, and the level of sublethal damage in the cells of the tested bacteria. It has been proven that the medium character and the origin of the strains affect the HHP sensitivity of the population.

The last part of this research was related to the shelf-life tests. The growth potential (δ) and recovery ratio (R_r) were determined. The results of this study indicate that carrot juice supports the growth of *L. innocua* at 5°C. The regeneration of sublethally injured cells in carrot juice was observed for most of the tested strains. There was neither any regeneration nor bacterial increase in beetroot juice during storage at both temperatures. Although the microbiological analyses were carried out in accordance with the applicable ISO standards, which ensured the regeneration of sublethally damaged cells, the growth of *E. coli* was lower on the selective TBX medium than on the TAL plates. The obtained results confirmed the TAL validity to assess the microbiological safety of the tested HHP-treated root vegetable juices. Additionally, the paper presents the current state of knowledge regarding sublethal injuries caused by high pressure.

In conclusion, the paper proved the abilities of HHP - sublethally injured cells to regenerate in low-acid root vegetable juice.

Key words: sublethal injury, high hydrostatic pressure (HHP), root vegetable juices, shelf-life studies, growth potential, epifluorescence microscopy (EFM), scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM)