



REPUBLIKA SLOVENIJA  
MINISTRSTVO ZA ŠOLSTVO IN ŠPORT



*Naložba v vašo prihodnost*  
OPERACIJO DELNO FINANCIRA EVROPSKA UNIJA  
Evropski socialni sklad

**VIŠJEŠOLSKI STROKOVNI PROGRAM  
ŽIVILSTVO IN PREHRANA**

**ŽIVILSKA MIKROBIOLOGIJA IN  
BIOTEHNOLOGIJA**

**VAJE IZ MIKROBIOLOGIJE**

**VIDA NAHBERGER MARČIČ**

Višješolski strokovni program: Živilstvo in prehrana

Živilska mikrobiologija in biotehnologija. Vaje iz mikrobiologije

Gradivo za 1. letnik

Avtorica:

mag. Vida Nahberger Marčič, univ. dipl. inž. živ. teh.

Izobraževalni center Piramida Maribor

Višja strokovna šola



Ljubljana, 2008

© Avtorske pravice ima Ministrstvo za šolstvo in šport Republike Slovenije.

Gradivo je sofinancirano iz sredstev projekta Impletum 'Uvajanje novih izobraževalnih programov na področju višjega strokovnega izobraževanja v obdobju 2008–11'.

Projekt oz. operacijo delno financira Evropska unija iz Evropskega socialnega sklada ter Ministrstvo RS za šolstvo in šport. Operacija se izvaja v okviru Operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007–2013, razvojne prioritete 'Razvoj človeških virov in vseživljenjskega učenja' in prednostne usmeritve 'Izboljšanje kakovosti in učinkovitosti sistemov izobraževanja in usposabljanja'.

Vsebina tega dokumenta v nobenem primeru ne odraža mnenja Evropske unije. Odgovornost za vsebino dokumenta nosi avtor.

**KAZALO VSEBINE**

<b>1</b>	<b>VAJE - I. DEL .....</b>	<b>3</b>
1.1	UVOD V DELO V MIKROBIOLOŠKEM LABORATORIJU (MB LABORATORIJU) ...	3
1.2	RAVNANJE S KUŽNIM MATERIALOM .....	3
1.3	PRANJE IN SUŠENJE LABORATORIJSKE STEKLOVINE IN PRIBORA .....	4
1.4	PRIPRAVA STEKLOVINE IN PRIBORA ZA STERILIZACIJO IN STERILIZACIJA Z VROČIM ZRAKOM .....	4
1.5	STERILIZACIJA V ZASIČENI VODNI PARI .....	5
1.6	OPREMA V MB LABORATORIJU .....	5
1.7	MIKROBIOLOŠKA GOJIŠČA ZA RAST BAKTERIJ .....	6
1.8	NALOGA 1 .....	8
1.8.1	Tehtanje, priprava, sterilizacija in razlivanje gojišč .....	8
1.8.2	Navodilo za pripravo gojišč .....	10
1.9	NALOGA 2 .....	11
1.9.1	Priprava fiziološke raztopine (F.R.) .....	11
<b>2</b>	<b>VAJE - II. DEL.....</b>	<b>13</b>
2.1	NALOGA 1: PRIPRAVA VZORCEV ŽIVIL ZA MIKROBIOLOŠKO PREISKAVO	13
2.1.1	Postopek homogenizacije vzorca .....	13
2.1.2	Priprava različnih vrst živil za MB preiskavo .....	13
2.2	NALOGA 2: POJEM DECIMALNIH RAZREDČITEV .....	14
2.3	PETRIFILM LISTIČI ZA UGOTAVLJANJE SŠB, <i>E. COLI</i> , ENTEROBakterij, KOLIFORMNIH MO IN PLESNI/KVASOVK.....	15
2.3.1	Inokulacija (nasajanje) petrifilma .....	15
2.3.2	Inkubacija in interpretacija rezultatov .....	16
2.4	NALOGA 3: IZVEDBA MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE ŽIVIL.....	16
2.4.1	Meso v manjših kosih – predpakirano na podstavku.....	17
2.4.2	Naravne začimbe.....	18
2.4.3	Zelenjavni sok, zelenjavne omake in kečup .....	18
2.4.4	Kislo mleko, jogurt (tekoči fermentirani izdelki) .....	19
2.4.5	Sesekljano (zmleto) meso .....	21
<b>3</b>	<b>VAJE – III. DEL.....</b>	<b>23</b>
3.1	NALOGA 1: NADALJEVANJE KULTIVACIJE IN IDENTIFIKACIJE MIKROORGANIZMOV IZ PREDHODNIH VAJ .....	23
3.1.1	Ugotavljanje skupnega števila bakterij .....	23
3.1.1.1	Štetje kolonij na inkubiranih gojiščih za skupno število bakterij.....	23
3.1.2	Horizontalna metoda za štetje $\beta$ -glukoronidaza-pozitivne <i>Escherichie coli</i> – .....	23
3.1.2.1	Sajenje kratke biokemijske vrste IMVC + urea .....	24
3.1.3	Gojišča in ugotavljanje prisotnosti koagulaza pozitivnih stafilokokov ( <i>S. aureus-a</i> )	24
3.1.4	Uporaba SPS agarja za izolacijo in štetje vegetativnih celic <i>Clostridium</i> <i>perfringens</i> ter <i>Clostridium botulinum</i> iz vseh vrst živil.....	25
3.1.5	Gojišča, uporabljena pri ugotavljanju prisotnosti salmonel (priprava in uporaba) po (ISO 6579:2002). Horizontalna metoda za ugotavljanje prisotnosti <i>Salmonella</i> <i>spp.</i> .....	25
3.1.6	Uporaba kristala Becton Dickinson za identifikacijo enterobakterij, g - pozitivnih bakterij ter anaerobov .....	26

