

FACTORI DE CONTROL AI CREȘTERII MICROORGANISMELOR

Celula microbiană, având o masă redusă, este puternic influențată de condițiile mediului ambiant și reacționează foarte rapid la diferiți factori, fie prin adaptare fie, în caz contrar, prin dispariție. Astfel, creșterea microbiană este dependentă de numeroși factori fizico-chimici și biologici, ceea ce a condus, în cursul evoluției, la adaptări specifice prin stabilirea de intrrelații între microorganisme și mediu.

Pentru a înțelege modul în care celula microbiană reacționează la condițiile mediului ambiant, diferiți factori au fost împărțiți, în mod arbitrar, în trei mari grupe, cu precizarea că, în condiții naturale, bioefectul acestora poate fi cumulativ sau sinergic.

Factorii extrinseci sunt factori exogeni, ai mediului natural/industrial: temperatura, umezeala relativă a aerului, concentrația de oxigen, radiațiile, factori mecanici, factori chimici.

Factorii intrinseci sunt factori dependenți de natura alimentului-biotop, care influențează creșterea și activitatea culturilor starter, dar și natura alterării specifice a produselor alimentare (compoziția chimică și concentrația în nutrienți, indicele de activitate al apei (a_w), pH, rH, structura anatomică ș.a.).

Factorii implicați sunt factori biologici determinați de relațiile ce se pot stabili între diferitele grupe de microorganisme, care alcătuiesc microbiota alimentului respectiv.

Influența factorilor extrinseci asupra microorganismelor

Temperatura. Microorganismele sunt poikilotermice, deci temperatura acestora variază cu cea a mediului. Temperatura are o mare influență asupra proceselor fiziologice ale celulei, deoarece stimulează sau inhibă activitatea echipamentului enzimatic. În funcție de temperaturile posibile ale mediului natural și ca rezultat, diferitele specii prezintă anumite temperaturi cardinale:

Temperatura minimă – temperatura la care mai poate avea loc creșterea, iar dacă temperatura scade sub valoarea minimă, creșterea este oprită;

Temperatura optimă – temperatura la care rata specifică de creștere este maximă;

Temperatura maximă – temperatura la care creșterea este încă posibilă dar prin depășirea acesteia efectul devine letal.

Domeniul general al temperaturilor cardinale pentru majoritatea microorganismelor cu implicații în industria alimentară este situat între 0 și 75 °C și este mai extins în limite de -34 °C ...+250 °C (în cazul arhebacteriilor). Unele microorganisme, care prezintă un domeniu restrâns al temperaturilor cardinale (eugenezice), sunt denumite *stenotermice*, în timp ce microorganismele cu domeniu extins sunt denumite *euritermice*. Astfel, procariotele (bacterii) au un domeniu mai extins decât al eucariotelor (drozdii, funghi filamentoși).

În cadrul domeniului general al temperaturilor cardinale, în funcție de domeniul specific de creștere, microorganismele sunt separate în patru categorii.

Microorganismele psihrofile. În această categorie intră specii care cresc bine la 0 °C, au o temperatură optimă de creștere la 10...15 °C și maximă la aproximativ 20 °C. Se consideră că aproximativ 90% din microbiota apelor prezintă temperaturi optime de creștere la aproximativ 5 °C. Tolerază temperaturi negative și se consideră că temperatura limită pentru creșterea microorganismelor este -10 °C. Din grupa bacteriilor psihrofile de putrefacție fac parte genurile: *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*. Microorganismele psihrofile prezintă sisteme enzimatice active la temperaturi scăzute, deoarece conțin în membrana

plasmatică o concentrație mai mare de acizi grași nesaturați (acid linoleic), ceea ce explică menținerea sa în stare semifluidă la rece și degradarea la temperaturi mai mari de 30 °C.

Microorganismele psihrotrofe sau facultativ psihrofile. Aceste microorganismele au temperatura minimă de creștere la 0 °C, cresc bine la 7 °C și produc, prin păstrare la această temperatură, colonii vizibile sau turbiditate după 7-10 zile de păstrare. Au temperatura optimă de creștere între 20 și 30 °C și maximă la 35...40 °C. În acest grup sunt incluse bacterii din genurile: *Enerobacter*, *Hafnia*, *Yersinia*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *Vibrio*, *Listeria*; drojdii din genurile *Candida*, *Rhodotorula* și mucegaiuri, microorganismele ce pot da alterări ale alimentelor păstrate prin refrigerare.

Microorganismele mezofile. Reprezintă grupul majoritar, cu temperaturi minime la 15...20 °C, temperaturi optime în intervalul 30...40 °C și maxim la temperaturi de peste 45 °C. Cuprinde bacterii, drojdii, mucegaiuri, inclusiv microorganismele patogene pentru om/animale.

Microorganismele termofile. Sunt microorganismele adaptate să crească la temperaturi mai mari de 45 °C și majoritatea au temperaturi optime la 55...65 °C și temperaturi maxime la peste 90 °C.

