

Ověření baktericidního účinku UV lampy pro ošetření pracovních ploch kontaminovaných *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli*

Brychta Tomáš¹, Brychta Josef², Steinhauserová Iva¹, Klímová Eva²,

¹- Ústav hygieny a technologie masa, VFU Brno

²- Státní veterinární ústav Jihlava, NRL pro *Listeria monocytogenes*

Summary

This study has been aimed at two experiments.

First experiment was the observation of the bactericidal effect of UV light (254 nm) on bacterial populations of *Listeria monocytogenes* (mixture of 3 most common serotypes) and *Escherichia coli* (mixture of two different isolates) with exposition from 1 – 20 minutes. Test was performed on Petri dishes (ALOA and PALCAM for *Listeria* and ENDO agar for *Escherichia*) with concentration of bacterial contamination of 100 CFU/cm². It was shown that even 1 minute exposition to UV light is enough to inactivate both bacteria on smooth surface of Petri dish.

Second experiment was aimed at possible reduction of bactericidal effect of UV light (254 nm) on bacterial populations of *Listeria monocytogenes* (mixture of 3 most common serotypes) and *Escherichia coli* (mixture of two different isolates) by shadow created by crumbs, fluff and pin placed directly onto Petri dish and by paperclip and polyetylen bag put above Petri dish. We discovered that crumbs and pin placed directly onto Petri dish created shadow enough to block the inactivation. No blocking of inactivation was discovered in case of paperclip, polyetylen bag and fluff.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, UV light, germicidal lamp

Klíčová slova: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, UV záření, germicidní lampa

Úvod

Existuje celá řada způsobů jak odstraňovat bakterie z prostředí, z povrchu pracovních ploch, výrobních zařízení, obalů a dalších materiálů. Jednou z cest je využití UV záření (UV světla/germicidního účinku / ultrafialového záření / UV lampy, atd.).

UV záření je vhodné používat především pro dekontaminaci vody, vzduchu a povrchů ve výrobním prostředí. Neproniká do potravin či jiných materiálů. Lze ho tedy využít pouze tam, kde se jedná o přímé působení tohoto záření na bakterie a viry.

UV záření je forma elektromagnetické radiace, která však nesmí být zaměňována za nukleární radiaci (WHO, 2010a) a je definováno jako část elektromagnetického spektra mezi alfa paprsky a viditelným světlem

Obrázek č.1 Rozložení spektra slunečního záření

(<http://www.uvbnarrowband.com/index.php/2009/04/uva-puva-what-and-why/>)

UV spektrum je složeno ze třech základních druhů záření, což ve skutečnosti představuje vlnovou délku mezi 40 až 400 nm [30 – 3 eV]. Jedná se o typ záření UVA s vlnovou délkou 315 – 400 nm, záření UVB s vlnovou délkou 280 – 315 nm a záření UVC, které má vlnovou délku 100 – 280 nm (WHO, 2010a).

Záření UVA je nejběžnější částí UV spektra. Vystavení UVA záření způsobuje tmavnutí kůže při opalování a také umožňuje syntézu vitamínu D (WHO, 2010b).

Záření UVB je nejničivější součástí UV spektra. Má dostatek energie, aby mohlo způsobit fotochemické poškození buněčné DNA. Bylo prokázáno, že je hlavní příčinou vzniku nádorů kůže, popálenin při opalování, šedého zákalu apod. (WHO, 2010b).

Typ záření UVC se v přirozeném životním prostředí téměř nevyskytuje. Je kompletně pohlcováno při průchodu atmosférou. Z toho důvodu je nutné vytvářet ho uměle. Mezi nejdůležitější zdroje umělého UVC záření patří germicidní lampy. Ty jsou konstruovány tak, aby vyzářovaly právě UVC a to kvůli jeho schopnosti ničit bakterie. Ohrožení zdraví člověka při náhodném ozáření UVC je minimální, protože UVC je pohlcováno svrchními, odumřelými, buňkami pokožky. Škodlivost se omezuje především na poškození oční rohovky (Zeman, 2009)

Germicidní lampy

Jsou využívány pro vytváření UV záření typu C. Jejich účinek je založen na emisi záření o vlnové délce blízko 254 nm, což je záření s nejvyšším baktericidním účinkem (Anonymous, 2009).