3.2	NALOGA 2: STANDARDNE METODE ZA BAKTERIOLOŠKI PREGLED PITNE VODE .....	27
3.2.1	Metoda membranske filtracije.....	28
3.2.2	Odvzemanje in metoda obdelave pitne vode po metodi MPV (most probable number) .....	29
3.2.3	Metode za mikrobiološke preiskave vzorcev pitnih vod .....	30
3.3	NALOGA 3: ODVZEMANJE IN METODA OBDELAVE BRISOV IZ STROJNE OPREME, DELOVNIH POVRŠIN IN ROK ZAPOSLENIH.....	32
3.3.1	Kontaktna metoda.....	32
3.3.2	Metoda brisov po Kelchu (modificirana).....	32
<b>4</b>	<b>VAJE – IV. DEL.....</b>	<b>36</b>
4.1	NADALJEVANJE MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE ŽIVIL, PITNE VODE IN BRISOV .....	36
4.2	NALOGA 1: MIKROSKOPIRANJE.....	36
4.2.1	Navodilo za izvedbo vaje.....	36
4.2.2	Navodilo za potek barvanja .....	38
4.3	NALOGA 2: ODCITAVANJE KRATKE BIOKEMIJSKE VRSTE IN BIOKEMIJSKE VRSTE KRISTALA BECTON DICKINSON .....	38
4.3.1	Kratka biokemijska vrsta IMVC + urea (prirejena) .....	38
4.3.2	Kristal Becton Dickinson.....	38
4.4	NALOGA 3: BAKTERIOLOŠKI PREGLED PITNE VODE.....	38
4.4.1	Interpretacija rezultatov mikrobioloških preiskav pitne vode.....	38
4.5	NALOGA 4: OCENA MIKROBIOLOŠKE ČISTOSTI POVRŠIN .....	39
4.5.1	Interpretacija rezultatov čistosti površin .....	39
<b>5</b>	<b>LITERATURA.....</b>	<b>41</b>

