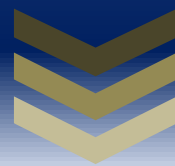


MIKROBIOLOŠKA PREISKAVA ŽIVIL



NAVODILA IN DELOVNI ZVEZEK ZA LABORATORIJSKE
VAJE

Barbara Jeršek

2017

Barbara Jeršek
Navodila in delovni zvezek za laboratorijske vaje pri predmetu
Mikrobiološka preiskava živil

Izdajatelj: Univerza v Ljubljani
Biotehniška fakulteta
Oddelek za živilstvo

Kataložni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani
COBISS.SI-ID=290217984
ISBN 978-961-6908-09-2 (pdf)

Način dostopa: (URL): <http://www.bf.uni-lj.si/knjiznice-odd-za-zivilstvo/ucbeniki-v-elektronski-obliki>

Ljubljana, april 2017

Vse pravice pridržane. Noben del te publikacije se ne sme reproducirati ali uporabiti na kakršenkoli drug način (grafični, elektronski ali mehanski, vključno s fotokopiranjem, snemanjem ali prenosom v baze podatkov) brez pisnega soglasja nosilca avtorskih pravic.

KAZALO

UVOD	1
Priprava vzorcev živil za mikrobiološko preiskavo	1
Priprava matične raztopine vzorca živila	1
Priprava razredčitev vzorca živila	1
Splošen potek mikrobiološke preiskave živila	2
Splošen potek mikrobiološke preiskave živila, s katero ugotavljamo odsotnost določenih mikroorganizmov v določeni masi (volumnu) živila	2
Splošen potek mikrobiološke preiskave živila, s katero ugotavljamo število določenih mikroorganizmov v živilu	2
SKUPNO ŠTEVILO ŽIVIH MIKROORGANIZMOV	4
Skupno število živih mikroorganizmov	4
Število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov	4
Število kvasovk in plesni	5
DOLOČANJE IN ŠTETJE INDIKATORSKIH BAKTERIJ	6
AEROBNE SPOROGENE BAKTERIJE	6
SPLOŠNO	6
IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA	6
ANAEROBNE SPOROGENE BAKTERIJE	7
SPLOŠNO	7
IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA	7
Enterobacteriaceae, KOLIFORMNE BAKTERIJE, BAKTERIJE VRSTE <i>Escherichia coli</i>	8
SPLOŠNO	8
IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA	9
DOLOČANJE IN KVANTIFIKACIJA PATOGENIH IN TOKSIGENIH BAKTERIJ	14
BAKTERIJE RODU <i>Salmonella</i>	14
SPLOŠNO	14
IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ RODU <i>Salmonella</i>	14
BAKTERIJE RODU <i>Proteus</i>	17
SPLOŠNO	17
IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ RODU <i>Proteus</i>	17
BAKTERIJE VRSTE <i>Listeria monocytogenes</i>	18
SPLOŠNO	18
IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ VRSTE <i>L. monocytogenes</i>	18
KOAGULAZA POZITIVNI STAFILOKOKI	21
SPLOŠNO	21
IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA KOAGULAZA POZITIVNIH STAFILOKOKOV	22
BAKTERIJE VRSTE <i>Bacillus cereus</i>	23
SPLOŠNO	23
IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ VRSTE <i>Bacillus cereus</i>	23
SULFITREDUCIRAJOČI KLOSTRIDIJI	24
SPLOŠNO	24
IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ VRSTE <i>Clostridium perfringens</i>	24
MIKROBIOLOŠKA PREISKAVA PITNE VODE	26
SPLOŠNO	26
MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE	26
<i>Escherichia coli</i> in koliformne bakterije (SIST EN ISO 9308-1)	27

Enterokoki (SIST EN ISO 7899-2)	28
Skupno število mikroorganizmov (SIST EN ISO 6222)	28
<i>Clostridium perfringens</i> (mCP)	28
DELOVNI ZVEZEK	29
1. VAJA: Skupno število mikroorganizmov	30
2. VAJA: Število sporogenih bakterij	31
3. VAJA: Koliformne bakterije	32
4. VAJA: Bakterije vrste <i>Escherichia coli</i>	33
5. VAJA: Bakterije rodu <i>Salmonella</i>	34
6. VAJA: Bakterije vrste <i>Listeria monocytogenes</i>	36
7. VAJA: Koagulaza pozitivni stafilokoki	38
8. VAJA: Bakterije vrste <i>Bacillus cereus</i>	39
9. VAJA: Sulfitreducirajoči klostridiji	40
10. VAJA: Mikrobiološka preiskava pitne vode	41
ZAPISKI	43
NAVODILA ZA VARNO DELO	44
VIRI	45
FOTOGRAFIJE	46

UVOD

Po Zakonu o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živali (ZZUZIS) (2000, 2002) in Zakonu o spremembah in dopolnitvah določenih zakonov na področju zdravja (ZdZPZ) (2004) sta dve od enajstih zahtev, ki jih morajo izpolnjevati živila, da so zdravstveno ustrezna oziroma varna, neposredno povezani z mikrobiološkimi preiskavami živil.

Živila so zdravstveno ustrezna oziroma varna, če:

1. ne vsebujejo mikroorganizmov ali parazitov oziroma njihovih razvojnih oblik ali izločkov, ki lahko škodljivo vplivajo na zdravje ljudi;

9. niso njihova sestava ali organoleptične lastnosti (okus, vonj, videz) zaradi fizikalnih, kemičnih, mikrobioloških ali drugih procesov tako spremenjene, da so namensko neuporabna.

V navodilih so zato opisani glavni principi določanja pomembnejših indikatorskih in patogenih mikroorganizmov v živilih ter mikrobiološke preiskave pitne vode.

Priprava vzorcev živil za mikrobiološko preiskavo

Preden začnemo mikrobiološko preiskavo, ugotovimo stanje embalaže, podatke o živilu, ki so napisani na etiketi ali embalaži in morebitna odstopanja od značilnih lastnosti živila. V laboratorijski dnevnik zapišemo datum prevzema vzorca, postopek vzorčenja, naročnikovo ime in naslov ter lastnosti živila. Če živila ne preiščemo takoj, ga shranimo v hladilniku pri temperaturi pod 4 °C. Če živila ne preiskujemo takoj, morajo biti shranjena tako, da ne pride do nobene spremembe v številu in vrsti prisotnih mikroorganizmov (ISO 7218, 1996). Stabilne, pasterizirane in podobne izdelke pregledamo čim prej oz. pred pretekom roka trajanja, sveže in hlajene izdelke v 24 urah; če jih zmrzujemo na -18 °C moramo to navesti v poročilu o preiskavi; pokvarjene izdelke pregledamo čim prej oziroma v 48 urah.

Živila za mikrobiološke preiskave pripravljamo vedno aseptično, da preprečimo kontaminacijo vzorcev iz okolja. Pri embaliranih živilih embalažo obrišemo s 70 % etanolom in v primerih, ko je embalaža steklo ali kovina, jo ožgemo s plamenom. Embalažo odpremo aseptično s sterilnim priborom (na primer: odpiralnik za pločevinke, nož, škarje) in živilo vzamemo s sterilnim priborom (na primer: žlica, pipeta).

Priprava matične raztopine vzorca živila

Matična raztopina je osnovna 10-kratna razredčitev živila. Pripravimo jo zato, da zagotovimo čimbolj enotno in konstantno razporeditev mikroorganizmov v preiskovani količini živila. Odmerimo preiskovano maso ali volumen živila v sterilno čašo ali plastično vrečko, dodamo devetkratno količino topila in suspenzijo homogeniziramo (ISO 6887-1: 1999(E)). Če ni posebnih predpisov, je najmanjša količina preiskovanega živila 10 g (ml). Zato 10 g (ml) dobro premešanega vzorca aseptično zatehtamo v 90 ml topila (oziroma 20 g (ml) v 180 ml topila). Tako dobimo osnovno 10-kratno razredčitev ($R = 10^{-1}$). Vzorec homogeniziramo z gnetilnikom ali mešalom z rezili ("stomacher", "ultra-turax").

Priprava razredčitev vzorca živila

Naslednjo 10-kratno razredčitev dobimo tako, da en volumen osnovne razredčitve (1 ml) prenesemo v devetkratno volumen topila (9 ml). Razredčevanje ponavljamo tolikokrat, da dobimo ustrezno razredčitev živila, ki ga inokuliramo v/na gojišče. Z razredčitvami živila se zmanjšuje količina preiskovanega živila in število mikroorganizmov v enoti volumna.

Kot topilo lahko uporabimo peptonsko sol, puferirano peptonsko vodo (ISO 6887-1: (1999)), fosfatni pufer ali fiziološko raztopino (Downes in Ito, 2001).

Pri živilih z visokim deležem maščob, na primer pri surovem maslu, smetani, sirih, sladoledu, uporabimo namesto fiziološke raztopine 2 % raztopino natrijevega citrata, ki jo segrejemo na 45 °C. Kislim živilom, na primer sadnemu soku, sirupu, osvežilnim pijačam, najprej izmerimo pH, nato pa 100 ml vzorca nevtraliziramo z 0,1 N raztopino KOH. Matično raztopino pripravimo iz nevtraliziranega vzorca.

Zmrznjeno živilo odtajamo v sterilni posodi, v kateri ga nato skupaj z odpuščeno tekočino homogeniziramo. Pri gaziranih pijačah, na primer: pivo, osvežilne brezalkoholne gazirane pijače, odmerimo 150 ml pijače v sterilno erlenmajerico s steklenimi kroglicami in 5 – 10 minut stresamo, da izženemo ogljikov dioksid.

Čas od priprave matične raztopine živila do preiskave naj ne bo daljši od 45 minut. Razredčitve naj bodo pripravljene v prvih 30-ih minutah.

Splošen potek mikrobiološke preiskave živila

V živilih lahko ugotavljamo mikroorganizme kvalitativno v izbrani masi ali volumnu živila (na primer zahteva: bakterije rodu *Salmonella* negativne v 25 g jetrne paštete) ali pa določamo mikroorganizme kvantitativno (na primer zahteva: skupno število aerobnih mezofilnih bakterij ne sme biti večje kot 10^3 cfu/g). Zato imamo dva splošna poteka mikrobioloških preiskav.

Splošen potek mikrobiološke preiskave živila, s katero ugotavljamo odsotnost določenih mikroorganizmov v določeni masi (volumnu) živila

1. **Obogatitev:** Obogatitev uporabimo takrat, ko predvidevamo zelo nizko kontaminacijo, ali kadar preiskujemo večjo maso živila (na primer preiskava 25 g ali 50 g živila na salmonele) ali kadar predvidevamo, da so mikrobne celice poškodovane. Za obogatitev uporabimo neselektivna ali selektivna tekoča gojišča. Namen obogatitve je namnožitev preiskovanih mikroorganizmov do koncentracije, ki je višja od občutljivosti uporabljene metode za izolacijo. Za obogatitev se uporablja tako ne-selektivna kot tudi selektivna gojišča. Homogeniziran vzorec živila v obogatitvenem gojišču inkubiramo določen čas pri določeni temperaturi.
2. **Izolacija:** Obogatitveno suspenzijo po inkubaciji cepimo s cepilno zanko na ustrezna selektivna gojišča, ki jih izberemo glede na vrsto mikrobiološke preiskave. Gojišča inkubiramo določen čas pri določeni temperaturi. Po inkubaciji opazujemo rast značilnih kolonij.
3. **Potrditev oziroma identifikacija:** Značilne kolonije preiskujemo z biokemijskimi in serološkimi testi in tako potrdimo rezultate izolacije oziroma identificiramo mikroorganizme.

Splošen potek mikrobiološke preiskave živila, s katero ugotavljamo število določenih mikroorganizmov v živilu

1. **Priprava razredčitev:** Razredčitve vzorca živila pripravljamo iz matične raztopine, v kateri je živilo že 10x razredčeno ($R = 10^{-1}$). Razredčitve naredimo s sterilno fiziološko raztopino, ki je razdeljena v epruветah po 9 ml. Na primer 100x razredčitev živila ($R = 10^{-2}$) pomeni, da 1 ml matične raztopine odpipetiramo v 9 ml sterilne fiziološke raztopine, 1000x razredčitev živila ($R = 10^{-3}$) pomeni, da 1 ml 100x razredčenega vzorca odpipetiramo v 9 ml sterilne fiziološke raztopine, Pri pripravi razredčitev je pomembno, da je vzorec vedno dobro premešan in da uporabljamo vedno sveže nastavke za pipete. Koliko razredčimo matično raztopino oz. koliko razredčitev pripravimo je odvisno od števila prisotnih mikroorganizmov v živilu.

2. **Izolacija:** Razredčitve vzorca živila cepimo na/v ustrezno trdno ali tekoče gojišče. Po inkubaciji izolacijskega gojišča pri določeni temperaturi po določenem času rezultate kvantificiramo. Primeri:

- Če za izolacijo uporabimo trdno vnaprej v petrijevko razlito gojišče, potem nanj cepimo 0,1 ml razredčitve vzorca živila in ga s sterilno stekleno palčko enakomerno nanesimo po vsej površini.
- Če za izolacijo nimamo vnaprej razlitega trdnega gojišča, cepimo 1 ml razredčitve vzorca živila v sterilno prazno petrijevko. Trdno gojišče raztopimo, ohladimo na 45 °C in v petrijevko z vzorcem dodamo 10 – 15 ml gojišča. Vzorec z gojiščem takoj premešamo »3x gor-dol, 3xlevo-desno«.
- Če za izolacijo uporabimo tekoče gojišče v epruветah (metoda najbolj verjetnega števila MPN), cepimo razredčitve vzorca v tekoče gojišče. Število razredčitev in število uporabljenih epruвет z gojiščem je odvisno od metode MPN.

3. **Kvantifikacija:** Po inkubaciji trdnega izolacijskega gojišča, preštejemo značilne kolonije v tistih petrijevkah, kjer je zraslo števno število kolonij (števna plošča za bakterije 15 – 300 kolonij, števna plošča za plesni 15 – 150 kolonij). Pri izračunu števila mikroorganizmov v 1g ali 1ml vzorca živila (cfu/g, cfu/ml) upoštevamo povprečno število kolonij in razredčitev. Primeri:

- Če imamo števne plošče le pri eni razredčitvi vzorca živila, izračunamo število mikroorganizmov po naslednji formuli:

$$N = \frac{n_p}{R}$$

N število mikroorganizmov v živilu (cfu/ml, cfu/g)
n_p povprečno število kolonij
R razredčitev vzorca živila, pri kateri smo prešteli kolonije

- Če imamo števne plošče pri več razredčitvah vzorca živila, izračunamo število mikroorganizmov po naslednji formuli:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 * n_2) * R}$$

N število mikroorganizmov v živilu (cfu/ml, cfu/g)
Σc vsota vseh kolonij na števni plošči
n₁ število petrijev-k-gojišč pri prvi razredčitvi vzorca živila
n₂ število petrijev-k-gojišč pri drugi razredčitvi vzorca živila
R prva razredčitev vzorca živila pri kateri smo prešteli kolonije

- V primeru tekočih gojišč uporabimo ustrezne tabele MPN in določimo najbolj verjetno število mikroorganizmov.

4. **Potrditev oziroma identifikacija:** Značilne kolonije preiskujemo z biokemijskimi in serološkimi testi in tako potrdimo rezultate izolacije oziroma identificiramo mikroorganizme.