Baktericidní účinek spočívá v proniknutí záření do buňky a následnému poškození DNA. UVC záření účinkuje na elektrony a ruší tak chemické vazby, které drží pohromadě atomy v molekule DNA. Dále vyvolává reakci mezi dvěma molekulami thyminu, která je jedna ze základních součástí DNA. Mezi dvěma sousedními molekulami thyminu vzniká vazba a ty tak tvoří dvojici (dimer). Tato vazba je velmi stabilní a dostatečné množství dimeru thyminu zabráňuje replikaci DNA, tím i množení bakterií a vede nakonec k buněčné smrti (Anonymous, 2009).

V případě dostatečně velké dávky UVC záření jsou bakterie zničeny. V případě nedostatečného ozáření, z jakéhokoli důvodu, dokáží bakterie poškozenou strukturu DNA v krátkém časovém úseku opravit. Většina mikroorganismů produkuje enzymy, které dokáží opravit poškození způsobené UV zářením. Účastní se dvou procesů – fotoreaktivace a "dark repair". Fotoreaktivace je zprostředkována enzymem (PRE), který se naváže na thyminový dimer a za přítomnosti viditelného světla rozruší vazbu a uvede molekulu DNA do původního stavu. "Dark repair" je zprostředkována jinými enzymy, nukleázami, které hydrolyzují část molekuly DNA s vytvořenými dimery thyminu. Tato část je pak znovu syntetizována a tak se molekula DNA dostává opět do původního stavu. (Sinha et Häder, 2002)

Způsob desinfekce a sterilizace pomocí ultrafialového záření ve spektru C je ve zdravotnických zařízeních, výrobě potravin a v jiných dalších provozech dostatečně znám a využíván. Záření účinně ničí mikroorganismy v ovzduší, kapalinách a na povrchu pevných látek.

Pro potřebnou inaktivaci mikroorganismů je však zapotřebí volit dávku ozáření, která je rozdílná podle typu mikroorganismů. Ke správné aplikaci germicidních lamp v praxi je však nutné dodržovat určité zásady, aby sterilizace byla účinná. Jsou dobře známy hodnoty dávek ozáření pro různé mikroorganismy, při požadavku 90% dezaktivace. Pro 99% dezaktivaci je nutné volit dávku alespoň dvojnásobnou. (Menetrez et al., 2010)

Velkou výhodou UV záření je, že nemění sensorické vlastnosti potravin a nezpůsobuje žádné změny v jejich složení (Stermer et al., 1987, Wallner-Pendleton et al., 1994).

Práce je součástí řešení výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MSM6215712402.

Cíle práce

Cílem práce bylo zjistit, do jaké míry mohou různé nečistoty ovlivnit germicidní účinek UV lampy na *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli*. *L. monocytogenes* je významný patogen vyskytující se v potravinách a je považována odolnou vůči UV záření. *E. coli* je naopak považována za citlivější k UV záření (Rowan et al., 1999).

Materiál a metodika

Bakteriální kmeny *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli* byly získány ze stěrů z prostředí masného průmyslu. Jako uměle kontaminovaný povrch byly využity plastové Petriho misky, kam byly nanесeny testované bakterie v množství cca 100 buněk na cm² (cca 5500 buněk na misce) vyočkované roztěrem. Pro kultivaci byla využita selektivní media. Pro *E. coli* byl použit Endův agar a pro *L. monocytogenes* byl použit ALOA (agar pro *Listerie* dle Ottavianiho a Agostiho) a PALCAM. Různá kultivační media pro *Listeria monocytogenes* byla použita pro vyloučení očekávaného negativního ovlivnění media UV zářením, což se nakonec neprojevalo.

Jako zdroj UV záření byla použita germicidní lampa NBV 2x30PLW (ULTRAVIOL sp.j., Polsko).