## 1 VAJE - I. DEL

### 1.1 UVOD V DELO V MIKROBIOLOŠKEM LABORATORIJU (MB LABORATORIJU)

- zaščitni ukrepi so odvisni od patogenosti mikrobov, s katerimi delamo; večina MB laboratorijev, ki se ukvarjajo z analizo živil, spada v **skupino tveganja št. 2**,
- v laboratoriju ne jemo, ne pijemo, ne kadimo, inkubirana gojišča (kužnina) prelivamo z raztopino razkužila oz. zlagamo v zato pripravljene posode, pribor ožigamo, uporabljamo standardne metode, upoštevamo navodila strokovnega osebja, nosimo zaščitno obleko,
- preden zapustimo laboratorij si roke umijemo in prelijemo z raztopino razkužila,
- prostori v živilskem MB laboratoriju so: prostor za sprejem vzorcev, prostor za tehtanje, raztapljanje in razlivanje gojišč, prostor za pranje in sterilizacijo, prostor za pripravo in nadaljnjo obdelavo vzorcev, ločen prostor za obravnavo patogenih mikrobov (Bole in Hostnik, 1996, Bell et al., 2005).

### 1.2 RAVNANJE S KUŽNIM MATERIALOM

Kužni material v mikrobiološkem laboratoriju predstavljajo porasla / inkubirana gojišča s saprofiti (praviloma nepatogenimi) in patogenimi bakterijami, ter ves pribor (pincete, škarje, žličke), ki se uporablja v postopku vzorčenja. Pri delu v postopku preskušanja uporabljamo razkužilo v pršilu za sprotno razkuževanje delovnih površin, za sterilizacijo pribora pa korita iz plastike ali emajlirane kovine, v katera odlagamo pribor, ki ga prelijemo z raztopino razkužila. Mikrobiološke pipete ali nastavke za pipetorje odlagamo v kadi, napolnjene z razkužilom. Raztopino razkužila pripravimo v skladu z navodilom proizvajalca.

Cepilne zanke, pincete, škarje in spatule ožigamo s plamenom. Vedno preverjamo varovalne ventile na plinskih jeklenkah.



Slika 1.1: Ožiganje cepilnih zank

Vir: [www.labnews.co.uk/.../1523/3/gas-safety-burner/](http://www.labnews.co.uk/.../1523/3/gas-safety-burner/)

Med delom s priborom v postopku vzorčenja se uporablja 40 % etanol, v katerega se pomoči pribor in ožge s plamenom. To je postopek kratkotrajne sterilizacije na delovnem mestu.

Uporabljeni gojišča v petrijevkah in epruvetah se v postopku odstranjevanja zložijo v plastične kadi ter sterilizirajo 20 minut pri 120 °C. Po sterilizaciji se ohladijo, utekočinjena gojišča pa se odstranijo v kanalizacijo. Laboratorijska posoda se nato pripravi za pranje.

V laboratoriju ne jemo, ne pijemo in ne kadimo! Z rokami se ne dotikamo obraza.

Pred odhodom na malico in domov si roke umijemo ter prelijemo z razkužilom in počakamo, da se posuši. Pri delu z nevarnimi mikrobi uporabljamo dodatna zaščitna sredstva: gumijaste rokavice, masko za usta in nos in gumijast predpasnik (Bell et al., 2005).

### **1.3 PRANJE IN SUŠENJE LABORATORIJSKE STEKLOVINE IN PRIBORA**

Za delo v živilskem MB laboratoriju, uporabljamo več vrst posode. Osnovna posoda vsakega laboratorija je naslednja:

- petrijevke, za razlivanje trdnih gojišč,
- erlenmajerice z ozkim grlom za hranjenje in razlivanje gojišč do 500 ml,
- erlenmajerice od 500 ml do 3000 ml za pripravo in sterilizacijo gojišč,
- menzure po 100 ml in 1000 ml.
- pipete po 1 ml, 2 ml, 5 ml in 10 ml,
- luknjači, skalpeli, spatule, pincete, škarje za jemanje vzorcev, cepilne zanke,
- steklene paličice (etaleri) za razmazovanje razredčin po agarju,
- epruvete po 16x160 mm, 13x130, 20x200 za gojišča in razredčitve,
- navadne steklenice za razlivanje in sterilizacijo fiziološke raztopine, destilirane vode in drugih raztopin,
- lijaki, kovinske košarice za epruvete in kovinske škatle za pipete in petrijevke, stojala za epruvete.