În cadrul grupului, se diferențiază:

Microorganismele **preferențial termofile** ($T_m=25...28$ °C; $T_o=45...55$ °C, $T_M= 60...65$ °C), din care fac parte bacterii lactice ale genului *Lactobacillus*, unii fungi;

Microorganismele **obligat termofile** ($T_m=37$ °C; $T_o=50...60$ °C, $T_M= 60...75$ °C), din care fac parte specii ale genurilor *Bacillus* și *Clostridium*, actinomicete. Aceste bacterii se înmulțesc mai repede la 60...65 °C și întregul ciclu de dezvoltare are loc în 10-12 ore.

Bacteriile termofile au o fază de lag mai redusă, iar timpul de generație la temperatura optimă de creștere poate să fie aproximativ 10 min.

Microorganismele termofile sintetizează enzime stabile și active la temperaturi ridicate, ca urmare a unui conținut mai ridicat în aminoacizi hidrofobi (glutamină). În ARN-ribozomal al bacteriilor termofile se află un procent mai ridicat al bazelor guanină-citozină care dau stabilitate termică. În compoziția membranei plasmatică intră lipide cu acizi grași saturați, cu punct de topire mai ridicat.

Microorganismele termofile sunt mai pretențioase din punct de vedere nutritiv, necesitând prezența factorilor de creștere în mediu. Sunt afectate de concentrația de oxigen din mediu, deoarece cu creșterea temperaturii scade solubilitatea oxigenului. Între termofile sunt incluse și specii de drojdii ale genului *Candida* și peste 30 de genuri de mucegaiuri (*Mucor*, *Absidia*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium duponti* ș.a.).

Sunt considerate microorganismele **termotolerante** acele microorganismele care continuă să crească și la temperatura de 50 °C și **termodurice** – microorganismele care supraviețuiesc prin expunere la temperaturi relativ ridicate, dar nu necesită aceste temperaturi pentru creștere.

Microorganismele termofile sunt folosite industrial pentru obținerea unor produse lactate acide, pentru obținerea enzimelor termostabile, pentru purificarea apelor reziduale și ca bioindicatori pentru anumite tratamente termice. Pot produce alterarea conservelor și încingerea cerealelor.

Valori minime de temperaturi pentru creșterea bacteriană

Microorganismele	Temperatura minimă de creștere, °C
Vibrio	-5
Yersinia enterocolica	-2
Enterococcus	0
Listeria monocytogenes	1

Clostridium botulinum	3,3
Salmonella	4
Stafylococcus	6,5

Efectul temperaturilor disgezice se referă la efectul temperaturilor subminimale și supramaximale.

Temperaturile subminimale. Păstrarea celulelor la temperaturi situate sub valoarea temperaturii lor minime afectează activitatea în sensul reducerii vitezei de desfășurare a metabolizării substanțelor nutritive și în consecință determină scăderea producerii de proteine/enzime prin biosinteză.

La scăderea temperaturii cu 10 °C sub temperatura minimă, viteza de metabolism se reduce până la 20%, iar explicația constă în faptul că, la temperaturi scăzute, are loc o plierea a moleculelor de proteine, cu formarea de noi legături între lanțurile peptidice, care conduc la mascarea centrului activ al enzimei. Astfel, accesul substratului la catalizator este blocat și nu se mai desfășoară reacțiile de anabolism/catabolism. Celulele pot trece într-o stare latentă de viață, respectiv stare de *psihroanabioză*.

Dacă temperaturile scad sub temperatura de înghețare a apei, celula trece în stare de *crioanabioză* și în acest caz, pot avea loc modificări ireversibile de natură fizico-chimică, care conduc la moartea/distrugerea celulelor. Degradarea ireversibilă este datorată fie cristalelor de gheață, care se formează extracelular/intracelular, fie plasmolizei avansate, ca rezultat al difuziei apei din interiorul celulei în exterior, unde formează cristale mari de gheață.

În condiții de crioanabioză (congelare sub -10 °C), procentul de supraviețuitori se reduce în funcție de specie.

Cunoașterea comportării celulelor și a proceselor care au loc la temperaturi subminimale a condus la numeroase aplicații practice:

- păstrarea prin refrigerare (-2... +8 °C) prelungește durata de păstrare a valorii alimentare a produselor la zile-săptămâni. Durata este limitată în funcție de natura și concentrația microorganismelor aflate pe produs și de gradientul de temperatură. Astfel, prin introducerea alimentelor calde în spațiul de refrigerare, microorganismele continuă să se înmulțească la o rată impusă de viteza de răcire;
- păstrarea prin congelare (-10...-60 °C) nu conduce la o sterilizare a produselor, deoarece microorganismele pot să rămână viabile în produsul congelat în proporție de 10-40% din numărul inițial.

Când congelarea are loc lent (3-72 ore), procentul de supraviețuitori este mai ridicat, deoarece apa migrează din celulă în exterior, formând cristale mari de gheață, nu se produce un șoc termic, astfel încât celula se adaptează și își menține viabilitatea în stare de plasmoliză. O parte din celule sunt distruse de către cristalele care cresc în dimensiuni și cauzează rupturi ale învelișurilor celulare sau datorită prelungirii stării de plasmoliză.