Celý pokus byl rozdělen na dva odlišné experimenty. V prvním experimentu se jednalo o 30ti minutový jednorázový osvit Petriho misek s naočkovanými kmeny *Listeria monocytogenes* nebo *Escherichia coli*. Bylo testováno omezení účinku UV světla na testované bakterie uměle vytvořeným stínem.

Obrázek č. 2: Příprava na ozáření – tvorba stínu

Stín byl vytvořen zakrytím misky polyetylenovým sáčkem, položením drobků (strouhanka) na povrch agaru, položením špendlíku na povrch agaru, položením kancelářské svorky nad agar na okraje misky tak, aby se nedotýkala media, položením chomáče prachu na povrch agaru, a jako kontrola byly použity Petriho misky bez zakrytí (obrázek č. 2). Vzdálenost UV lampy od Petriho misek byla jeden metr. Ozáření bylo provedeno na miskách bez jakéhokoliv stínu pod úhlem 45° a pod úhlem 90°, a na miskách s vytvořeným stínem pod úhlem 45° a pod úhlem 90°.

V druhém experimentu se jednalo o ověření germicidního účinku UV záření v závislosti na čase. Expozice byla volena v minutových intervalech. Doba osvitu byla 1 – 20 minut, po každé uplynulé minutě ozařování byly odebrány 2 misky od každého kmene. Vzdálenost UV lampy od Petriho misek byla jeden metr. Ozáření bylo provedeno pod úhlem 90°.

Po osvitu byly veškeré stínící materiály sterilně odstraněny a Petriho misky byly inkubovány dle ČSN ISO 11290-2 pro stanovení počtu *Listeria monocytogenes* a v případě *Escherichia coli* při 37 °C po dobu 24 hodin na Endově agaru.

Výsledky

Z testovaných stínících materiálů neměly žádný vliv na účinnost UV záření polyetylenový sáček, chomáč prachu a kancelářská svorka. Omezení účinnosti UV záření se naopak projevilo u špendlíku a drobků.

Již jednodominutová expozice UV záření způsobila snížení počtu testovaných mikroorganismů o více než 4 řády.

Tabulka č.1: Devitalizace bakterií UV lampou NBV 2x30PLW na uměle kontaminovaném médiu (cca 100 KTJ/cm²)

min.	<i>E.coli</i>	LM (ALOA)	LM (PALCAM)	min.	<i>E. coli</i>	LM (ALOA)	LM (PALCAM)
	pozitivní	pozitivní	pozitivní		pozitivní	pozitivní	pozitivní
1	0	0	0	11	0	0	0
2	0	0	0	12	0	0	0
3	0	0	0	13	0	0	0
4	0	0	0	14	0	0	0
5	0	0	0	15	0	0	0
6	0	0	0	16	0	0	0
7	0	0	0	17	0	0	0
8	0	0	0	18	0	0	0
9	0	0	0	19	0	0	0
10	0	0	0	20	0	0	0

Vysvětlivky:

LM – *Listeria monocytogenes*

Diskuse

U obou testovaných bakterií byl prokázán výrazný baktericidní efekt UVC záření.

U testovaných bakterií nebyla prokázána odlišná účinnost UVC záření při osvitu pod úhlem 45° oproti osvitu pod úhlem 90°. Pouze se projevil nárůst bakterií při osvitu pod úhlem 45° ve stínu vrhaném okrajem Petriho misky. Materiál, ze kterého jsou petriho misky vyrobeny je neprostupný pro UVC záření.

Žádný stínící efekt (žádné snížení germicidního efektu UV záření) nebyl zjištěn u misky zakryté polyetylenovým sáčkem, misky s kancelářskou svorkou položenou na okraj misky a u misky s položeným chuchvalcem prachu.

Stínící efekt (snížení germicidního efektu UV záření) byl naopak prokázán u víčka Petriho misky, u drobků (obrázek č. 3 a 4) a u špendlíku (obrázek č. 5 a 6).