Posoda, ki se uporablja v mikrobiološkem preskušanju se mora pred uporabo oprati in sterilizirati. Pere se v raztopini detergenta (Kemex) v topli vodi s ščetko in strgalno krpico. Močno umazano posodo se lahko potopi v raztopino detergenta in pusti rahlo vreti 1/2 ure. Nato se opere na običajen način. Vsa posoda se splakne pod tekočo vodo ter v destilirani vodi. Zlaga se v sušilne košare, ki so sestavni del sušilne omare. Ko so košare napolnjene se posoda osuši na 50 °C v sušilnih omarah (Karaklašević et al., 1967). Sodobni laboratoriji vedno bolj uporabljajo pomivalne stroje za laboratorijsko steklovino.

### **1.4 PRIPRAVA STEKLOVINE IN PRIBORA ZA STERILIZACIJO IN STERILIZACIJA Z VROČIM ZRAKOM**

Oprana in osušena posoda in pribor se pripravlja za sterilizacijo. Sterilizira se v sterilizatorju na vroč zrak. Neognjevarna posoda iz gume, tkanine in podobnih materialov se sterilizira v avtoklavu.

Petrijevke in pipete se pakirajo v posebne kovinske kasete. Zlagajo se v sterilizator in sterilizirajo 2 uri pri 180 °C. Ostala steklovina se zavije v papir (epruvete, etaleri za razmazovanje razredčitev, brisi v epruvetah) ali pokriva s papirjem in aluminijasto folijo. Steklovina v papirju se sterilizira 2 uri pri 160 °C. Čas sterilizacije računamo od trenutka, ko je

dosežena na termometru omenjena temperatura. Med obratovanjem sterilizatorja ne smemo odpirati. Najbolje naslednji dan, iz njega zložimo sterilno posodo.

Postopek nadzorujemo s pomočjo indikatorskega papirja, ki ob pravilno izvedeni sterilizaciji spremeni barvo. Evidenca o suhi sterilizaciji se vodi v kontrolnem zvezku, ki se nahaja v prostoru sterilizacije in priprave steklovine (Karaklašević et al., 1967).

## **1.5 STERILIZACIJA V ZASIČENI VODNI PARI**

Zasičena vodna para pod pritiskom 1/2 atm ima temperaturo okoli 112 °C, pod pritiskom 1 atm okoli 120 °C in pod pritiskom 2 atm okoli 134 °C.

V zasičeni vodni pari pod pritiskom 1 atm pri 120 °C poginejo vse vegetativne oblike celic in spore vseh bakterij.

Sterilizacija se vrši v avtoklavu. V njem se nahaja kovinski kotel s kovinsko ploščo, na katero se zлага material za sterilizacijo.

Material v avtoklav zložimo enakomerno, da lahko vodna para kroži. Erlenmajerice in druge steklenice s tekočinami narahlo zapremo z staničevinastim zamaškom, da lahko para prodira v notranjost. Da preprečimo vlaženje staničevinastih zamaškov jih prekrijemo z aluminijasto folijo.

Novejši sterilizatorji z elektronskim uravnavanjem samodejno vodijo postopek sterilizacije.

Navodila za sterilizacijo morajo biti sestavni del postopkov GLP (dobre laboratorijske prakse) in se morajo nahajati v prostoru sterilizacije.