SKUPNO ŠTEVILO ŽIVIH MIKROORGANIZMOV

Identifikacijske sheme niso klasifikacijske sheme. Identifikacijska shema za skupino mikroorganizmov je lahko narejena šele potem, ko je bila skupina mikroorganizmov klasificirana, kar pomeni, da je bila po določenih lastnostih različna od drugih skupin.

Na splošno velja, da so lastnosti organizmov izbrane za identifikacijske sheme, lahko določljive. Prav tako naj bi bilo teh lastnosti čim manj oziroma toliko kolikor je nujno potrebno za identifikacijo.

Skupno število živih mikroorganizmov

Skupno število živih oziroma za reprodukcijo sposobnih mikroorganizmov določimo s štejetem kolonij na ploščah (angl. plate count) ali v primerih, ko pričakujemo nizko število mikroorganizmov, z metodo najverjetnejšega števila mikroorganizmov (angl. MPN, most probable number). Pri preiskavah živil sta izbira ustreznega gojišča in izbira razmer za inkubacijo težavni, saj živila vsebujejo raznovrstne mikroorganizme (Harrigan, 1998).

V živilu so lahko mikroorganizmi, ki so strogi anaerobi, lahko so mikroorganizmi, ki so fakultativni anaerobi; nekateri lahko rastejo pri 37° C in ne pri 20° C, spet drugi rastejo pri 20° C in ne pri 37° C. Tudi če bi živilo preiskali pri štirih razmerah inkubacije aerobno pri 20° C in 37° C, anaerobno pri 20° C in 37° C, bi bilo nemogoče določiti skupno število živih mikroorganizmov, ker ne vemo, kakšen delež mikrobne populacije je sposoben rasti in se razmnoževati pri dveh ali več razmerah inkubacije.

Do podobnega problema pridemo pri izbiri gojišča. Šetje kolonij na ploščah in MPN sta metodi s katerima ocenimo število mikroorganizmov kot delež mikrobne populacije, ki se lahko razmnožuje pri danih razmerah inkubacije. Rast kolonij ali motnost tekočega gojišča pomeni razmnoževanje mikroorganizmov v razmerah inkubacije in ne v razmerah, ki so značilne za živilo. To je posebej pomembno pri procesiranih živilih, ki vsebujejo poškodovane ali inhibirane mikroorganizme. Če bi v živilu določili veliko število mikroorganizmov z direktnim štejetem celic pod mikroskopom in majhno število mikroorganizmov s štejetem kolonij na ploščah, to še ne bi pomenilo, da je večina mikroskopsko določenih mikroorganizmov mrtvih, ampak, da so mikroorganizmi le nesposobni rasti v danih razmerah inkubacije.

Na splošno velja, da čimbolj je sestava gojišča zapletena, več različnih mikroorganizmov bo rastlo na/v gojišču. Tako na primer na ploščah s gojiščem PC (angl. plate count agar), ki vsebuje glukozo, zraste več kolonij, kot na ploščah s gojiščem NA (angl. nutrient agar, slo. hraniljivi agar).

Določitev števila živih mikroorganizmov pri temperaturah inkubacije 25 - 30° C je lahko indikator higiene živilskega obrata ali pri temperaturah inkubacije 30 - 37° C indikator potencialnega zdravstvenega tveganja.

Število aerobnih mezofilnih mikroorganizmov

Število bakterij, kvasovk in plesni v živilu moramo zato določiti po predpisanem postopku. Po ISO 4833 (1991) določimo mikroorganizme v živilu tako, da v dve sterilni petrijevki odpipetiramo po 1 ml tekočega živila ali po 1 ml matične raztopine živila. Nato naredimo 10-kratne razredčitve. Iz vsake razredčitve odpipetiramo dvakrat po 1 ml v sterile petrijevke. V petrijevke dodamo po 15 ml gojišča PC (angl. plate count agar), ki smo ga predhodno stopili in

ohladili na 45 °C, ter inokulum previdno umešamo. Ko se gojišče strdi, petrijevke obrnemo in jih 72 ur inkubiramo pri 30 °C.

Izračun števila mikroorganizmov:

- Plošče, na katerih je zraslo od 15 do 300 kolonij:

Preštejemo število kolonij na ploščah, na katerih je zraslo od 15 do 300 kolonij. Upoštevamo dve zaporedni razredčitvi živila. Število mikroorganizmov v 1 g ali 1 ml živila (N) izračunamo po naslednji enačbi:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 * n_2) * R}$$

N število mikroorganizmov v 1 ml ali v 1 g živila, ki ga podamo kot število med 1,0 in 9,9 x 10^x

ΣC vsota kolonij, ki so zrasle na vseh ploščah

n₁ število plošč pri prvi razredčitvi živila

n₂ število plošč pri drugi razredčitvi živila

R prva razredčitev

- Plošče, na katerih je zraslo manj kot 15 kolonij:

Če je na obeh ploščah v kateri smo cepili tekoče živilo ali matično raztopino živila, zraslo manj kot 15 kolonij, izračunamo aritmetično sredino kolonij in število mikroorganizmov v 1 g ali 1 ml živila (N_E) ocenimo po naslednji enačbi:

$$N_E = m * R^{-1}$$

m aritmetična sredina števila kolonij

R razredčitev

- Na ploščah ni kolonij:

Če na ploščah v katere smo cepili tekoče živilo ali matično raztopino živila, ne zraste nobena kolonija, podamo rezultat kot:

- manj kot 1 mikroorganizem v 1 ml živila, če smo cepili tekoče živilo direktno 1ml vzorca živila in
- manj kot 10 mikroorganizmov v 1 ml ali 1 g živila, če smo cepili matično raztopino živila.

Število kvasovk in plesni

Število kvasovk in plesni v živilu določimo po standardu ISO 7954 (1987) tako, da v dve sterilni petrijevki odpipetiramo po 1 ml tekočega živila ali po 1 ml matične raztopine živila. Nato naredimo 10-kratne razredčitve. Iz vsake razredčitve odpipetiramo dvakrat po 1 ml v sterilne petrijevke. V petrijevke dodamo po 15 ml gojišča YEDC (angl. yeast extract-dextrose-chloramphenicol-agar), ki smo ga predhodno stopili in ohladili na 45 °C, ter inokulum previdno umešamo. Ko se gojišče strdi, petrijevke obrnemo in jih 5 dni inkubiramo pri 25 °C. Kolonije štejemo po treh, štirih in petih dneh inkubacije. Upoštevamo plošče, na katerih je zraslo manj kot 150 kolonij in izračunamo število kvasovk in plesni, enako kot pri določitvi števila mikroorganizmov v živilu. Namesto YECD se uporablja tudi druga gojišča, kot so OGY (angl. oxytetracycline glucose yeast extract agar), DRBC (dichloran rose bengal chloramphenicol agar) (Downes in Ito, 2001). Če glede na morfološke lastnosti kolonije ne moremo določiti ali so kolonije gliv ali kolonije bakterij, naredimo iz preiskovane kolonije mikroskopski preparat in glede na mikromorfološke lastnosti določimo vrsto mikroorganizma.

DOLOČANJE IN ŠTETJE INDIKATORSKIH BAKTERIJ

AEROBNE SPOROGENE BAKTERIJE

SPLOŠNO

Za živila, ki so bila termično obdelana (pasterizacija), lahko naknadno kontaminacijo ugotovimo z deležem aerobnih sporogenih bakterij – bakterije rodu *Bacillus* – glede na skupno število bakterij oz. mikroorganizmov v živilu. Če ni naknadne kontaminacije živila, mora biti skupno število bakterij oz. mikroorganizmov in število aerobnih sporogenih bakterij enako (v okviru eksperimentalne napake).

V prvo skupino sodijo tista živila, ki glede na lastnosti ne omogočajo vzklitja bakterijskim sporam, kot so na primer sušena živila, živila z nizko a_w in toplotno obdelana živila, ki so takoj po toplotni obdelavi zmrznjena. Pri teh živilih pomeni enako število bakterij in sporogenih bakterij v živilu, da je bila toplotna obdelava ustrezna oz. da ni prišlo do naknadne kontaminacije.

V drugo skupino sodijo živila, ki glede na lastnosti, omogočajo vzklitje bakterijskih spor, na primer pasterizirano mleko – le to mora biti pregledano tako po polnjenju in ohladitvi, sicer spore lahko prej vzklijejo.

IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA

Pripravimo matično raztopino ($R = 10^{-1}$) in 10x-ne razredčitve živila. V prazne sterilne petrijevke cepimo (po 1 ml) razredčitev. V petrijevke dodamo po 15 ml gojišča PC (angl. plate count agar), ki smo ga predhodno stopili in ohladili na 45 °C, ter inokulum previdno umešamo. Ko se gojišče strdi, petrijevke obrnemo in jih 2 dni inkubiramo pri 30 °C. Preštejemo kolonije in izračunamo število aerobnih bakterij v živilu.

Vzporedno z določitvijo aerobnih bakterij določimo število aerobnih sporogenih bakterij tako, da 2x po 10 ml matične raztopine prenesemo v sterilni epruveti in ju v vodni kopeli pri temperaturi 81 °C segrevamo. V eno epruveto dodamo termometer in segrevamo toliko časa, da je temperatura v epruveti 80 °C, nato segrevamo še 1 minuto. Epruveto z matično raztopino v kateri ni bilo termometra nato ohladimo pod tekočo vodo. Pripravimo 10x-ne razredčitve in v prazne sterilne petrijevke (po 1 ml) cepimo razredčitve. V petrijevke dodamo po 15 ml gojišča PC (angl. plate count agar), ki smo ga predhodno stopili in ohladili na 45 °C, ter inokulum previdno umešamo. Ko se gojišče strdi, petrijevke obrnemo in jih 2 dni inkubiramo pri 30 °C. Preštejemo kolonije in izračunamo število aerobnih sporogenih bakterij v živilu (Harrigan, 1998).

Število aerobnih sporogenih bakterij v 1 g / 1 ml živila lahko določimo tudi tako, da 50 ml živila zatehtamo v 450 ml fiziološke raztopine in vzorec homogeniziramo 2 min z gnetilnikom. Tri steklenice z gojiščem TGE (angl. tripton glucose extract agar) ali PC (po 100 ml v 500 ml steklenici) stopimo in ohladimo na 45 °C v vodni kopeli. V prvo steklenico dodamo 10 ml, v drugo 1 ml in v tretjo 0,1 ml matične raztopine in premešamo. Vzorce damo takoj v vodno kopel na 80 °C za 30 minut. Nato steklenice z vzorci ohladimo na 45 °C in vsak vzorec razlijemo v pet sterilnih petrijevk. Inkubacija 35 °C, 48 ur. Preštejemo vse kolonije. Število sporogenih bakterij (cfu/g) iz prve steklenice je enako številu zraslih kolonij na vseh petih ploščah cepljenih iz prve steklenice. Število sporogenih bakterij (cfu/g) iz druge steklenice je enako številu zraslih kolonij na vseh petih ploščah cepljenih iz prve steklenice in pomnoženo z 10, število sporogenih bakterij (cfu/g) iz tretje steklenice je enako številu zraslih kolonij na vseh petih ploščah cepljenih iz tretje steklenice in pomnoženo s 100. Tako lahko določimo od 1 do 150.000 cfu/g (Downes in Ito, 2001).

ANAEROBNE SPOROGENE BAKTERIJE

SPLOŠNO

Mezofilne anaerobne sporogene bakterije sodijo v rod *Clostridium*. Mezofilne anaerobne sporogene bakterije, ki so lahko v živilih, so grampozitivne, katalaza negativne palčke različnih velikosti z subterminalnimi do centralnimi sporami. Čeprav se smatra, da so klostridiji striktni anaerobi, lahko nekateri sevi rastejo tudi v prisotnosti kisika (Downes in Ito, 2001).

Anaerobne bakterije so zelo razširjene v naravi, predvsem v zemlji in so zato pogost kontaminant sveže zelenjave, začimb. Nekatero vrste anaerobov so tudi normalno prisotne v prebavnem traktu in izločkih živali in so zato lahko kontaminanti mleka in mesa. Nekateri anaerobi so značilni tudi za ribe, školjke in vodno okolje.

Ker so mnoge mezofilne anaerobne sporogene bakterije zelo odporne proti toploti, ker lahko rastejo v atmosferi brez kisika v širokem temperaturnem območju v katerem se shranjujejo živila v pločevinkah, ker lahko rastejo v drugih živilskih izdelkih (na primer v razsoljenem mesu, v kuhanih živilih, v živilih shranjenih v hladilniku, v živilih, ki so pakirana v modificirani atmosferi ali v vakuumu), so predstavniki teh bakterij lahko pomembni kvarljivci živil saj so lahko proteoliti ali saharoliti.

IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA

Če anaerobne mezofilne sporogene bakterije kvantificiramo, pripravimo matično raztopino ($R = 10^{-1}$), ki jo segrevamo v primeru, da iščemo proteolite 10-13 minut pri 80 °C, v primeru, da določamo bolj občutljive spore 15-30 minut pri 60 °C in v primeru, da iščemo toplotno bolj in toplotno manj odporne spore segrevamo MR 10 minut pri 71 °C. Nato pripravimo 10x-ne razredčitve živila. Kot metodo kvantifikacije se uporablja metoda MPN, štetje kolonij na ploščah ali štetje kolonij v epruvetah s poltrdnim gojiščem.

Za določitev števila anaerobnih mezofilnih sporogenih bakterij z metodo štetja kolonij na ploščah cepimo v prazne sterilne petrijevke po 1 ml razredčitev. V petrijevke dodamo po 15 ml gojišča TPGY (angl. tripticase peptone glucose yeast extract agar), AC (angl. acetate differential agar) ali TP (tripticase peptone agar), ki smo ga predhodno stopili in hitro ohladili na 45 °C, ter inokulum previdno umešamo. Ko se gojišče strdi, ga prelijemo s tanko plastjo tioglikolatnega agarja in plošče inkubiramo v anaerobnem loncu 2 – 5 dni pri 30 °C do 35 °C. Preštejemo kolonije in izračunamo število anaerobnih mezofilnih sporogenih bakterij v živilu (Downes in Ito, 2001). Slabe strani te metode so velike razlike med paralelkami, lahko se tvorijo mehurčki plina, ki poškodujejo trdno gojišče in s tem onemogočajo natančno štetje kolonij. Interpretacija rezultatov mora biti pazljiva, saj poleg klostridijev lahko zrastejo tudi nekateri sevi fakultativno anaerobnih sporogenih bakterij.

Enterobacteriaceae, KOLIFORMNE BAKTERIJE, BAKTERIJE VRSTE *Escherichia coli*

SPLOŠNO

Surova živila ali živila, ki vsebujejo termično neobdelane dodatke živil, pogosto vsebujejo koliformne bakterije in tudi bakterije vrste *Escherichia coli*. V živilu se te bakterije v določenih razmerah lahko tudi razmnožujejo in zato ni nujna povezava med njihovim številom in začetnim nivojem kontaminacije. Prisotnost bakterij vrste *Escherichia coli* in drugih enterobakterij v živilu je lahko indikator za prisotnost črevesnih bakterij, medtem ko odsotnost enterobakterij še ne pomeni, da živilo ne vsebuje črevesnih patogenih bakterij. Na primer surovo mleko, meso ali jajca lahko vsebujejo bakterije rodu *Salmonella*, medtem ko ne vsebujejo bakterij vrste *Escherichia coli*.