Z dosažených výsledků lze vyvodit vztah propustnosti jednotlivých materiálů a omezení baktericidního účinku UV záření:

1. materiál prostupný pro UV záření (polyetylenový sáček) nesnižuje baktericidní účinek UVC záření
2. materiál neprostupný pro UVC záření (víčko Petriho misky, drobků) snizuje baktericidní účinek UVC

3. materiál neprostupný pro UVC záření nesnižuje baktericidní účinek UV pokud je dostatečně tenký a dostatečně daleko od místa výskytu bakterií. Tato vzdálenost stínícího předmětu od bakterií musí být dostatečná, aby se UV záření mohlo lámat a zasáhnout tak celý ozařovaný povrch. Toto se v našem případě projevilo u kancelářské svorky umístěné na Petriho misce tedy asi 4 mm nad médiem. Stejný efekt byl pozorován u špendlíku. Části, které se přímo dotýkaly media (hlavička a špička) vytvořily dostatečný stín pro snížení účinnosti UV záření. Část špendlíku u hlavičky, která se media přímo nedotýkala (asi 1 mm nad médiem), umožnila lom UV a nesnížila tedy baktericidní efekt UVC.

Jak vyplývá z dosažených výsledků (viz tabulka č. 1) UVC záření mělo plný baktericidní efekt již po jednodominutové expozici, při přímém ozáření testované plochy (za 1 minutu došlo k redukci bakteriální populace o 4 logaritmické řády). Tyto výsledky souhlasí s výsledky dalších (Menetrez et al., 2010), kteří sice pracovali s jinými mikroorganismy (*Deinococcus radiodurans*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus epidermidis*), ovšem za stejných podmínek ozáření a také prokázali snížení bakteriální populace testovaných kmenů o 4 řády.

Lepšího efektu lze místo stálého osvětlení UV zářením dosáhnout použitím záření pulsního (MacGregor et al., 1998). Dále z výsledků vyplývá, že tento baktericidní efekt UV může být narušen přítomností předmětů, které nepropouští UV a tím vytvoří stín, který má ochranný efekt pro bakterie.

Byla provedena srovnávací studie citlivosti různých patogenních bakterií z potravin, která prokázala, že *Listeria monocytogenes* je nejvíce odolná vůči UV záření. Srovnání citlivosti vypadalo takto: *L. monocytogenes* > *Staphylococcus aureus* > *Salmonella enteritidis* > *E. coli* > *Bacillus cereus* (Rowen et al., 1999). V naší studii nebyla vyšší odolnost prokázána ani v případě uplatnění stínícího efektu a ani v případě lomu UV záření (špendlík, kancelářská svorka). Důvodem je, že i nejkratší expozice, v našem případě jednodominutová, způsobila devitalizaci obou dvou testovaných kmenů bakterií. Stín měl stejný efekt na obě testované bakterie, nedovolil kontakt UV záření s bakteriemi a v obou případech neovlivnil jejich růst.

UV záření jako metoda povrchové desinfekce je použitelná v případech kdy nedochází ke stínění ošetřovaného povrchu žádnou překážkou neprostupnou pro UVC. Vhodná pro ošetření povrchu baleného masa (Djenane et al., 2001), ovšem pouze v případě balení do obalů propouštějících UV záření, pro ošetření povrchu čerstvého masa (Stermer et al., 1987, Wong et al., 1998), povrchu ryb (Huang et Toledo, 1982), vaječné skořápky (Kuo et al., 1997) a podobně. Stermer et al. (1987), Wallner-Pendleton (1994), Wong et al. (1998) prokázali, že na povrchu potravin, jejichž povrchová struktura vytváří malé stíny, absorbují bakterie menší dávku záření, než jakou by absorbovali na povrchu rovném, jako byla v našem případě Petriho miska. Reálná odolnost bakterií bude, díky povrchovým nerovnostem, větší než ukázali naše experimenty.

Závěr

Používání UV ozařování je alternativní metodou desinfekce, jejíž hlavní výhodou je, že neovlivňuje nežádoucím způsobem barvu, chuť a vůni potravin.

Prokázali jsme, že UVC záření z germicidní lampy je dostatečně účinné pro devitalizaci testovaných bakterií již při velmi krátké expozici a to jak při 45°, tak i při 90° expozici.