Kontrola brezhibnosti delovanja:

Brezhibnost kontroliramo s komercialno dostopnimi lističi, ki ob pravilno izvedeni sterilizaciji (fizično in biološko) spremenijo barvo. Sterilizacija se nadzoruje v kontrolnem zvezku, ki se nahaja v prostoru sterilizacije (Karaklašević et al., 1967).

## **1.6 OPREMA V MB LABORATORIJU**

Po SIST ISO 7218 – Splošna pravila za MB preiskave

Brezprašna komora, tehtnice (precizne), stomaher (homogenizator), pH meter, avtoklav, inkubatorji, hladilniki, zamrzovalnik, termostatske vodne kopeli, sterilizatorji, mikrovalovna pečica, optični mikroskop, plinski gorilniki, dispenzer za gojišča, mehanski mešalec, membranski filter, pomivalni stroj za pranje laboratorijske posode.

## 1.7 MIKROBIOLOŠKA GOJIŠČA ZA RAST BAKTERIJ

Če želimo spoznati higiensko stanje določenega vzorca živila, moramo ugotoviti **stopnjo** in **naravo** kontaminacije (onesnaženosti). Stopnjo določamo s skupnim številom bakterij, naravo kontaminacije pa z ugotavljanjem prisotnosti higienskih indikatorjev in patogenih bakterij.

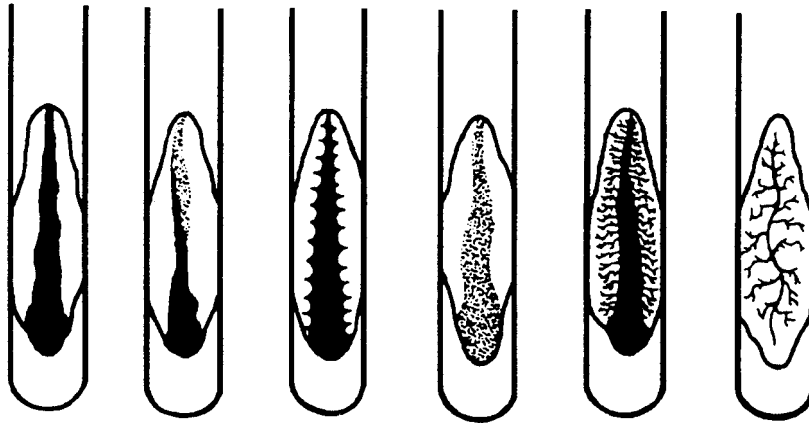
Za vse bakterije, ki jih želimo razmnožiti, potrebujemo ustrezne biokemijske in biofizikalne pogoje. **Biokemijske** ustvarimo z uporabo hranljivega okolja v obliki gojišč, ki so sestavljena tako, da ustrezajo posebnim potrebam posameznih bakterij. V ta namen uporabljamo celo paleto različnih tipov gojišč, ki so jih razvili z različnimi nameni; za obogatitve rasti, za izolacijo posamezne vrste in za prepoznavanje bakterij in potrjevanje na osnovi biokemijskih lastnosti. **Biofizikalne** pogoje zagotovimo z ustrezno temperaturo rasti in pH gojišča. Danes največ uporabljamo sintetična dehidrirana gojišča, ki jih v postopku tehtanja, raztapljanja v destilirani vodi ter avtoklaviranja raztočimo v epruvete, petrijevke, erlenmajerice, odvisno od metodologije in tehnike preiskave. Ponavadi se imenujejo po mikroorganizmu, ki ga želimo izolirati, po avtorju recepture ali pa je ime kompleksnejše. Skoraj vsa gojišča so danes že komercialno dostopna v svoji sestavi po recepturi (ni potrebno tehtanje po posamičnih komponentah). Najuglednejši proizvajalci gojišč so Merck, Difco, Oxoid, BioMerieux in drugi (<http://www.merck.de/>).