Bakterije vrste *Escherichia coli* so v splošnem tudi manj odporne na dejavnike okolja kot bakterije rodu *Salmonella*. Tako lahko v tistih primerih, ko so bakterije vrste *Escherichia coli* fekalnega izvora, dobimo pravo sliko o fekalni kontaminaciji živila le, če živilo pregledamo takoj po kontaminaciji. Ker seveda vzorčenje in mikrobiološke preiskave živil niso izvedene takoj po kontaminaciji živila, ker je rast odvisna od lastnosti živila in razmer njegovega skladiščenja, imamo naslednje možnosti:

- Bakterije vrste *Escherichia coli* lahko odmrejo v živilu. Zato je nepravilno predpostavljati, če ni *Escherichia coli*, da tudi ni drugih patogenih enterobakterij.
- Bakterije vrste *Escherichia coli* ostanejo v relativno nespremenjeni koncentraciji v živilu. Tudi v tem primeru ni pravilno predpostaviti, da se enako vedejo druge patogene enterobakterije.
- Bakterije vrste *Escherichia coli* rastejo v živilu in njihova koncentracija se povečuje. V tem primeru pa moramo upoštevati, da so razmere v živilu, ki so ugodne za bakterije *Escherichia coli*, najverjetneje ugodne tudi za druge enterobakterije in druge bakterije.

Čeprav velika koncentracija bakterij vrste *Escherichia coli* v živilu ni nujno, da pomeni nedavno ali močno fekalno kontaminacijo, je treba tak podatek vzeti kot indikator, ki nakazuje možno tveganje glede na enterobakterije (Downes in Ito, 2001).

Glede na različno odpornost bakterij vrste *Escherichia coli* in na primer bakterij rodu *Salmonella* so predlagali, da bi bilo skupno število bakterij Enterobacteriaceae boljši indikator slabih higienskih razmer (Downes in Ito, 2001).

Definicije (Harrigan, 1998):

1. Enterobacteriaceae: so družina bakterij (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*), ki rastejo v prisotnosti žolčnih soli in tvorijo kislino iz glukoze (gojišče VRB z 1% dodatkom glukoze).
2. Bakterije coli-aerogens: Bakterije, ki rastejo v prisotnosti žolčnih soli ali drugih ekvivalentnih selektivnih dodatkov, in tvorijo kislino in plin iz laktoze pri inkubaciji na 30 °C.
3. Koliformne bakterije: Bakterije, ki rastejo v prisotnosti žolčnih soli ali drugih ekvivalentnih selektivnih dodatkov, in tvorijo kislino in plin iz laktoze pri inkubaciji na 35 °C ali 37 °C.
4. Fekalne koliformne bakterije: Bakterije, ki rastejo v prisotnosti žolčnih soli ali drugih ekvivalentnih selektivnih dodatkov, in tvorijo kislino in plin iz laktoze pri inkubaciji na 44-45,5 °C.
5. Bakterije vrste *Escherichia coli*: So tiste bakterije, ki poleg zgoraj navedenih lastnosti, dajo pozitiven rezultat na metil rdeče, negativen rezultat na Voges-Proskauer in ne izkoriščajo citrata kot edinega vira ogljika. Indol pozitivne *Escherichia coli* se označijo kot *Escherichia coli* tip 1, za katere se predpostavlja, da izvirajo iz črevesa kot naravnega okolja.

Prisotnost katerekoli od omenjenih skupin bakterij v toplotno obdelanem živilu je indikator ene ali več spodnjih trditev:

- Začetna koncentracija bakterij je bila tako visoka, da jih toplotna obdelava ni uničila oz. da se njihovo število ni zmanjšalo pod mejo občutljivosti metode
- Razmere po toplotni obdelavi živila so bile ugodne za razvoj preživelih bakterij
- Naknadna kontaminacija toplotno obdelanega živila

Bakterije vrste *Escherichia coli* spadajo v družino Enterobacteriaceae. So gramnegativne, fakultativno anaerobne palčke. Glukozo in druge ogljikove hidrate običajno razgrajujejo do kisline in plina, dobro rastejo v prisotnosti žolčnih soli. Optimalna temperatura za rast je 37 °C (običajno med 35 in 40 °C), nekateri patogeni sevi lahko rastejo tudi pod 7 °C in nad 46 °C. Ti sevi prežive v hrani, hranjeni pri temperaturah hladilnika (3 -7 °C), prav tako tudi v hrani, zamrznjeni na -20 °C. Običajno rastejo pri vrednosti pH med 4.4 (odvisno od vrste prisotne kisline) in 9.

Prisotne so v prebavnem traktu ljudi in toplokrvnih živali, pa tudi v zemlji, vodi in drugje. Bakterije vrste *E. coli* predstavljajo približno 1% črevesne mikroflore človeka. Njihova prisotnost v živilih nakazuje možnost, da je živilo kontaminirano s fekalijami. S tem kaže na možno prisotnost ostalih patogenih mikroorganizmov ter na nizek higienski nivo proizvodnje živil. Seve *E. coli*, ki so lahko prisotni v živilih in izzovejo obolenja, delimo v pet skupin:

- enteropatogeni (EPEC): običajno ne sintetizirajo enterotoksinov, lahko pa povzročajo diarejo;
- enterotoksigeni (ETEC): sintetizirajo toplotno labilna enterotoksina, ki vsebujeta substanci A in B (LTA in LTB) in toplotno stabilna enterotoksina (ST-I in ST-II);
- enteroinvazivni (EIEC): ne sintetizirajo enterotoksinov, patogeneza je podobna kot pri šigelozii;
- enterohemoragični (EHEC) (predstavniki so *E. coli* O157:H7): sintetizirajo dva toksina (SLT-I in SLT-II);
- fakultativno enteropatogeni (EPEC).

IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA

SKUPNO ŠTEVILO BAKTERIJ Enterobacteriaceae

Skupno število Enterobacteriaceae se določi pri vzorcih, pri katerih pričakujemo nizko kontaminacijo živila, po naslednjem postopku (ISO 8523, 1991):

- neselektivna obogatitev: 1g živila ali 1ml MR cepimo v 9 ml tekočega gojišča BPW (puferirana peptonska voda), inkubacija 16 – 20 ur pri 35 °C ali 37 °C
- selektivna obogatitev: 1 ml predobogatitvene suspenzije precepimo v 10 ml tekočega gojišča EEB (Enterobacteriaceae obogatitveno gojišče, ki vsebuje žolč), inkubacija 18 – 24 ur pri 35 °C ali 37 °C
- izolacijo s cepilno zanko na VRBG (vijolično rdeči žolčni agar z glukozo), inkubacija 24 ur pri 35 °C ali 37 °C
- Značilne kolonije so temno rdeče barve z temno rdečim sijem. Pet naključno izbranih kolonij precepimo na NA (hranljivi agar), inkubiramo 24 ur, 35 °C ali 37 °C. V primeru, da ni značilnih kolonij precepimo 5 beige kolonij po enakem postopku.
- S kolonijami na neselektivnem gojišču naredimo potrditev:

- Oksidazni test: Enterobacteriaceae so oksidaza negativne (!! Ne uporabljajte nikelj – kromove zanke ampak platina-iridij!)
- Fermentacija glukoze: Enterobacteriaceae fermentirajo glukozo

Skupno število Enterobacteriaceae se določi pri vzorcih, pri katerih pričakujemo 10 – 100 ali več cfu/g živila tako, da se pripravi decimalne razredčitve vzorca in se jih cepi (po 1 ml) v prazno petrijevko in vmeša s (15 ml) stopljenim, na 45 °C ohlajenim gojiščem VRBG. Ko se gojišče strdi, se prelije s (5 ml) stopljenim, na 45 °C ohlajenim gojiščem VRBG, da se prepreči rast kolonij na površini. Gojišča se inkubira na 35 °C oz. 37 °C. V nekaterih primerih se inkubira tudi pri 30 °C. Potrditev se izvede enako kot je opisano zgoraj.

SKUPNO ŠTEVILO BAKTERIJ Enterobacteriaceae, ŠTEVILO KOLIFORMNIH BAKTERIJ, ŠTEVILO FEKALNIH KOLIFORMNIH BAKTERIJ IN ŠTEVILO BAKTERIJ VRSTE *Escherichia coli*, DOLOČENO Z METODO MPN

Skupno število Enterobacteriaceae:

Po standardu ISO 21528-1 (2004) za določitev skupnega števila Enterobacteriaceae pripravimo decimalne razredčitve vzorca živila in aseptično cepimo:

- 3x po 10 ml nerazredčenega vzorca, če je tekočina ali 3x 10ml MR, če je vzorec trden v 10 ml gojišča BBGBG dvojne koncentracije (puferiran briljantno zeleni glukozni bujon z žolčem),
- 3x 1ml nerazredčenega vzorca, če je tekočina ali 3x 1ml MR, če je vzorec trden v 10 ml gojišča BBGBG enojne koncentracije,
- 3x 1ml razredčenega vzorca 10^{-1} , če je tekočina ali 3x 1ml 10^{-2} , če je vzorec trden v 10 ml gojišča BBGBG enojne koncentracije.

Teh 9 epruvet inkubiramo 24 ur pri 35 °C ali 37 °C. Če so v gojiščih dodane Durhamove cevke in če po inkubaciji dodamo indikator, lahko določimo glede na tvorbo plina in kisline domnevno pozitivne rezultate. Iz vsake pozitivne epruvete naredimo potrditev tako, da precepimo 3 cepilne zanke suspenzije na trdno gojišče VRBGA, ki jih inkubiramo 24 ur pri 35 °C ali 37 °C. Značilne kolonije so temno rdeče barve z temno rdečim sijem. Pet naključno izbranih kolonij precepimo na NA (hranljivi agar), inkubacija 24 ur, 35 °C ali 37 °C. V primeru, da ni značilnih kolonij precepimo 5 beige kolonij po enakem postopku. S kolonijami na neselektivnem gojišču naredimo potrditev:

- Oksidazni test: Enterobacteriaceae so oksidaza negativne,
- Fermentacija glukoze: Enterobacteriaceae fermentirajo glukozo.

Izračun MPN Enterobacteriaceae (najbolj verjetnega števila bakterij Enterobacteriaceae):

- Preštejemo pozitivne reakcije pri vsaki razredčitvi
- Iz tabele MPN določimo indeks MPN, glede na število pozitivnih rezultatov v vsakem gojišču
- V primeru, da je bil vzorec tekoče živilo, dobimo število bakterij tako, da indeks MPN delimo z 10, v primeru, da je bil vzorec trden, pa je indeks MPN enak številu bakterij v 1 g živila.

Skupno število koliformnih bakterij:

Po standardu ISO 4831 (1991) za določitev skupnega števila koliformnih bakterij pripravimo decimalne razredčitve vzorca živila in aseptično cepimo:

- 3x po 10 ml nerazredčenega vzorca, če je tekočina ali 3x 10 ml MR, če je vzorec trden v 10 ml gojišča LSTB dvojne koncentracije (lauril sulfat triptozni bujon),

- 3x 1ml nerazredčenega vzorca, če je tekočina ali 3x 1ml MR, če je vzorec trden v 10 ml gojišča LSB enojne koncentracije,
- 3x 1ml razredčenega vzorca 10^{-1} , če je tekočina ali 3x 1ml 10^{-2} , če je vzorec trden v 10 ml gojišča LSB enojne koncentracije.

Teh 9 epruvet inkubiramo 24 ur pri 35 °C ali 37 °C. Pozitivna reakcija je plin v Durhamovi cevki. Če plina po 24 urah ni, podaljšamo inkubacijo še za 24 ur. Iz epruvet s pozitivnim rezultatom nato naredimo potrditev tako, da precepimo eno cepilno zanko v BZLŽB (briljantno zeleni laktozni bujon z žolčem), ki ga inkubiramo 24 do 48 ur pri 30 °C ali 35 °C. Pozitivna reakcija je plin v Durhamovi cevki in rumena barva gojišča.

Izračun MPN koliformnih bakterij:

- Preštejemo pozitivne reakcije v gojiščih LSTB pri vsaki razredčitvi
- Iz tabele MPN določimo indeks MPN, glede na število pozitivnih rezultatov v vsakem gojišču
- V primeru, da je bil vzorec tekoče živilo dobimo število bakterij tako, da indeks MPN delimo z 10, v primeru, da je bil vzorec trden, pa je indeks MPN enak številu bakterij v 1 g živila.

Število fekalnih koliformnih bakterij:

Postopek je enak kot za določitev skupnega števila koliformnih bakterij, le da gojišče BZLŽB inkubiramo na temperaturi 44 °C.

Število bakterij vrste *Escherichia coli*:

Po standardu ISO 7251 (1993) za določitev števila bakterij *Escherichia coli* pripravimo decimalne razredčitve vzorca živila in aseptično cepimo:

- 3x po 10 ml nerazredčenega vzorca, če je tekočina ali 3x 10 ml MR, če je vzorec trden v 10 ml gojišča LSB dvojne koncentracije (lauril sulfatni bujon),
- 3x 1ml nerazredčenega vzorca, če je tekočina ali 3x 1ml MR, če je vzorec trden v 10 ml gojišča LSB enojne koncentracije,
- 3x 1ml razredčenega vzorca 10^{-1} , če je tekočina ali 3x 1ml 10^{-2} , če je vzorec trden v 10 ml gojišča LSB enojne koncentracije.

Teh 9 epruvet inkubiramo 24 ur pri 37 °C. Pozitivna reakcija je plin v Durhamovi cevki. Če plina po 24 urah ni podaljšamo inkubacijo še za 24 ur. Iz epruvet s pozitivnim rezultatom in iz tistih gojišč v katerih opazimo motnost nato naredimo potrditev tako, da precepimo eno cepilno zanko v bujon EC, ki ga inkubiramo 24 do 48 ur pri 44 °C. Pozitivna reakcija je plin v Durhamovi cevki. Iz vsake epruvete s pozitivnim rezultatom precepimo eno cepilno zanko v peptonsko vodo, ki vsebuje triptofan. Inkubacija 48 ur pri 44 °C. Po inkubaciji dodamo Kovacsev reagent in rdeča barva pomeni tvorbo indola, ki je značilna za bakterije vrste *Escherichia coli*.

Izračun MPN *Escherichia coli*:

- Preštejemo pozitivne reakcije v gojiščih LSB pri vsaki razredčitvi
- Iz tabele MPN določimo indeks MPN, glede na število pozitivnih rezultatov v vsakem gojišču
- V primeru, da je bil vzorec tekoče živilo, dobimo število bakterij tako, da indeks MPN delimo z 10, v primeru, da je bil vzorec trden, pa je indeks MPN enak številu bakterij v 1 g živila.

ŠTEVILO KOLIFORMNIH BAKTERIJ, DOLOČENO Z METODO ŠTETJA KOLONIJ

Skupno število koliformnih bakterij se določi pri vzorcih pri katerih pričakujemo 10 – 100 ali več cfu/g živila tako, da se pripravi decimalne razredčitve vzorca in se jih cepi (po 1 ml) v prazno

petrijevko in vmeša s (15 ml) stopljenim, na 45 °C ohlajenim gojiščem VRBL (vijolično redeči žolčni agar z laktozo) (ISO 21528-2, 2004). Ko se gojišče strdi se prelije s (5 ml) stopljenim, na 45 °C ohlajenim gojiščem VRBL, da se prepreči rast kolonij na površini. Gojišča se inkubira na 35 °C oz. 37 °C. V nekaterih primerih se inkubira tudi pri 30 °C. Značilne kolonije za koliformne bakterije so velike 0,5 mm ali več, so temno rdeče barve in imajo cono precipitiranih žolčnih soli. Za določitev števila koliformnih bakterij se upošteva tista gojišča VRBL kjer zraste do 150 kolonij.