Na druhé straně je ale potřeba konstatovat, že tento účinek může být zeslaben nebo plně znemožněn různými předměty nebo nečistotami, které se vyskytují přímo na ošetřované ploše a mohou vytvářet ochranný stín pro bakterie. Bez důkladné mechanické očisty ošetřovaného povrchu nemusí tedy být dosažen očekávaný baktericidní účinek. A stejně jako v případě desinfekčních látek se nejedná o stoprocentně účinnou metodu pro devitalizaci mikroorganismů.

Pokud provozovatel potravinářského podniku uvažuje o použití UV záření pro snížení povrchové mikrobiologické kontaminace u vyráběných balených potravin, měl by dobře znát propustnost používaných balících materiálů pro UV záření. A v případě užívání UV záření pro povrchovou desinfekci potravin je třeba si uvědomit, že potraviny mají povrch členitý a tedy dávka UV záření nutná k inaktivaci povrchové mikroflory je tedy vyšší než v případě ozařování rovných povrchů.

Literatura

Anonymous, 2009: Effect of Ultraviolet Radiation on Bacteria. <http://www.scribd.com/doc/16520509/Lab-05-Effect-of-UV-Radiation-on-Bacteria>, Adapted from CLAUS, G. WILLIAM. Effect of ultraviolet radiation on DNA, cell viability, and mutation frequency. Exercise 39 in *Understanding Microbes: A Laboratory Textbook for Microbiology*. New York: W. H. Freeman and Co., 1989, pp. 333–346.] Accessed Nov. 2010

Djenane D., Sanchez-Escalante A., Beltran J. A., Roncales P., 2001: Extension of the retail display life of fresh beef packaging in modified atmosphere by varying lighting conditions. *Journal of Food Science* 66, 181-186

Huang Y. W., Toledo R., 1982: Effect of high doses of high and low intensity UV irradiation on surface microbial counts and storage-life of fish. *Journal of Food Science* 47, s. 1667-1669

Kuo F-L., Carey J. B., Ricke S. C., 1997: UV irradiation of shell eggs: Effect on population of aerobes, molds, and inoculated *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Protection* 60, 639-643

MacGregor S. J., Rowan N. J., McIlvaney L., Anderson J. G., Fouracre R. A., Farish O., 1998: Light inactivation of food-related pathogenic bacteria using a pulsed power source. *Letters of Applied Microbiology*, 27, s. 67 – 70

Menetrez, M. Y., Foarde, K. K., Dean T. R., Betancourt D. A., 2010: The effectiveness of UV irradiation on vegetative bacteria and fungi surface contamination. *Chemical Engineering Journal*, 157, s. 443-450

Rowan N. J., MacGregor S. J., Anderson J. G., Fouracre R. A., McIlvaney L., Farish O., 1999. Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. *Applied Environmental Microbiology* 65, s. 1312-1315

Sinha R. P. et Häder D.-P., 2002: UV-induced DNA damage and repair: a review
Photochemical and Photobiological Sciences. 1, 225–236

Standardní metodika pro biologickou kontrolu účinnosti germicidních zářivek HEM-344.2-4.11.91

Stermer R. A., Lasater-Smith M., Brasigton C. F., 1987: Ultraviolet radiation – an effective bactericide for fresh meat. *Journal of Food Protection* 50, s. 108-111

WHO, 2010a: <http://www.who.int/uv/en/> Accessed Nov. 2010

WHO, 2010b: <http://www.who.int/uv/faq/uvhealthfac/en/index.html> Accessed Nov. 2010

Obr. Č. 1: Vizualizace rozložení světelného spektra:

Wallner-Pendleton E. A., Sumner S. S., Froning G. W., Stetson L. E., 1994. The use of ultraviolet radiation to reduce *Salmonella* and psychrotrophic bacterial contamination on poultry carcasses. *Poultry science* 73, 1327-1333

Wong E., Linton R. H., Gerrard D. E., 1998: Reduction of *Escherichia coli* and *Salmonella senftenberg* on pork skin and pork muscle using ultraviolet light. *Food microbiology* 15, 415-423

Zeman, G, 2009: Ultraviolet radiation, <http://www.hps.org/hpspublications/articles/uv.html>
Accessed Nov. 2010