Hranljiva gojišča so umetni (sintetični) substrati za gojenje MO. So zmesi različnih hranilnih snovi, ki omogočajo MO rast in razmnoževanje v umetnih pogojih tako, kot da živijo v svojem naravnem okolju. Za rast potrebujejo beljakovine, ogljikove hidrate, mineralne soli, vodo ter posebne rastne obogatitve. Da bi biokemijske lastnosti v gojišču lahko prepoznali, gojišču dodajamo indikatorje. Vsa dehidrirana gojišča morajo biti sterilna/čista; natančno moramo upoštevati navodila na embalaži, ki določajo gramaturo, dodatek destilirane vode in drugih dodatkov, pH vrednost ter čas sterilizacije ter posodo v kateri ga pripravljamo.

Glede na uporabo in načina delovanja uporabljamo pri gojenju MO različne tipe gojišč:

1. **obogatena gojišča** (enrichment media), kjer z dodatkom komponent kot so kri, serum, ostanki izločkov ali živalskih tkiv dobimo gojišče, ki omogoča rast tudi izbirčnim mikroorganizmom,
2. **selektivna gojišča**, ki omogočajo rast določene skupine MO, drugo pa onemogočajo,
3. **diferencialna gojišča**, kjer z dodatki določenih reagentov ali kemikalij v gojišče dosežemo določen način rasti po sajenju in inkubaciji. Razlike med poraslimi bakterijami so takšne, da jih med seboj lahko ločimo na osnovi barve kolonij, spremembe barve gojišča, ustvarjanja con zgoščevanja substrata ali hidrolize gojišča,
4. **gojišče za štetje MO**, je lahko univerzalno ali specifično,
5. **gojišče za ugotavljanje lastnosti MO**, so zelo različna; vsebujejo lahko testne komponente za ugotavljanje ene ali več biokemijskih lastnosti (npr. Kliglerjev sladkor – ustvarjanje H<sub>2</sub>S in razgradnja sladkorjev).

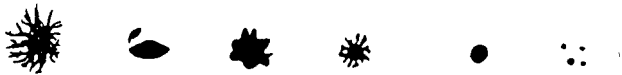
Gojišča so lahko tekoča, poltekoča (poltrda) in trda. Trdim gojiščem je dodan agar-agar v dodatku pribl. 20 g na 1 l gojišča (Karakašević et al., 1967, <http://www.merck.de/>).



nitasta bodljikava perlata difuzna drevesasta rizoidna

Slika 1.2: Rast mikroorganizmov na poševnem agarju

Vir: Karakašević et.al., 1967.



levja griva difuzne nepravilne nitaste okrogle pikčaste

Slika 1.3: Oblike kolonij (morfologija) na agarski plošči

Vir: Karakašević et al. 1967.



cel valovit krpast narezan nitast nakodran

Slika 1.4: Robovi bakterijskih kolonij

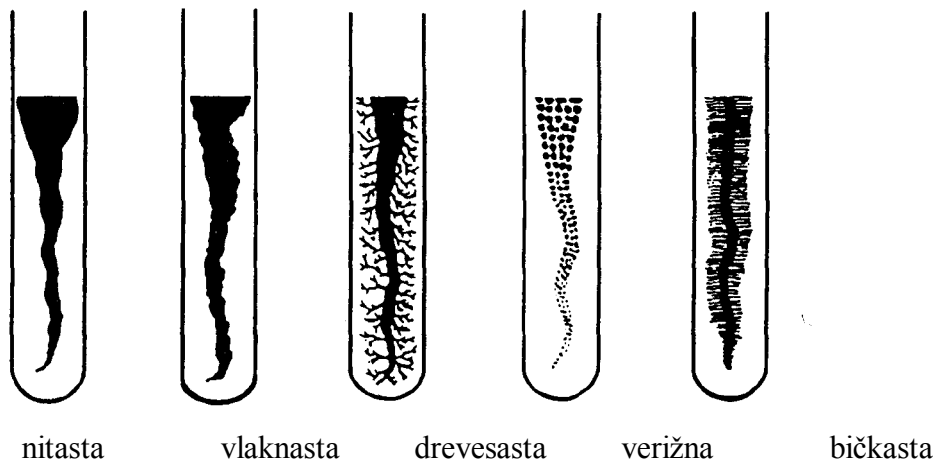
Vir: Karakašević et al., 1967.