ŠTEVILO BAKTERIJ VRSTE *Escherichia coli*, DOLOČENO Z METODO ŠTETJA KOLONIJ NA TRDEMM GOJIŠČU

Število bakterij vrste *Escherichia coli* se določi pri vzorcih, pri katerih pričakujemo 10 – 100 ali več cfu/g živila tako, da se pripravi decimalne razredčitve vzorca in se jih cepi (po 1 ml) v prazno petrijevko in vmeša s (15 ml) stopljenim, na 45 °C ohlajenim gojiščem VRBL, ki je selektivno gojišče za izolacijo koliformnih bakterij, ki temelji na njihovi sposobnosti fermentacije laktoze. Žolčne soli in kristal violet inhibirajo rast grampozitivnih bakterij. Indikatorja spremembe pH vrednosti sta kristal violet in nevtralnno rdeče. Inkubacija 24 – 48 ur pri 44 °C. Bakterije vrste *E. coli* tvorijo temno rdeče kolonije s škrlatno rdečim centrom - zaradi obarjanja žolčnih soli pri nizki pH vrednosti, 2 - 3 mm v premeru. Rastejo tudi druge koliformne bakterije (na primer *Enterobacter aerogenes* tvorijo temno rdeče kolonije). *Proteus mirabilis* tvori brezbarvne kolonije.

Vzorec oz. decimalne razredčitve lahko cepimo tudi na selektivno gojišče EMB (Eosin methylene blue lactose agar). Sestavine medija omogočajo ločevanje rodov *Escherichia* in *Enterobacter* (fermentirata laktozo in saharozo) od drugih enterobakterij. Inkubacija 24 – 48 ur pri 44 °C. Bakterije vrste *E. coli* tvorijo vijoličaste kolonije s temnejšim centrom in zelenkastim kovinskim sijajem. Pri fermentaciji vrednost pH zaradi nastalih kislin zelo pade, pri nizki pH vrednosti pride do nastanka amidne vezi med eozinom in metilenskim modrilom, kar se odraža v kovinskem sijaju kolonij. *Enterobacter aerogenes*: rdeče kolonije s temnim centrom, okoli prozorna cona. Pri razgradnji sladkorjev se tvori malo kislin, razgradnja teče do acetoina, ni tako velikega padca vrednosti pH. *Salmonella* in *Shigella* tvorijo brezbarvne ali roza kolonije (ne fermentirajo laktoze in saharoze).

Bakterije vrste *Escherichia coli* potrdimo oziroma identificiramo s testom IMViC in mikroskopskim preparatom po Gramu. Značilne kolonije iz selektivnega gojišča precepimo najprej na neselektivno gojišče NA in po 24 urni inkubaciji na 37 °C v ustrezna gojišča za test IMViC.

TEST IMViC:

Test IMViC vsebuje 4 teste:

1. Test na indol: Značilno kolonijo iz selektivnega gojišča cepimo v peptonsko vodo, ki vsebuje triptofan - aminokislina z indolovim obročem. Po 24-urni inkubaciji pri 37 °C, dokažemo sproščeni indol z Kovacsevimi reagentom. V primeru pozitivne reakcije, ki je značilna za *E. coli* se izloči živo rdeč indolov obroč.

Princip: Triptofan se pod vplivom triptofanaz, ki jih sintetizirajo določene bakterije, in vode hidrolitsko cepi, nastane indol in serin. Indol reagira z aldehidno skupino p-metilaminobenzaldehida (sestavini Kovacsevega reagenta) in nastane rdeče obarvan kompleks.

2., 3. Test na metil rdeče (MR) in Voges Proskauer (VP): V tekočem gojišču z glukozo ugotavljamo način pretvorbe glukoze in sicer do kisline (MR) oz. do acetilmetilkarbinola (acetoina) (VP). Po 24 – 48-urni inkubaciji pri 37 °C prelijemo polovico vsebine prve epruvete v drugo epruveto. V prvo epruveto dodamo indikator metil rdeče. V primeru tvorbe kisline se vsebina obarva rdeče (*E. coli*), sicer ostane barva oranžna (*Enterobacter aerogenes*).

Princip testa metil rdeče: Razgradnja glukoze poteka preko piruvata do kislin (mlečna, očetna, ...). pH vrednost močno pade, pod 4,4 in barva dodanega indikatorja metil rdeče preide v rdečo. Pri pH vrednosti 6,0 je indikator rumene barve. Če se tvori manjša količina kislin, se pH vrednost zniža, vendar ne pade pod 4,4. Oranžna barva pomeni negativen rezultat.

V drugi epruveti dokazujemo prisotnost acetilmetilkarbinola (acetoina) z 5% raztopino α -naftola v etanolu (5 g v 100ml 96 % etanola) in 40 % vodna raztopina KOH s kristalčki kreatinina. Dobro premešamo in če po 15-ih minutah nastane rdeča barva (*Enterobacter aerogenes*), je rezultat pozitiven. Če so v vzorcu bakterije vrste *E. coli*, rdeča barva ne nastane.

Princip testa Voges-Proskauer: Razgradnja glukoze poteka preko piruvata do acetilmetilkarbinola (acetoin) ob majhni tvorbi kislin. Acetoin se ob dodatku KOH in pod vplivom kisika iz zraka, pretvori v diacetil. Ta tvori rdeč kompleks ob prisotnosti α -naftola.

4. Izkoriščanje citrata kot edinega vira ogljika (test po Simmons): Bakterije, ki so sposobne izkoriščati Na-citrat kot edini vir ogljika, lahko izkoriščajo tudi dušik iz amonijevega fosfata (edini vir dušika). Posledica je sprememba pH vrednosti v alkalno (indikator je bromtimol modro). Kot pozitiven rezultat se šteje rast in sprememba barve gojišča v modro (alkalna reakcija).

Na poševno gojišče s citratom nacepimo kulturo s cepilno zanko. Po inkubaciji 24 ur pri 37 °C se v primeru rasti mikroorganizma barva gojišča spremeni iz zelene v modro zeleno. Bakterije vrste *E. coli* ne rastejo, *Enterobacter aerogenes* rastejo.

Mikroskopiranje:

Mikroskopski preparat po Gramu.

DOLOČITEV BAKTERIJ VRSTE *Escherichia coli* PO OBOGATITVI

Briljantno zeleni laktoza žolčni bujon (BZLŽB) je selektivno gojišče za izolacijo koliformnih bakterij, ki temelji na njihovi sposobnosti fermentacije laktoze. Žolčne soli in briljantno zeleno inhibirajo rast grampozitivnih bakterij. Določen volumen ali maso živila v kateri iščemo bakterije vrste *Escherichia coli* zatehtamo v 9x-en volumen BZLŽB. Inkubacija 24 - 48 ur pri 44 °C. Sprememba barve gojišča iz zelene v rumeno in plin v Durhamovi cevki kaže na možno prisotnost bakterij vrste *E. coli*.

Obogatitveno suspenzijo po inkubaciji dobro premešamo in suspenzijo s cepilno zanko precepimo na gojišče VRBL. Inkubacija 24 - 48 ur pri 44 °C. Postopek nadaljujemo enako kot je opisano pri metodi štetja bakterij vrste *Escherichia coli* na gojiščih.

DOLOČANJE IN KVANTIFIKACIJA PATOGENIH IN TOKSIGENIH BAKTERIJ

BAKTERIJE RODU *Salmonella*

SPLOŠNO

Salmonele spadajo v družino *Enterobacteriaceae*, so gramnegativne, fakultativno anaerobne, nesporogene palčke z respiratornim in fermentativnim tipom metabolizma. Glukozo razgrajujejo do kisline in plina, ne fermentirajo laktoze, fermentirajo jo le nekateri serotipi. Vsi serotipi salmonel spadajo v dve vrsti: *Salmonella bongori* (manj kot 10 serotipov in so zelo redki) in *Salmonella choleraesuis* (nad 2500 serotipov). Razdelitev v serotipe temelji na Kauffmann - Whitejevi shemi: O antigeni (somatski), H antigeni (flagelarni) in K antigeni (kapsularni).

Epidemiološko jih delimo v tri skupine:

- inficirajo le človeka: *S. Typhi*, *S. Paratyphi A* in *S. Paratyphi C*; tifus in paratifus sta najresnejši obolenji, ki ju povzročajo salmonele z najvišjo stopnjo umrljivosti.
- serotipi prilagojeni gostitelju: *S. Gallinarum* - perutnina, *S. Dublin* - govedo, *S. Abortus-equi* - konji, *S. Abortus-ovis* - ovce, *S. Coleraesuis* - prašiči; človek se lahko okuži s hrano, nekateri serotipi so patogeni za ljudi in živali.
- neprilagojeni serotipi: V to skupino spada večina serotipov prisotnih v živilih in so patogeni za ljudi in živali.

Primarni izvor salmonel je prebavni trakt ljudi in mnogih živali (domače živali, plazilci, ptice, občasno insekti). Včasih so prisotne tudi v drugih delih telesa. Organizem jih izloča preko blata, od tu pa lahko preko različnih prenašalcev pridejo v vodo in živila. Pogost vir salmonel je živalska krma (kostna in ribja moka).

Prisotnost v živilih: kakav, kokosova moka (dehidrirana živila), solatni preliv, jajca, majoneza, meso (zlasti perutnina) in izdelki, mleko (neprekuhan - *S. Dublin*; kaže na slabo higieno molže),... Najpogosteje prisoten serotip v živilih je *S. Typhimurium*, v določenem obdobju je bil tudi *S. Enteritidis*.

Razmere za rast:

Optimalna vrednost pH za rast je med 6,6 in 8,2, pod vrednostjo pH 4,0 in nad 9,0 ne rastejo. Minimalna vrednost pH za rast je odvisna od vrste kisline, ki jo uporabimo za zniževanje pH. Aeracija pozitivno vpliva na rast pri nizki vrednosti pH. Optimalna temperatura za rast je 37 °C, pod približno 7 °C in nad 45 °C se ne razmnožujejo. NaCl in nitrat zavirata rast, tako deluje razsolica z 9% NaCl baktericidno, nitrat ima največji inhibični učinek ob nizki vrednosti pH.

IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ RODU *Salmonella*

OBOGATITEV

Za določanje bakterij rodu *Salmonella* po standardu ISO 6579 (2002) se uporablja dve obogatitvi, najprej neselektivno v gojišču BPW (puferirana peptonska voda), nato pa selektivno v dveh obogatitvenih gojiščih bujon RVS (bujon Rappaport-Vassiliadis s sojo) in bujon MKTTn (Muller Kaufmann tetrationski bujon z novobiocinom). Po starejšem standardu ISO 6579 (1993) sta se uporabljali selektivni tekoči gojišči SC (selenit cistin) in RV (Rappaport- Vassiliadis).

Določeno maso živila v kateri iščemo salmonеле (25 g oziroma 50 g ali ml) zatehtamo v 9x-no količino neselektivnega obogatitvenega gojišča BPW (225 ml oziroma 450 ml), homogeniziramo in inkubiramo 18 ur pri 37 °C. Po inkubaciji suspenzijo homogeniziramo in:

- 0,1 ml suspenzije prenesemo v selektivno obogatitveno gojišče RVS (10 ml) ter inkubiramo 24 ur pri 41,5 °C
- 1 ml prenesemo v drugo selektivno obogatitveno gojišče MKTTn (10 ml) ter inkubiramo 24 ur pri 37 °C.

IZOLACIJA

Po inkubaciji obogatitveno gojišče dobro premešamo in suspenzijo s cepilno zanko precepimo (izolacija) na selektivna gojišča:

- po standardu ISO 6579 (1993) so to BZA (briljantno zeleni agar), SS (Salmonella-Shigella agar) in BS (bizmut sulfidni agar)
- po standardu ISO 6579 (2002) sta to XLD (ksiloza lizin deoksiholatni agar) in drugo gojišče po izbiri.

Plošče s cepljenimi gojišči inkubiramo 24 ur pri 37 °C.

Gojišče SS:

V gojišču SS imajo inhibitorni učinek na grampozitivne bakterije in nekatere nepatogene enterobakterije natrijev citrat, žolčne kisline in briljantno zeleno. Gojišče vsebuje laktozo, indikator spremembe pH vrednosti je nevtralnno rdeče. Salmonele in druge bakterije, ki ne izkoriščajo laktoze, tvorijo motne, prozorne, brezbarvne kolonije. Izolacija salmonel temelji tudi na njihovi sposobnosti tvorbe H₂S. Izvor žvepla v gojišču je Na-tiosulfat. Indikator tvorbe H₂S je železov citrat.

Značilna rast kolonij na SS:

Salmonella: prozorne, sluzaste z temnim črnim centrom ali brez njega, podobne kolonije tvorijo tudi nekatere vrste rodu *Proteus*; črn center kolonij nastane zaradi nastanka železovega sulfida;
Shigella: prozorne ali rahlo rožnate, lahko nepravilnih oblik;
Enterobakterije, ki fermentirajo laktozo: rožnate.

Gojišče BS:

Izolacija salmonel temelji na njihovi sposobnosti tvorbe H₂S. Izvor žvepla so beljakovinske komponente, indikator tvorbe H₂S pa je železov sulfat. Rast bakterij vrste *E. coli* in nekaterih drugih koliformnih bakterij je inhibirana zaradi dodanega bizmutovega sulfita, amonijevega citrata in briljantno zelenega.

Značilna rast kolonij na BS:

Salmonella: črne, s kovinskim sijajem, pojavlja se cona črno obarvanega agarja;
Proteus: rjave do rjavočrne;
E. coli: inhibirana.

Gojišče BZA:

Izolacija bakterij temelji na sposobnosti fermentacije laktoze, saharoze, razgradnji beljakovin. Indikatorja spremembe pH sta briljantno zeleno in fenol rdeče. Briljantno zeleno inhibira rast nepatogenih enterobakterij in vrst rodu *Shigella*.

Značilna rast kolonij na BZA:

Salmonella in nekatere druge vrste, ki ne fermentirajo laktoze: rdeče vijolične, podobno se obarva tudi gojišče okoli kolonij (*S. Typhi* in *S. Paratyphi* ne rastejo);
Proteus: rožnate, sluzaste, 2 - 3 mm v premeru, gojišče okoli kolonij se obarva rdeče zaradi bazične reakcije; sproščanje amonijevih spojin, ki nastanejo pri razgradnji beljakovin;
E. coli: rumene do rumeno zelene, podobno se obarva tudi gojišče okoli kolonij zaradi fermentacije laktoze pade pH vrednost; briljantno zeleno prehaja v rumeno barvo.

Gojišče XLD:

Izolacija bakterij temelji na sposobnosti fermentacije laktoze, saharoze in ksiloze, na razgradnji beljakovin oz. amino kisline lizin. Indikator spremembe pH je fenol rdeče, izvor žvepla v gojišču je Na-tiosulfat, indikator tvorbe H₂S je železov citrat.