Când congelarea se face rapid, mai ales până la atingerea temperaturii de -20 °C, se formează cristale mici, atât intracelular cât și extracelular, ce pot produce distrugerea membranei și a componentelor celulare, blocarea metaboliților, șoc termic la termofile și mezofile, încât procentul de supraviețuitori este mai mic comparativ cu congelarea lentă. Deoarece prin congelare apa legată nu îngheață, în timpul păstrării se produce deshidratarea, au loc pierderi de gaze O₂/CO₂, modificări de pH de până la 0,2-2 unități și unele proteine sunt ireversibil denaturate. În produse congelate la -20 °C, indicele *a_w* (indicele de activitate al apei – reflectă conținutul de apă liberă pusă la dispoziția microorganismelor pentru reacții chimice, biochimice, transfer de metaboliți prin membrane semipermeabile) este de 0,8 și scade la 0,62 la temperaturi de -50 °C. Din acest motiv, produsele congelate au o durată de păstrare definită, deoarece unele enzime de natură microbiană sau din țesut pot să fie active;

în special lipazele se mențin active până la $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$ și dau modificări senzoriale nedorite, de exemplu în carne, înghețată ș.a.

În funcție de forma celulei, bacteriile pot avea rezistență diferită la congelare: bacteriile sferice sunt mai rezistente decât bacilii. Este important de subliniat că endosporii bacterieni și toxinele ca și bacteriile-agenți ai toxiinfecțiilor alimentare nu sunt afectate de temperaturile din domeniul de congelare.

Congelarea este utilizată și pentru păstrarea culturilor microbiene. Pentru aceasta, celulele recoltate din mediul de cultivare se suspendă într-o soluție de glicerol, lactoză 10% sau xiloză, cu rol stabilizator, apoi se face o congelare lentă cu $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ și se păstrează în această stare de crioanabioză până în momentul folosirii. După decongelare, microorganismele au un timp de generație mai mare decât cel specific și necesită activizarea.

Temperaturi supramaximale. Temperaturile care depășesc cu $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatura maximă de creștere determină în celula microbiană denaturări ireversibile, ce conduc la moartea fiziologică a celulelor, ca rezultat a coagulării proteinelor, al unor procese de oxidoreducere și al inactivării enzimelor. Enzimele (la creșterea temperaturii peste valoarea maximă) suferă modificări în arhitectura moleculară, au loc dezaminări ale unor aminoacizi (de exemplu ale argininei care este mai sensibilă), au loc rupturi în stratul moleculelor de apă legată de moleculele proteice, se produc desfaceri ale legăturilor disulfitice și, în final, are loc inactivarea ireversibilă asociată cu distrugerii parțiale ale învelișurilor celulare. O bacterie este considerată moartă dacă nu mai crește când se inoculează într-un mediu de cultură care, în mod normal, îi asigură creșterea.

Viteza de inactivare termică a celulelor microbiene este dependentă de raportul temperatură/timp, respectiv cu cât crește temperatura se reduce timpul necesar pentru inactivare.

Formele vegetative ale microorganismelor sunt mai sensibile decât formele sporulate. De asemenea, celulele tinere, care au și un conținut mai mare de apă în citosol, sunt mai rapid inactivate decât cele mature. Formele cu cea mai ridicată termorezistență sunt formele sporulate ale bacteriilor din genurile *Bacillus* și *Clostridium*, care necesită încălzirea la $120\text{ }^{\circ}\text{C}$, timp de 5-20 min, în medii umede și $160\text{...}180\text{ }^{\circ}\text{C}$, timp de 45-60 min, în mediu uscat.

Compoziția mediului și valoarea pH-ului influențează viteza de distrugere termică a celulelor. Astfel, medii sau produse alimentare cu pH acid se sterilizează mai ușor, iar produsele bogate în proteine, glucide, lipide, cu rol protector, la aceeași temperatură de sterilizare necesită un timp prelungit.

Un factor biologic important pentru eficiența sterilizării este concentrația de celule în produsul supus sterilizării, deoarece denaturarea termică este un proces de prim ordin și în fiecare fracțiune de timp se distruge o fracțiune din numărul total de celule din produs.

În practica microbiologică de laborator se aplică următoarele regimuri de sterilizare:

- 20 min. La $121\text{ }^{\circ}\text{C}$, în mediu de vapori (autoclav), pentru medii de cultură;
- 1-2 ore, la $170\text{ }^{\circ}\text{C}$, sau 45 min, la $180\text{ }^{\circ}\text{C}$, în aer (etuvă), pentru sticlărie;
- flambare laroșu aplicată în tehnici aseptice pentru ansă și fir.

În practica microbiologică se mai aplică și tindalizarea, care constă în 2-3 pasteurizări repetate, alternate cu perioade în care proba este menținută în condiții favorabile pentru germinarea endosporilor bacterieni. Tindalizarea se aplică mediilor ce conțin substanțe termolabile.