ravna privzdignjena konveksna konkavna ošiljena uležana

Slika 1.5: Privzdignjenost kolonij od podlage

Vir: Karakašević et al., 1967.



Slika 1.6: Rast mikroorganizmov ob vbodu v globoki agar

Vir: Karakašević et al., 1967.

## POVZETEK

V MB laboratoriju delujemo v skladu z dobro laboratorijsko prakso- upoštevamo vse zaščitne ukrepe, ki so potrebni, da zaščitimo osebe in vzorce, ki jih analiziramo. Postavitev laboratorija je standardizirana – pomeni, da ima posamezne kabinete in se deli v čisti del in del za diagnostiko patogenih bakterij. Pribor in oprema za delo v MB laboratoriju mora biti sterilna. Uporabljamo sterilizacijo z vročim zrakom, parno sterilizacijo in kratkotrajno sterilizacijo na delovnem mestu. Za štetje in določanje vrst bakterij in plesni uporabljamo mikrobiološka gojišča, ki so umetni substrati za simulacijo biokemijskih in biofizikalnih pogojev za optimalno rast bakterij. Glede na uporabo in način delovanja uporabljamo različne vrste gojišč.

## 1.8 NALOGA 1

### 1.8.1 Tehtanje, priprava, sterilizacija in razlivanje gojišč

(Splošna navodila o zagotavljanju kakovosti priprave gojišča v laboratoriju - modificirano po ISO TR/11333-1:2000)

Na vsakem izvornem paketu gojišč se nahaja navodilo za pripravo gojišča v petrijevkah ali epruvetah. Če je označeno na paketu, uporabljamo zaščitno masko, ker imamo lahko opravka s higroskopičnimi, strupenimi ali karcenogenimi sestavinami. Želena gramatura odtehtamo v erlenmajerico sterilno ali nesterilno, kot zahtevajo navodila. Gramatura mora biti natančna do desetinke grama.

#### A) Tehtanje

Na vsakem izvornem paketu gojišč se nahaja navodilo za pripravo gojišča v petrijevkah ali epruvetah. Če je označeno na paketu, uporabljamo zaščitno masko, ker imamo lahko opravka s higroskopičnimi ali karcenogenimi sestavinami. Želena gramatura odtehtamo v erlenmajerico,

bodisi sterilno ali nesterilno, kot zahtevajo navodila. Gramatura mora biti natančna do desetinke grama.

## B) Raztapljanje

V postopku raztapljanja dodamo polovico zahtevane količine vode: erlenmajerico dvignemo in močno krožno mešamo, dokler se ne pojavi raztopina ter dodamo ostalo količino destilirane vode ob steni erlenmajerice, da odstranimo sledove gojišča. Uporabimo tako veliko erlenmajerico, da je napolnjena do polovice ali do dveh tretjin. Komponente tekočih gojišč so običajno topne pri sobni temperaturi in naredijo bistro raztopino. Gojišča, ki vsebujejo agar, želatino ali cistin se morajo segreti do vretja, da se popolnoma raztopijo. Da omejimo denaturacijo komponent, gojišča večkrat premešamo. Ko dosežejo temperaturo vretja zmanjšamo temperaturo ter pustimo še nekaj minut rahlo vreti. Popolnoma raztopljeno gojišče se odlikuje po popolni bistrosti v curku ob steni erlenmajerice.