Značilna rast kolonij na XLD:

Salmonella: ker ne izkoriščajo laktoze in saharoze ne tvorijo kislin, dekarboksilirajo pa lizin, kar povzroči alkalno reakcijo in indikator fenol rdeče se obarva rdeče: kolonije so zato temno rdeče in v primeru, da tvorijo H₂S, imajo črn center.

Shigella: temno rdeče kolonije

Proteus: nekateri sevi tvorijo tudi rdeče kolonije ali rdeče kolonije s črnim centrom

POTRDITEV

Kolonije, značilne za salmonele (do 5 značilnih kolonij), precepimo iz selektivnih gojišč na neselektivno gojišče NA in plošče inkubiramo 24 ur pri 37 °C. Nato naredimo biokemijsko (trojni sladkor, hidroliza uree, dekarboksilacija lizina, β-galaktozidazna reakcija, reakcija VP, tvorba indola) in serološko potrditev (Aglutinacijskemu serumu za salmonele primešamo kulturo s cepilno zanko, opazimo pozitivno reakcijo - kosmičenje v predhodno bistri tekočini zaradi vezave specifičnih protiteles z antigeni salmonel) (ISO 6579, 2002).

Za skrajšano biokemijsko identifikacijo naredimo naslednje teste:

- Kliglerjev dvojni sladkor: cepimo vbod in po površini trdnega poševnega gojišča
- Urea: cepimo po površini poševnega gojišča
- KCN: cepimo eno cepilno zanko v tekoče gojišče in dobro premešamo
- Fenilalanin: cepimo eno cepilno zanko po površini trdnega poševnega gojišča
- IMViC (opis je pri bakterijah vrste *E. coli*)

Teste inkubiramo 24 ur pri 37°C in nato odčitamo rezultate.

Kliglerjev dvojni sladkor:

To je selektivno gojišče, ki omogoča identifikacijo vrst družine *Enterobacteriaceae* na osnovi izkoriščanja glukoze (v gojišču je 0,1%) in laktoze (v gojišču je 1%), tvorbe plina in tvorbe vodikovega sulfida. Na-tiosulfat je izvor žvepla, Fe-sulfat pa indikator tvorbe H₂S.

Značilna rast in reakcije po 24 do 48 urah pri 37 °C:

S. typhi: rumeno dno, rdeča poševna ploskev, ni tvorbe plina;

Salmonella: rumeno dno, rdeča poševna ploskev, zaradi tvorbe H₂S gojišče počrni, tvorba plina;

Shigela spp.: rumeno dno, rdeča poševna ploskev, ni plina oz. H₂S;

Proteus: rumeno dno, rdeča poševna ploskev, tvorba plina (gojišče razpoka), nekatere vrste tvorijo H₂S.

Rezultati drugih testov značilnih za bakterije rodu *Salmonella*:

- urea: -
- KCN -
- fenilalanin -
- IMViC - + - +

Mikroskopiranje:

Iz neselektivnega gojišča NA vzporedno z biokemijskimi testi naredimo mikroskopski preparat po Gramu.

BAKTERIJE RODU *Proteus*

SPLOŠNO

Bakterije rodu *Proteus* spadajo v družino *Enterobacteriaceae*, so gramnegativne, fakultativno anaerobne, katalaza pozitivne palčke. Optimalna temperatura za rast je 37 °C. Bakterije rodu *Proteus* so prisotne v prebavnem traktu ljudi in toplotokrvnih živali, v prsti, vodi, na rastlinah. Prisotnost v živilih: meso in mesni izdelki, zelenjava, jajca, neprekuhan mleko (odprta, že pripravljena živila, hranjena pri sobni temperaturi). Sintetizirajo proteolitične encime in dekarboksilirajo histidin v histamin.

IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ RODU *Proteus*

OBOGATITEV

Če določamo vrste rodu *Proteus* v večji količini vzorca, moramo to količino, zatehtati v 9x-ni volumen neselektivnega obogatitvenega gojišča hranljivi bujon, suspenzijo homogeniziramo in nato inkubiramo 24 ur pri 37 °C.

IZOLACIJA

Če določamo bakterije rodu *Proteus* po obogatitvi, naredimo izolacijo na selektivna gojišča. Če določamo bakterije rodu *Proteus* v manjših količinah vzorca živila, pripravimo matično raztopino in ustrezne razredčitve. Na selektivna gojišča cepimo po 0,1 ml MR ali ustreznih razredčitev.

Uporablja se naslednja selektivna gojišča BZA; SS, BS in XLD. Plošče inkubiramo 24 ur pri 37 °C.

POTRDITEV

Kolonije, značilne za bakterije rodu *Proteus*, precepimo iz selektivnih gojišč na neselektivno gojišče NA in plošče inkubiramo 24 ur pri 37 °C. Nato naredimo biokemijsko potrditev z naslednjimi testi:

- Kliglerjev dvojni sladkor: cepimo vbod in po površini trdnega poševnega gojišča
- Urea: cepimo po površini poševnega gojišča
- KCN: cepimo eno cepilno zanko v tekoče gojišče in dobro premešamo
- Fenilalanin: cepimo eno cepilno zanko po površini trdnega poševnega gojišča
- IMViC (opis je pri bakterijah vrste *E. coli*)

Teste inkubiramo 24 ur pri 37 °C in nato odčitamo rezultate

- Kliglerjev dvojni sladkor: rumeno dno, rdeča poševna ploskev, nekatere vrste tvorijo H₂S (črne pike ali črno obarvanje gojišča), zaradi tvorbe plina gojišče razpoka;
- urea: +;
- KCN: +;
- fenilalanin: +;
- test IMViC: različno glede na vrsto v rodu *Proteus*.

Mikroskopiranje:

Iz neselektivnega gojišča NA vzporedno z biokemijskimi testi naredimo mikroskopski preparat po Gramu.

BAKTERIJE VRSTE *Listeria monocytogenes*

SPLOŠNO

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so po Gramu pozitivne, nesporogene palčke, dolge 1 - 2 µm in široke 0,5 µm, včasih se pojavljajo kot koki ali diplokokki. Po 3 do 5 dneh inkubacije se razvijejo dolge palčke velikosti 6 - 20 µm, ki se pogosto po Gramu obarvajo negativno. Bakterije vrste *L. monocytogenes* rastejo v širokem temperaturnem območju od 3 °C do 45 °C, optimum je med 30 °C in 37 °C. Razmnožujejo se v aerobnih in mikroaerofilnih razmerah pri vrednostih pH vse do 9,6. Rast bakterij je ustavljena ali močno inhibirana v anaerobnih razmerah in pri pH manjših od 5,6.

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so v naravi zelo razširjene. Izolirali so jih iz različnih virov, na primer: iz razpadajoče vegetacije, zemlje, živalskega blata, odpadne vode, krme v silosih, vode. Približno 5 - 10 % ljudi ima bakterije *L. monocytogenes* v prebavnem traktu. Posledica ubikvitarne narave bakterij vrste *L. monocytogenes* je njihova pogosta prisotnost v človekovi prehranjevalni verigi. Izmed vseh nesporogenih bakterij so najbolj odporne proti različnim vplivom okolja. Prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* v mnogih živilih je predvsem posledica navzkrižne kontaminacije končnih izdelkov. Ker bakterije lahko rastejo pri nizkih temperaturah hlajenja in so relativno odporne proti višjim koncentracijam soli, so živila ugodno okolje za njihov razvoj. Najbolj pogosto se bakterije vrste *L. monocytogenes* nahajajo v naslednjih živilih: mleko, mehki siri, sladoled, predpripravljena in ohlajena živila, surovo meso, predpripravljena perutnina, pašteta, surova zelenjava, solate, ribe, ribji izdelki, sendviči in riž.

V rodu *Listeria* so za človeka in/ali živali patogene tri vrste, *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* in *L. seeligeri*. Primeri okužbe z bakterijami vrste *L. seeligeri* so bili zelo redki tako pri živalih kot pri ljudeh. Prav tako so bili redki primeri okužbe ljudi z bakterijami vrste *L. ivanovii*. Večino listerioz pri ljudeh povzročijo bakterije vrste *L. monocytogenes*. Na splošno velja, da so bakterije vrste *L. ivanovii* manj patogene kot bakterije *L. monocytogenes*.

Glavni vir listerij je hrana, kontaminirana z bakterijami vrste *L. monocytogenes*. Podatki o posameznih primerih in množičnih izbruhih listerioze so pokazali, da je bila incidenca listerioze zelo nizka, kljub dejstvu, da so se bakterije *L. monocytogenes* pogosto pojavljale v različnih živilih. Ne glede na dejstvo, da je humana listerioza redka bolezen, pa je smrtnost zelo visoka, med 20 in 50 %. Pri ljudeh je listerioza oportunistična okužba. Bolezen se najbolj pogosto pojavi pri tistih ljudeh, ki so že zboleli za neko drugo bolezenijo, pri ljudeh starejših od 65 let, pri nosečnicah, pri še nerojenih otrocih ali pri dojenčkih. Zelo nevarna je za bolnike z levkemijo ali drugimi malignimi tvorbami, za tiste, ki se zdravijo s kortikosteroidi ali s sevanjem, za ljudi z aidsom, za alkoholike, za ljudi s sladkorno boleznijo in za ljudi s protetičnimi srčnimi zaklopkami. Klinična znamenja listerioze so zelo različna. Glede na prevladujoče klinične simptome razlikujejo pri listeriozi devet različnih oblik.

IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ VRSTE *L. monocytogenes*

OBOGATITEV

Primarna obogatitev

Bakterije iz rodu *Listeria* so v živilih lahko v nizkem številu ob tem, da je skupno število bakterij zelo veliko. Zato je potrebna selektivna obogatitev. Ker je pomembno, da določimo tudi prisotne poškodovane celice *L. monocytogenes*, uporabimo primarno selektivno obogatitev v gojišču s

polovično koncentracijo selektivnih sestavin - **gojišče Half Fraser** (ISO 11290-1, 1996). Gojišče vsebuje polovični koncentraciji akriflavina in nalidiksinske kisline.

Količino živila, v kateri iščemo bakterije vrste *L. monocytogenes*, zatehtamo v 9x-ni volumen obogatitvenega gojišča Half Fraser in suspenzijo homogeniziramo. Obogativeno gojišče inkubiramo 24 ur pri 30 °C.

Sekundarna obogatitev

Desetino ml primarnega obogatitvenega gojišča cepljenega z živilom po inkubaciji prenesemo v 10 ml selektivnega tekočega obogatitvenega gojišča **Fraser**, ki ima celotno koncentracijo selektivnih sestavin. Inkubiramo 48 ur pri 35 °C ali 37 °C.

IZOLACIJA

Uporabimo dve selektivni gojišči, agar Oxford in agar PALCAM, na kateri cepimo suspenzijo iz primarne in sekundarne obogatitve s cepilno zanko. Inkubacija plošč Oxford pri 30 °C se uporabi takrat, ko živilo ni močno kontaminirano z drugimi bakterijami, sicer pa pri 35 °C ali 37 °C 24 - 48 ur. Plošče PALCAM inkubiramo mikroaerofilno ali aerobno 35 °C ali 37 °C 24 -48 ur.

Po spremembi standarda ISO (ISO 11290-1, 1996/DAM 1:2004) se kot izolacijski gojišči uporabljata gojišče ALOA in drugo gojišče po izbiri.

Kolonije značilne za rod *Listeria*:

Trdno gojišče Oxford: Po 24 urah so kolonije listerij majhne s premerom 1 mm, sive barve s črno cono, po 48 urah postanejo temnejše, lahko imajo zelen sijaj, večji premer do 2 mm, imajo črno cono in so na sredini vdrtne.

Trdno gojišče PALCAM: Če so bile plošče inkubirane mikroaerofilno, jih moramo pred odčitavanjem za 1 uro izpostaviti zraku. Po 24 urni inkubaciji so kolonije listerij majhne (premer 1,5 do 2 mm) sivo zelene ali olivno zelene barve s črno cono, včasih imajo črn center. Po 48 urah so zelene kolonije s črno cono.

Trdno gojišče ALOA: kolonije listerij so majhne (premer do 2 mm), tirkizno modre barve, bakterije vrst *L. monocytogenes* in *L. ivanovi* imajo okrog kolonije prosojno cono.

POTRDITEV

Potrditev rodu *Listeria*:

Za potrditev vzamemo iz vsake plošče s selektivnim gojiščem po 5 značilnih kolonij, jih precepimo na neselektivno gojišče TSAYE (angl. triptic soy agar with yeast extract), inkubiramo 24 ur pri 37 °C. Po 18 do 24 urni inkubaciji pri 35 °C ali 37 °C so za *Listeria* spp. značilne brezbarvne, konveksne, 1 do 2 mm velike kolonije. Na teh kolonijah naredimo teste:

- Katalaza: Eno kolonijo zmešamo na objektnem stekelcu v kapljico vodikovega peroksida. Če se takoj pojavijo mehurčki, je reakcija pozitivna.
- Barvanje mikroskopskega preparata po Gramu: So Gram pozitivne, tanke palčke.
- Gibljivost: Kolonijo iz plošče TSYEA precepimo v tekoče gojišče TSYEB. Inkubirano 8 do 24 ur, dokler gojišče ni motno, pri 25 °C. Gibljivost opazujemo na mikroskopskem preparatu. Kot alternativo se lahko uporablja gojišče za opazovanje gibljivosti v katerega cepimo tipično

kolonijo iz plošče TSYEA s cepilno iglo. Po 48 urni inkubaciji pri 25 °C opazujemo rast okoli vboda.

Potrditev bakterij vrste *L. monocytogenes*

- Hemoliza: Kolonijo iz plošče TSYEA precepimo na gojišče krvni agar z ovčjo krvjo. Za negativno kontrolo uporabimo bakterije vrste *L. innocua*. Po 24 urni inkubaciji pri 35 °C ali 37 °C ima *L. monocytogenes* okoli kolonij prozorno cono, ki pomeni β -hemolizo.
- Izkoriščanje ramnoze in ksiloze: S cepilno zanko cepimo motno gojišče TSYEB z listerijami v tekoči gojiščici, ki vsebujeta ramnozo in ksilozo. Inkubiramo pri 35 °C ali 37 °C do 5 dni. *L. monocytogenes* raste v gojiščici z ramnozo, v gojiščici s ksilozo pa ne.
- Test CAMP: Na krvni agar v dveh ravnih vzporednih črtah cepimo bakterije *Staphylococcus aureus* in *Rhodococcus equi*, vmes pravokotno cepimo suspenzijo iz gojišča TSYEB. Po 18 do 24 urni inkubaciji pri 35 °C ali 37 °C je povečana cona hemolize na pri *Staphylococcus aureus*, pri *Rhodococcus equi* pa ne, če je preiskovana kultura *L. monocytogenes*.

Dokončna potrditev bakterij vrste *L. monocytogenes*

Bakterije, ki jih določimo kot *L. monocytogenes*, pošljemo v referenčni laboratorij na serološko in lizogeno tipizacijo.

KOAGULAZA POZITIVNI STAFILOKOKI

SPLOŠNO

Stafilokoki so grampozitivni, nesporogeni koki, pojavljajo se posamezno, v parih, v obliki grozdov. So fakultativno anaerobni, običajno katalaza pozitivni mikroorganizmi. Predstavniki tega rodu sintetizirajo številne enterotoksine, ki povzročajo gastroenteritis. Poleg enterotoksinov lahko sintetizirajo še koagulazo, DNazo (termostabilno, termolabilno), katalazo, lecitinazo, hemolizine.

Pri človeku so primarni izvor stafilokokov nosna votlina, gnojne rane, vneto grlo, lahko so na koži, v očeh, prebavnem traktu. Od tod prehajajo v zrak, prah, na obleko in druga mesta, od koder lahko preidejo v živila. Stafilokoki so možni povzročitelji mastitisa, zato je takšno mleko vir okužbe. V živilih živalskega izvora in tudi v drugih toplotno neobdelanih živilih so pogosto prisotni vsaj v nizkem številu. Najpogosteje prisotna vrsta v živilih je vrsta *S. aureus*. Večina sevov lahko sintetizira koagulazo, termostabilno DN-azo, enterotoksine, hemolizine. Optimalna temperatura za rast bakterij vrste *S. aureus* je med 30 in 37 °C (35 in 40 °C), vendar se lahko razmnožujejo v temperaturnem območju med 7 °C in 48 °C, enterotoksine pa sintetizirajo med 10 °C in 46 °C (optimalna temperatura za sintezo je med 40 °C in 45 °C). Bakterije vrste *S. aureus* dobro rastejo tudi ob prisotnosti NaCl (med 7 in 10 %, nekateri sevi tudi pri 20 %). Maksimalna koncentracija soli, pri kateri bakterije vrste *S. aureus* še rastejo, je odvisna od pH, a_w , temperature in E_h . Optimalna vrednost pH za rast je med 6 in 7. Minimalna vrednost a_w je 0,86, ob ostalih idealnih razmerah je še nekoliko nižja.

Sinteza enterotoksinov: Enterotoksini so kemijsko enostavni proteini. Toplotno so bolj stabilni kot celice bakterij vrste *S. aureus*. Do največje sinteze enterotoksinov pride običajno pri optimalnih razmerah za rast, lahko pa so razmere takšne, da celice enterotoksinov sploh ne sintetizirajo. Velikost populacije, pri kateri se tvori tolikšna količina enterotoksinov, ki povzročata gastroenteritis (1 ng / g živila), je običajno nad 10^5 celic *S. aureus* /g živila. Stafilokokni toksin je lahko toplotno obstojen in tudi po 30 min segrevanju na 100°C ne izgubi svoje aktivnosti. Zato odsotnost bakterij vrste *Staphylococcus aureus* še ne pomeni, da v živilu ni toksina.

V živilih določamo bakterije vrste *Staphylococcus aureus*, ker:

- lahko potrdimo, da so bile te bakterije vzrok za okužbo z živilom
- lahko določimo, če je bilo živilo ali sestavina živila potencialni vir enterotoksigenih stafilokokov
- poiščemo naknadno kontaminacijo živila, ki je običajno posledica človekovega rokovanja z živilom po na primer toplotni obdelavi ali pa posledica neustreznih higienskih razmer v okolju, kjer so hranjena živila. Ta naknadna kontaminacija je še posebej nevarna, ker živilo po toplotni obdelavi ne vsebuje več (ali vsaj veliko manj) kompetitivnih mikroorganizmov in tako imajo stafilokoki veliko boljše razmere za rast v živilu.

Živila, ki so najpogosteje povezana z zastrupitvami s stafilokoknimi toksini, so meso (govedina, svinjina, perutnina) in mesni izdelki (klobase, salame hrenovke), solate (ki vsebujejo meso, perutnino, krompir), s kremami polnjeni slaščičarski izdelki in mlečni izdelki (siri). Ker so stafilokoki pogosto normalno prisotni na surovih živilih (predvsem živila živalskega izvora), je toliko bolj pomembno ločevanje in dosledno ločevanje dela in poti surovih in že obdelanih živil (Downes in Ito, 2001).

IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA KOAGULAZA POZITIVNIH STAFILOKOKOV

OBOGATITEV

Če določamo bakterije vrste *Staphylococcus aureus* v večji količini vzorca ali če iščemo te bakterije v živilih kjer so prisotni v zelo nizki koncentraciji (ponavadi so to živila po toplotni ali drugi obdelavi) uporabimo manj selektivno obogatitev živila v slanem bujonu (TSB z 20% NaCl), ki nudi stafilokokom okrepitev. Če določamo bakterije vrste *Staphylococcus aureus* v surovih živilih ali v še neobdelanih živilih v katerih pričakujemo veliko koncentracijo drugih mikroorganizmov uporabimo selektivno obogatitev živila v bujonu Giolitti & Cantoni (Downes in Ito, 2001; Harrigan, 1998). Določeno količino vzorca zatehtamo v 9x-ni volumen obogatitvenega bujona, homogeniziramo in suspenzijo inkubiramo 24 ur pri 35 °C ali 37 °C.

IZOLACIJA

Če določamo bakterije vrste *Staphylococcus aureus* po obogatitvi, naredimo izolacijo na selektivno gojišče. Če določamo bakterije vrste *Staphylococcus aureus* v manjših količinah vzorca živila, pripravimo matično raztopino in ustrezne razredčitve. Na selektivne gojišče cepimo po 0,1 ml MR ali ustreznih razredčitev. Po standardu SIST EN ISO 6888-2 (1999) se za izolacijo koagulaza pozitivnih stafilokokov uporablja gojišče Baird – Parker, ki ga po izolaciji inkubiramo 24 – 48 ur pri 35 °C ali 37 °C.

Gojišče Baird - Parker agar (BP):

Je selektivno gojišče za izolacijo koagulaza pozitivnih stafilokokov iz hrane. Vsebuje K-telurit, glicin in litijev klorid, ki inhibirajo rast drugih bakterij, piruvat pa spodbuja rast stafilokokov, in 20% jajčnega rumenjaka.

Značilna rast kolonij

S. aureus: Okrogle, črne (zaradi redukcije telurita), gladke, svetleče, konveksne kolonije 2-3 mm v premeru (kadar je na gojišču malo kolonij), običajno z ozkim belim (motnim) robom, gojišče okoli kolonij je prozorno. Zaradi delovanja različnih encimov na lipoproteine jajčnega rumenjaka, pride do nastanka različno topnih produktov - motne, prozorne cone okoli kolonij.

S. epidermidis: tvori črne kolonije (se ne svetijo), gojišče okoli kolonij je le redko prozorno. Nekateri vrste streptokokov, korinebakterij in mikrokokov prav tako tvorijo črne kolonije, vendar brez nastanka prozornih con okoli kolonij.

POTRDITEV

Kolonije značilne za stafilokoke potrdimo z naslednjimi testi:

Značilne kolonije precepimo v neselektivno tekoče gojišče BHI (angl. brain heart infusion broth), homogeniziramo in inkubiramo 24 ur pri 37 °C.

Koagulacija krvne plazme:

V sterilno epruveto odpipetiramo 0,3 ml krvne plazme (običajno plazma kuncev), dodamo 0,1 ml namnožene kulture iz BHI, premešamo in inkubiramo pri 37 °C. Koagulacijo krvne plazme opazujemo po 4, 6 in 24 urah. Koagulaza katalizira pretvorbo fibrinogena v fibrin in reakcija je pozitivna takrat, ko je več kot $\frac{3}{4}$ začetnega volumna v epruveti kot strdek. Tako določimo koagulaza pozitivne stafilokoke.

Krvni agar (KA): Značilno kolonijo iz BP cepimo na KA, inkubiramo 24 ur pri 37 °C. Bakterije vrste *Staphylococcus aureus* tvorijo rumeno bele kolonije z izrazito β -hemolizo.

Mikroskopiranje:

Iz neselektivnega gojišča NA vzporedno z potrditvenimi testi naredimo mikroskopski preparat po Gramu.

BAKTERIJE VRSTE *Bacillus cereus*

SPLOŠNO

So grampozitivne, sporogene, aerobne ali fakultativno anaerobne palčke. Običajno so prisotne v zemlji, vodi, prahu, na rastlinah. Minimalna temperatura za rast je okoli 5 °C, maksimalna pa okoli 50 °C. Sintetizirajo lecitinazo, proteolitične encime, toplotno labilen in toplotno stabilen enterotoksin. Toplotno labilen enterotoksin (inaktivacija po 30 min pri 56 °C) sintetizirajo celice med eksponencialno fazo rasti. Emetični enterotoksin je toplotno stabilen, celice ga sintetizirajo med stacionarno fazo rasti. Prisotnost bakterij vrste *B. cereus* v nižjih koncentracijah v mnogih živilih je normalna, ker so te bakterije normalno prisotne v okolju. Pogosto so te bakterije v živilih kot so: riž, krompir, testenine, mesne, zelenjavne jedi, mleko, pudingi, juhe. Nevarnost predstavljajo omenjena živila, okužena z bakterijami vrste *B. cereus*, ki so puščena dalj časa na sobni temperaturi. Do zastrupitve z živilo pride navadno takrat, ko se koncentracija bakterij vrste *Bacillus cereus* povišča na 10^7 cfu/g.

IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ VRSTE *Bacillus cereus*

IZOLACIJA

Za kvantitativno določitev bakterij *Bacillus cereus* pripravimo matično raztopino in ustrezne razredčitve. Na selektivno gojišče cepimo v paralelkah po 0,1 ml MR ali ustreznih razredčitev. Po standardu ISO 7932 (2004) se za izolacijo uporablja gojišče *Bacillus cereus*, ki ga inkubiramo 18 – 24 ur pri 30 °C.

Gojišče *Bacillus cereus* agar (BC):

Bojišče BC vsebuje manitol, polimiksin B, indikator fenol rdeče ali bromtimol modro in jajčni rumenjaki. Polimiksin B inhibira rast drugih bakterij, bromtimol modro je indikator izkoriščanja manitola, z jajčnim rumenjaki pa se določa lecitinazna aktivnost.

Značilne kolonije za bakterije vrste *B. cereus*:

Velike kolonije s premerom okoli 5 mm in nazobčanim robom, modro zelene barve, ker ne fermentirajo manitola (alkalna reakcija), kolonije so obdane z izrazito motno cono gojišča, ki je enake barve kot kolonije, kar kaže na precipitacijo hidroliziranega lecitina in nastanek netopnega diacilglicerola.

POTRDIČEV

Kolonije značilne za bakterije vrst *Bacillus cereus* potrdimo z naslednjimi testi: Cepimo tekoče gojišče MR-VP, tekoče gojišče za redukcijo nitrata in krvni agar za ugotavljanje hemolize. Gojišča inkubiramo 24 ur pri 30 °C.

Test MR – tvorba kislin(e) iz glukoze:

Gojišče MR-VP dobro premešamo in polovico prelijemo v novo epruveto. V prvi epruveti dokažemo z indikatorjem metil rdeče tvorbo kisline iz glukoze.

Test VP – tvorba acetoina iz glukoze:

V drugi epruveti iz gojišča MR-VP dokažemo tvorbo acetoina z dodatkom α -naftola, raztopine KOH in kristalčki kreatinina, dobro premešamo in v eni uri nastane eozin rdeča barva.

Redukcija nitrata:

V gojišče dodamo 0,2 do 0,5 ml nitritnega reagenta in v 15 min se gojišče zaradi nitrata obarva rdeče.

Krvni agar:

Za *Bacillus cereus* je značilno, da tvori velike sive kolonije z α -hemolizo.

Mikroskopiranje: Naredimo dva mikroskopska preparata, po Gramu in po Schaeffer-Fulton.

SULFITREDUCIRAJOČI KLOSTRIDIJI

SPLOŠNO

Sulfitreducirajoči klostridiji so grampozitivne, sporogene, anaerobne palčke. Celice se pojavljajo posamezno, v parih, kratkih verižicah. Spore so centralne ali pa subterminalne. Celice so sposobne reducirati Na-sulfit (izvor žvepla) do vodikovega sulfida. Ta se veže z železovimi ioni (sestavina gojišča) v železov sulfid, ki je črne barve (indikator prisotnosti sulfitreducirajočih klostridijev).

Bakterije vrste *Clostridium perfringens* so v naravi zelo razširjene. Prisotne so v prsti, vodi, prahu, prebavnem traktu ljudi in živali. So mezofilne bakterije, optimalna temperatura za rast je med 37 °C in 45 °C, minimalna okoli 20 °C in maksimalna okoli 50 °C. Rastejo v območju vrednosti pH med 5,0 in 8,5. Ob prisotnosti več kot 5% NaCl je rast inhibirana.

Na podlagi sinteze enterotoksinov jih delimo v pet skupin A, B, C, D in E. V živilih je običajno prisoten sev *C. perfringens*, ki sintetizira enterotoksin A, včasih tudi C. Enterotoksin, ki ga sintetizirajo sevi tipa A, je občutljiv na toploto (inaktivacija po 10 minutnem segrevanju pri 60 °C). Celice ga običajno sintetizirajo istočasno kot tvorijo spore. Bakterije vrste *C. perfringens* v živilih običajno ne tvorijo spor, ampak tvorijo spore potem ko pridejo v prebavni trakt. Zato se v živilih išče tako vegetativne oblike kot spore, saj se te bakterije lahko v živilu namnožijo do večjega števila in kasneje po užitju živila povzročijo okužbo ali zastrupitev.

Bakterije vrste *C. perfringens* so pogosto v mesu in mesnih izdelkih, perutnini, komercialno pripravljene zmrznjeni hrani, sadju in zelenjavi, začimbah, ribah, školjkah, dehidriranih juhah,... Nevarnost predstavljajo živila, ki so bila pripravljena dan ali več pred uživanjem. Kadar pride do zastrupitve, je v živilu več kot 100 – 1000 cfu/g bakterij vrste *C. perfringens*

IZOLACIJA IN IDENTIFIKACIJA BAKTERIJ VRSTE *Clostridium perfringens*

IZOLACIJA

Za kvantitativno določitev vegetativnih oblik in spor bakterij vrste *C. perfringens* pripravimo matično raztopino in ustrezne razredčitve. Na selektivno gojišče cepimo v paralelkah po 0,1 ml MR ali ustreznih razredčitev ali pa cepimo po 1 ml MR in ustrezne razredčitve v paralelkah v prazne petrijevke in umešamo s stopljenim na 47°C ohlajenim selektivnim gojiščem.

Kadar določamo le spore bakterij vrste *C. perfringens* matično raztopino segrevamo 20 min pri 75 °C (Downes in Ito, 2001), nato pripravimo razredčitve in jih cepimo kot pri določitvi vegetativnih oblik in spor.

Po standardu ISO 7937 (1997) se za izolacijo uporablja gojišče SICA (egg yolk free tryptose sulphite iron citrate cycloserine agar), na katerem po anaerobni inkubaciji po 24 urah pri 35 °C ali 37 °C zrastejo za *C. perfringens* značilne črne kolonije (zaradi redukcije sulfita in izločanja železovega sulfida). Ker je v gojišču cikloserin, je inhibirana rast enterokokov, ki so v nekaterih živilih prisotni v večjih koncentracijah, in lahko prerastejo kolonije klostridijev. Črne kolonije na SICA tvorijo tudi drugi sulfitreducirajoči klostridiji kot so *C. bifermentans*, *C. botulinum*, *C. paraperfringens*, *C. sardinese* in *C. sporogens*.

Poleg gojišča SICA se uporablja še veliko selektivnih, diferencialnih gojišč kot so neomicin krvni agar (NKA), sulfit polimiksin sulfadiazin agar (SPS), tripton-sulfit neomicin agar (TSN), železov sulfitni agar (ISA) in drugi (Downes in Ito, 2001). Selektivnost gojišč je dosežena z dodatkom

različnih antibiotikov, večina gojišč vsebuje tudi železo in sulfid, saj klostridiji reducirajo sulfid do sulfida in ta z železom tvori železov sulfid, ki da značilno črno barvo kolonijam klostridijev.

Rast kolonij na gojišču SPS po 24 urni anaerobni inkubaciji na 35 °C ali 37 °C:

C. perfringens črne kolonije

C. sporogens črne kolonije

Dobro rastejo tudi bakterije vrste *Streptococcus faecalis* in *Staphylococcus aureus*.

Rast kolonij v gojišču ISA po 3 do 5 dnevni anaerobni inkubaciji na 35 °C ali 37 °C:

Vsi sulfidreducirajoči klostridiji tvorijo črne kolonije, saj reducirajo Na-sulfid, pri čemer nastane vodikov sulfid, ta pa se veže z železovimi ioni (Fe-sulfid je črne barve). Anaerobne sporigene bakterije, ki ne reducirajo Na-sulfita, tvorijo bele kolonije.

POTRDITEV

Do 5 značilnih kolonij prenesemo s cepilno zanko v tekoče tioglikolatno gojišče, homogeniziramo in inkubiramo v vodni kopeli 4 ure na 44 °C ali 12-18 ur na 35 °C ali 37 °C.

Po inkubaciji:

- Naredimo barvni preparat po Gramu in mikroskopiramo (za *C. perfringens* so značilne velike grampozitivne palčke), barvni preparat za spore ne delamo, ker endospor klostridiji v tem gojišču ne tvorijo.
- S cepilno iglo cepimo v poltrdno gojišče za določanje gibljivosti in redukcijo nitrata, inkubiramo 24 ur pri 35 °C ali 37 °C. Bakterije vrste *C. perfringens* so negibljive in rastejo le ob vvodu, rdeča ali rdeče oranžna barva pa pomeni, da reducirajo nitrat do nitita.
- S cepilno zanko cepimo v gojišče z laktozo in želatino, inkubiramo pri 35 °C ali 37 °C 24 do 44 ur. Bakterije vrste *C. perfringens* izkoriščajo laktozo (plin in kislina; barva se spremeni iz rdeče v rumeno) in utekočinijo želatino.
- Po 0,15 ml kulture iz tioglikolatnega gojišča precepimo v gojišči z rafinozo in salicinom, inkubiramo pri 35 °C ali 37 °C, 24 ur. Bakterije vrste *C. perfringens* ne fermentirajo salicina, iz rafinoze pa tvorijo kislino brez plina.

Direktno iz selektivnega gojišča lahko značilno kolonijo prenesemo tudi na dve gojišči krvnega agarja, ki ju inkubiramo 24 ur pri 35 °C ali 37 °C, eno ploščo aerobno in drugo anaerobno. Ugotovitev grampozitivnih palčk s sporami ali brez njih in hemoliza na KA, ki je bil inkubiran anaerobno, ter odsotnost rasti na KA, ki je bil inkubiran aerobno, velja kot domnevno pozitiven rezultat prisotnosti sulfidreducirajočih klostridijev.

MIKROBIOLOŠKA PREISKAVA PITNE VODE

SPLOŠNO

Pitna voda je po Pravilniku o pitni vodi (Uradni list RS 19/2004, 35/2004, 26/2006, 92/2006, 25/2009, 74/2015):

1. voda v njenem prvotnem stanju ali po pripravi, namenjena pitju, kuhanju, pripravi hrane ali za druge gospodinjske namene, ne glede na njeno poreklo in ne glede na to, ali se dobavlja iz vodovodnega omrežja sistema za oskrbo s pitno vodo, cistern ali kot predpakirana voda;
2. vsa voda, ki se uporablja za proizvodnjo in promet živil

Pitna voda je zdravstveno ustrezna, kadar:

1. ne vsebuje mikroorganizmov, parazitov in njihovih razvojnih oblik v številu, ki lahko predstavlja nevarnost za zdravje ljudi;
2. ne vsebuje snovi v koncentracijah, ki same ali skupaj z drugimi snovmi lahko predstavljajo nevarnost za zdravje ljudi;
3. je skladna z zahtevami za mikrobiološke in kemijske parametre, ki so določeni s tem pravilnikom.

Skladnost z mejnimi vrednostmi parametrov (v nadaljnjem besedilu: skladnost) je skladnost z zahtevami za mejne vrednosti parametrov iz priloge I, ki se po potrebi dopolni z dodatnimi parametri in njihovimi mejnimi vrednostmi.

MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE

Mikrobiološki parametri:

Splošne zahteve za pitno vodo:

Parameter	Mejna vrednost	Metoda
<i>Escherichia coli</i>	0 / 100 ml	SIST EN ISO 9308-1
Enterokoki	0 / 100 ml	SIST EN ISO 7899-2

Zahteve za vodo namenjeno za pakiranje:

Parameter	Mejna vrednost	Metoda
<i>Escherichia coli</i>	0 / 250 ml	SIST EN ISO 9308-1
Enterokoki	0 / 250 ml	SIST EN ISO 7899-2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 / 250 ml	
Število kolonij pri 37 °C	100 / ml	SIST EN ISO 6222
Skupno kolonij 22 °C	20 / ml	SIST EN ISO 6222

Indikatorski parametri

Parameter	Mejna vrednost	Metoda
Koliformne bakterije	0 / 100 ml	SIST EN ISO 9308-1
<i>Clostridium perfringens</i> (vključno s sporami) *	0 / 100 ml	mCP
Število kolonij pri 37 °C	100 / ml	SIST EN ISO 6222
Število kolonij 22 °C	Brez neobičajnih sprememb	SIST EN ISO 6222

Parametri rednega preskušanja:

Parameter	Mejna vrednost	Metoda
<i>Escherichia coli</i>	0 / 100 ml	SIST EN ISO 9308-1
Koliformne bakterije	0 / 100 ml	SIST EN ISO 9308-1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *	0 / 250 ml	SIST EN ISO 12780
<i>Clostridium perfringens</i> *	0 / 100 ml	mCP
Enterokoki	0 / 100 ml	SIST EN ISO 7899-2
Število kolonij pri 37 °C	Manj kot 100 / ml	SIST EN ISO 6222
Število kolonij 22 °C	Brez neobičajnih sprememb	SIST EN ISO 6222

* samo v primeru, da je voda namenjena pakiranju

**s sporami le v primeru, da je voda površinskega izvora ali le ta nanjo vpliva

Odvzem vzorca vode

Z gorilnikom ožgemo vodovodno pipo, pustimo, da voda teče 2 – 3 minute in nato v sterilno steklenico zajamemo 500 ml vode.

Priprava vzorca

Vzorec vode dobro pretresemo. Redčenje: glede na pričakovano kontaminacijo vzorca naredimo decimalne razredčine v fiziološki raztopini (ISO 8199).

Escherichia coli in koliformne bakterije (SIST EN ISO 9308-1)

1. Koliformne bakterije: so tiste bakterije, ki tvorijo kolonije aerobno pri 35 °C ali 37 °C na selektivnem ali diferencialnem laktoznem gojišču ob tvorbi kisline (in aldehida) v 24 urah.

- Filtracija 100 ml vode preko filtra (2r = 47 ali 50 mm) z velikostjo por 0,45 µm
- filter položimo na izbrano eno ali več izolacijskih gojišč: Lactose TCC agar with tergitol, lactoze agar with Tergitol 7,
- inkubacija aerobno pri 35 °C ali 37 °C
- odčitavanje domnevnih koliformnih kolonij
- Potrditev: vsako kolonijo (ali reprezentativno število) precepimo v laktozno peptonsko vodo (LAP) in 48 ur inkubiramo pri 37 °C, tvorba plina je potrditev za koliformne bakterije

2. Termotolerantne koliformne bakterije: so tiste koliformne bakterije, ki tvorijo kolonije aerobno pri 44 °C ali 44,5 °C na selektivnem ali diferencialnem laktoznem gojišču ob tvorbi kisline (in aldehida) v 24 urah.

Domnevne *Escherichia coli*: so termotolerantne koliformne bakterije, ki tvorijo plin iz laktoze (in manitola) in indol iz triptofana v 24 urah pri 44 °C.

- Filtracija 100 ml vode* preko filtra (2r = 47 ali 50 mm) z velikostjo por 0,45 µm
- filter položimo na izbrano eno ali več izolacijskih gojišč: Lactose TCC agar with tergitol
- inkubacija aerobno pri 44 °C
- odčitavanje domnevnih termotolerantnih koliformnih kolonij
- Potrditev termotolerantnih koliformnih bakterij in *E. coli* : vsako kolonijo (ali reprezentativno število) iz filtrov inkubiranih na 44 °C precepimo v laktozno peptonsko vodo in triptonsko vodo in inkubiramo pri 44 °C 24 ur, tvorba plina v laktozno peptonski

vodi je potrditev za termotolerantne koliformne bakterije, v triptonsko vodo dodamo 0,2 ml do 0,3 ml Kovačevega reagenta in tvorba rdeče barve na površini je dokaz indola za *E. coli*. Za *E. coli* se kadar je potrebno (vrste rodu *Aeromonas*) izvaja še oksidazni test (mora biti -).

Izračun:

$$C = \frac{(A \times N \times V_s \times F)}{(B \times V_t)}$$

C	potrjeno število kolonij v 100 ml
A	dejansko število potrjenih kolonij
B	število kolonij precepljenih za potrditev
N	število značilnih kolonij na filtru
V _t	testni volumen vode
V _s	referenčni volumen vode – 100 ml
F	faktor razredčitve

Enterokoki (SIST EN ISO 7899-2)

100 ml vode* prefiltriramo skozi sterilni membranski filter z velikostjo por 0,45 µm. Filter položimo na gojišče m-enterococcus selective agar acc. to Slanetz & Bartley in inkubiramo 48h pri 37 °C.

Preštejemo vse rožnate, rdeče ali rjavkaste kolonije, ki so svetleče in konveksne. Filter položimo na Aesculin agar (predhodno segret pri 44 °C) za 2h/44 °C in potem preštejemo potrjene kolonije - to pa so tiste, ki imajo črno cono.

Skupno število mikroorganizmov (SIST EN ISO 6222)

1 ml vode prelijemo s hranljivim agarjem (4x) ter inkubiramo dve gojišči 72 h pri 22 °C in dve gojišči 48h pri 37 °C.

Clostridium perfringens (mCP)

100 ml vode* prefiltriramo skozi sterilni membranski filter z velikostjo por 0,2 µm. Filter položimo na gojišče mCP in 21 h inkubiramo anaerobno pri 44 °C.

Plošče v digestoriju pregledamo na domnevne kolonije – rumene montne kolonije, ki potem, ko jih izpostavimo za 20 do 30 s hlapom 25 % amonijevega hidroksida (strup!) postanejo rožnate.

DELOVNI ZVEZEK

1. VAJA: Skupno število mikroorganizmov

NAMEN:

MATERIALI:

METODE:

Shema 1: Določanje skupnega števila mikroorganizmov ter števila kvasovk in plesni

REZULTATI:

Nativni preparat:

Vzorec: kolonija iz gojišča OGY

Povečava:

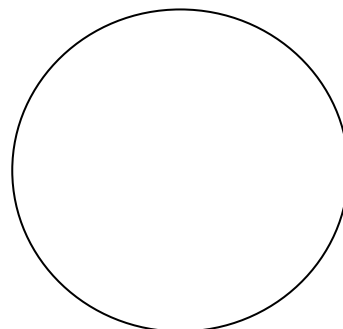
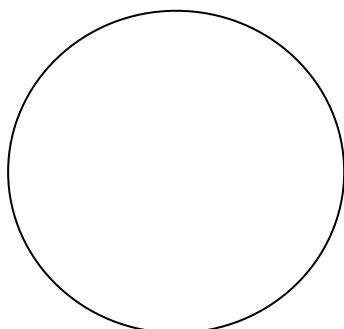
Celice:

Barvni preparat:

Vzorec: kolonija bakterij iz gojišča NA

Povečava:

Celice:



2. VAJA: Število sporogenih bakterij

NAMEN:

MATERIALI:

METODE:

Shema 1: Določanje števila aerobnih sporogenih bakterij in anaerobnih sporogenih bakterij

REZULTATI:

3. VAJA: Koliformne bakterije

NAMEN:

MATERIALI:

METODE:

Shema 1: Določanje koliformnih bakterij

REZULTATI:

Barvni preparat po Gramu:

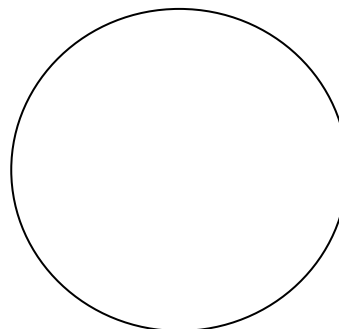
Bakterije:

Povečava:

Oblika celic:

Formacija celic:

Gr+ / Gr-:



4. VAJA: Bakterije vrste *Escherichia coli*

NAMEN:

MATERIALI:

METODE:

Shema 1: Določanje bakterij vrste *Escherichia coli*

REZULTATI:

Barvni preparat po Gramu:

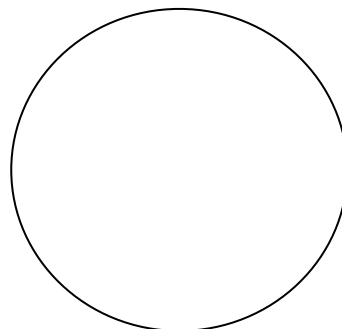
Bakterije: _____

Povečava: _____

Oblika celic: _____

Formacija celic: _____

Gr+ / Gr-: _____



5. VAJA: Bakterije rodu *Salmonella*

NAMEN:

MATERIALI:

METODE:

Shema 1: Določanje bakterij rodu *Salmonella*

REZULTATI:

Barvni preparat po Gramu:

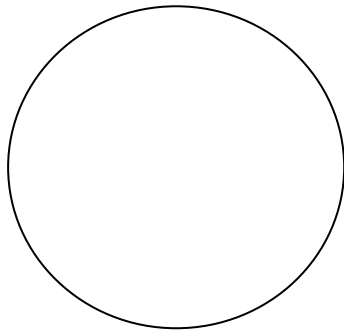
Bakterije:

Povečava:

Oblika celic:

Formacija celic:

Gr+ / Gr-:



Barvni preparat po Gramu:

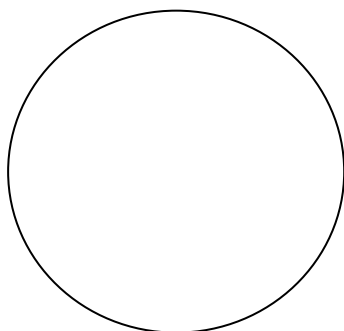
Bakterije:

Povečava:

Oblika celic:

Formacija celic:

Gr+ / Gr-:



6. VAJA: Bakterije vrste *Listeria monocytogenes*

NAMEN:

MATERIALI:

METODE:

Shema 1: Določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*

REZULTATI:

Barvni preparat po Gramu:

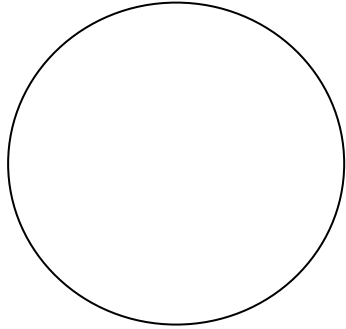
Bakterije:

Povečava:

Oblika celic:

Formacija celic:

Gr+ / Gr-:



Barvni preparat po Gramu:

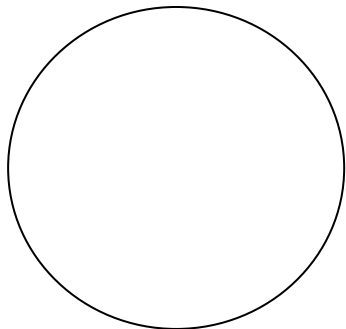
Bakterije:

Povečava:

Oblika celic:

Formacija celic:

Gr+ / Gr-:



7. VAJA: Koagulaza pozitivni stafilokoki

NAMEN:

MATERIALI:

METODE:

Shema 1: Določanje koagulaza pozitivnih stafilokokov

REZULTATI:

Barvni preparat po Gramu:

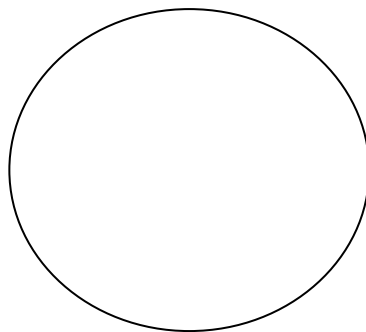
Bakterije:

Povečava:

Oblika celic:

Formacija celic:

Gr+ / Gr-:



8. VAJA: Bakterije vrste *Bacillus cereus*

NAMEN:

MATERIALI:

METODE:

Shema 1: Določanje bakterij vrste *Bacillus cereus*

REZULTATI:

Barvni preparat po Gramu:

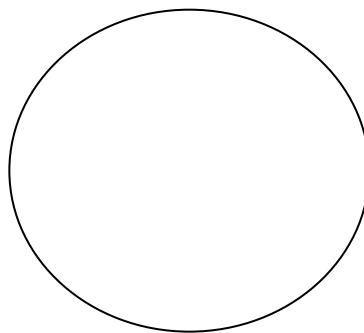
Bakterije:

Povečava:

Oblika celic:

Formacija celic:

Gr+ / Gr-:



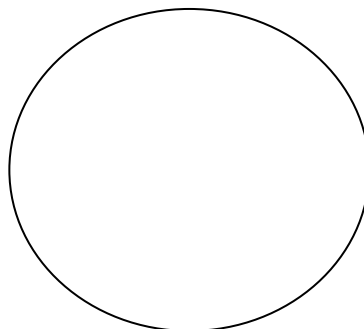
Barvni preparat po Schaeffer-Fulton:

Bakterije:

Povečava:

Oblika celic:

Sporogenost:



9. VAJA: Sulfitreducirajoči klostridiji

NAMEN:

MATERIALI:

METODE:

Shema 1: Določanje spor in vegetativnih oblik bakterij vrste *C. perfringens*

Shema 2: Določanje spor bakterij vrste *C. perfringens*

REZULTATI:

Barvni preparat po Gramu:

Vzorec:

Povečava:

Oblika celic:

Formacija celic:

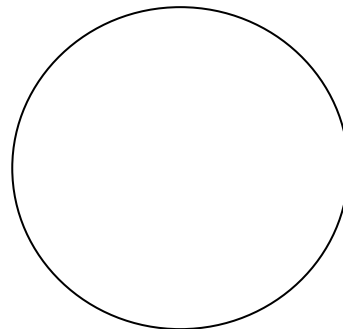
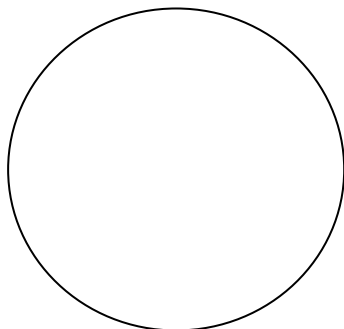
Gr+ / Gr-:

Barvni preparat po Schaeffer-Fulton :

Vzorec:

Povečava:

Spore:



10. VAJA: Mikrobiološka preiskava pitne vode

NAMEN:

MATERIALI:

METODE:

Shema 1: Mikrobiološka preiskava pitne vode

REZULTATI:

ZAPISKI

NAVODILA ZA VARNO DELO

- V mikrobiološkem laboratoriju vedno nosite zaščitne halje.
- V mikrobiološkem laboratoriju je prepovedano kajenje ter uživanje hrane in pijač.
- Na delovnem pultu je samo material, ki ga potrebujete za izvedbo preiskave.
- Okna in vrata morajo biti med eksperimentalnim delom zaprta zaradi nevarnosti kontaminacije.
- Pri delu vedno uporabljate aseptično tehniko.
- Plinske gorilnike na začetku in ob koncu dela odpre in zapre vodja vaje oziroma tehnik.
- Pri delu ob plinskem gorilniku bodite pazljivi in zbrani.
- Če pridete do neposrednega kontakta z mikroorganizmi, to takoj sporočite vodji vaj oziroma tehniku.
- Če pride do kontaminacije okolja, mesto najprej razkužite, sperete z vodo in obrišete s papirnato brisačo.
- Kontaminirano steklovino in plastične nastavke za avtomatske pipete odlagajte v pripravljene košare oziroma posode z razkužili.
- V smetnjak nikoli ne odvrzite smeti, ki so kontaminirane z mikroorganizmi.
- Mikroorganizmov ne smete odnašati iz mikrobiološkega laboratorija.
- Z mikroskopi ravnajte pazljivo; pazite, da bodo po mikroskopiranju očiščeni in ugasnjeni.
- Mikroskopske preparate ne mečite v smeti, ampak v pripravljene posode z razkužili.
- Po končanem delu pospravite delovni pult in ga razkužite.
- Po končanem delu razkužite roke, jih temeljito operete z vodo in milom ter posušite s papirnato brisačo.
- Z zdravju škodljivimi in strupenimi snovmi delajte v digestoriju.
- Pri delu bodite zbrani in pazljivi.

Rezultate in opažanja zapisujte v delovni zvezek

VIRI

- Downes F. P., Ito K. 2001. Compendium of methods for microbiological examination of foods. 4th edition. Washington, APHA, 659 str.
- Harrigan W. F. 1998. Laboratory methods in food microbiology. 3rd edition. London, Academic Press Limited, 532 str.
- International standard. ISO 7954. 1987. Microbiology - General guidance for the enumeration of yeast and moulds - Colony count technique at 25°C. 1st ed. Geneve: International Organization for Standardization, 3 str.
- International standard. ISO 4831. 1991. Microbiology - General guidance for enumeration of coliform - most probable number technique. Geneve : International Organization for Standardization, 11 str.
- International standard. ISO 4833. 1991. Microbiology - General guidance for the enumeration of microorganisms - Colony count technique at 30 °C. 2nd ed. Geneve: International Organization for Standardization, 4 str.
- International standard. ISO 6579. 1993. Microbiology - General guidance on methods for the detection of Salmonella. 3rd ed. Geneve: International Organization for Standardization, 1993. - IV, 16 str.
- International standard. ISO 7251. 1993. Microbiology - General guidance for enumeration of presumptive Escherichia coli - most probable number technique. 2nd ed. Geneve: International Organization for Standardization, 7 str.
- International standard. ISO 7218. 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs - General rules for microbiological examination. - 2nd ed., Geneve: International Organization for Standardization, 43 str.
- International standard. ISO 11290-1. 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes. Part 1, Detection method. 1st ed. Geneve: International Organization for Standardization, 16 str.
- International standard. ISO 7937. 1997. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for enumeration of Clostridium perfringens : colony-count technique. - 2nd ed. - Geneve : International Organization for Standardization, 10 str.
- International standard. ISO 6887-1. 1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1, General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. - 1st ed. - Geneve: International Organization for Standardization, 5 str.
- International standard. ISO 6579. 2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of Salmonella spp. 4th ed. Geneve: International Organization for Standardization, 27 str.
- International standard. ISO 11290-1. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes. Part 1, Detection method. Amendment 1, Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data. - Geneve: International Organization for Standardization, 13 str.
- International standard. ISO 7932. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for enumeration of presumptive Bacillus cereus : colony-count technique at 30 °C. 3rd ed. Geneve: International Organization for Standardization, 8 str.
- International standard. ISO 21528-1. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 1, Detection and enumeration by MPN technique with pre-enrichment. 1st ed. Geneva: International Organization for Standardization, 12 str.
- International standard. ISO 21528-2. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 2, Colony-count method. 1st ed. Geneva : International Organization for Standardization, 10 str.
- Praktikum mikrobiološke analize: skripta in delovni zvezek za študente IV. letnika živilstva. 2000. Uredila Barbara Jeršek. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za živilsko mikrobiologijo, 32 str.
- Pravilnik o pitni vodi. Uradni list RS 19/2004, 35/2004
- Slovenski standard SIST EN ISO 6888-2:1999. Mikrobiologija živil in krmil. Horizontalna metoda štetje koagulazno pozitivnih stafilkokov (Staphylococcus aureus in drugih vrst). 2.del, Tehnika uporabe agarja z zajčjo plazmo iz fibrinogenov (ISO 6888-2:1999). 1. izd., 7 str.
- Trkov, M. Praktikum mikrobiološke analize. Interno gradivo. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Katedra za živilsko mikrobiologijo, 1997, loč. pag.
- Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živali (ZZUIZS). Uradni list RS 52/2000; 42/2002
- Zakon o spremembah in dopolnitvah določenih zakonov na področju zdravja (ZdZPZ). Uradni list RS 47/2004

FOTOGRAFIJE

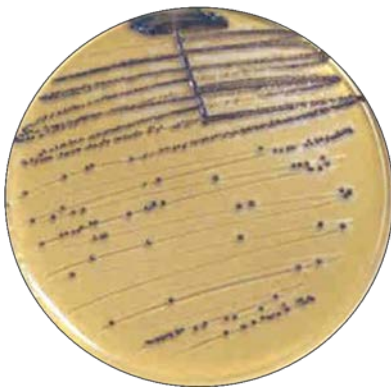


Salmonella on SS

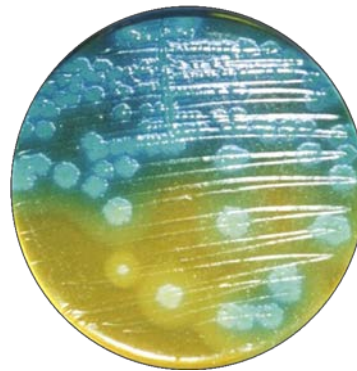
Salmonella na gojišču SS



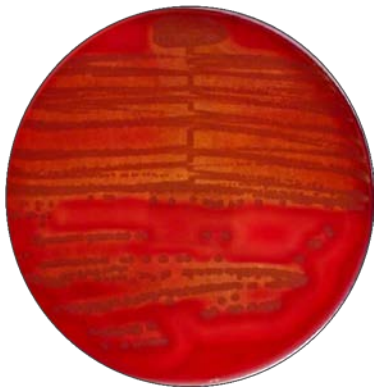
Listeria na gojišču L. mono



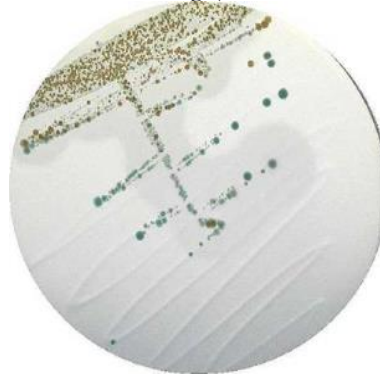
Staphylococcus aureus na gojišču BP



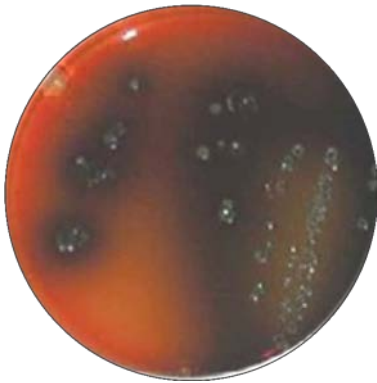
Bacillus cereus na gojišču BC



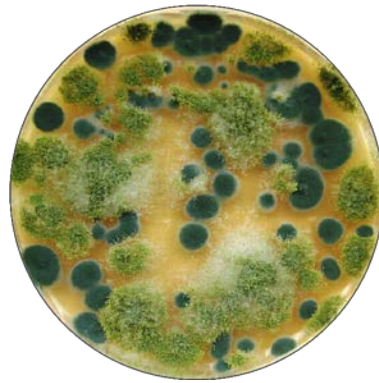
Staphylococcus aureus na gojišču KA



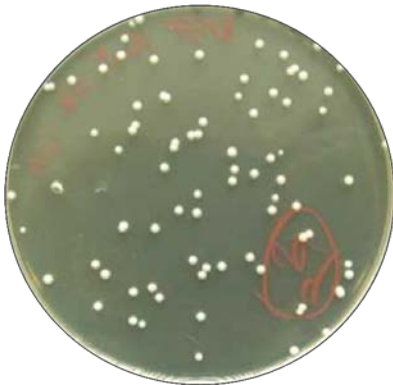
Listeria na gojišču ALOA



Listeria na gojišču PALCAM



Moulds na gojišču OGY



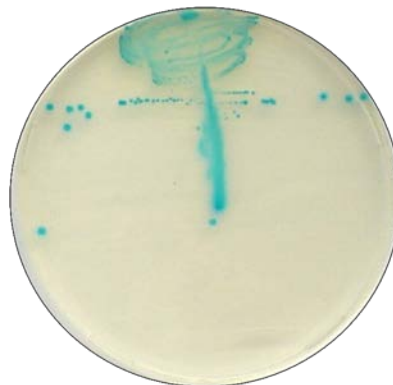
Aerobic plate count na gojišču NA



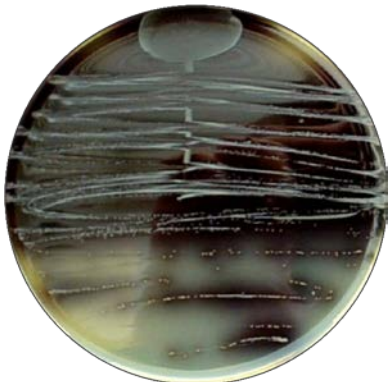
Bacillus cereus na gojišču KA



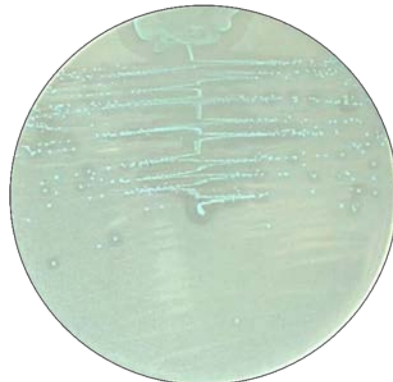
E. coli na gojišču EMB



E. coli na gojišču Tergitol



Listeria na gojišču Oxford



Listeria na gojišču ALOA