## C) Uravnavanje pH vrednosti

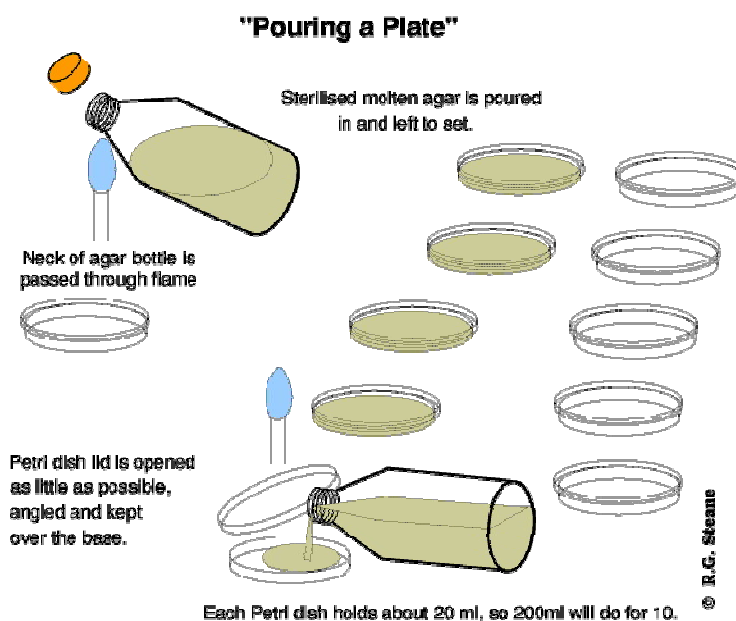
Po raztapljanju / sterilizaciji izvedemo uravnavanje pH vrednosti (25 °C) tako tekočih kot trdnih gojišč. PH vrednost uravnamo na priporočeno vrednost na pakiranju. Korigiramo ga z dodajanjem 1N ali 1/10N HCl ali NaOH . Za testiranje uporabljamo lakmusove lističe.

## D) Polnjenje v steklovino

Gojišča polnimo v petrijevke po sterilizaciji / raztapljanju pri temperaturi 45 °C do 55 °C, da se izognemo kondenzu - najboljšo v brezprašni komori. Gojišče dobro premešamo pred polnjenjem. Ko se strdi in ohladi, petrijevke obrnemo in shranimo v hladilnik do 14 dni.

V primeru priprave poševnih agarjev, polnimo epruvete z želenim volumnom gojišča in jih polagamo na kovinske palice ali izrabljene steklene pipete velikih volumnov. Počakamo, da se strdijo in ohladijo ter shranimo v hladilniku.

Tekoča gojišča, ki jih uporabljamo kot bujone v epruvetah, polnimo pred sterilizacijo v epruvete, zložimo v kovinske košarice ter avtoklaviramo po ustaljenem postopku. Hranimo jih v hladilniku 14 dni.



Slika 1.6.: Razlivanje agarja v petrijevke

Vir: <http://www.biotopics.co.uk/microbes/tech1.html>

<http://www.youtube.com/watch?v=vhDrCIN7MP4>

## E) Priprava dodatkov

Pri dodajanju rastnih ali zaviralnih dodatkov upoštevamo navodila in previdnostne ukrepe proizvajalca. Termolabilne dodatke dodajamo pri temperaturi, ki ne sme presegati  $47\pm 2$  °C po avtoklaviranju oz. kuhanju.

## F) Rekonstitucija agarjev

Nekatera gojišča pripravimo v naprej v erlenmajericah po 200-250 ml in jih ponovno utekočinimo (rekonstituiramo) pred uporabo (npr. sulfitni agar, agar za skupno število bakterij). Pri dodajanju dodatkov v rekonstituirana gojišča, pazimo na ustrezno temperaturo.

### 1.8.2 Navodilo za pripravo gojišč

**Pribor:** erlenmajerice (500 ml), kovinske žličke, precizna tehtnica, menzure (500 ml), destilirana voda, pH lističi, epruvete 16x160 mm z zamaški, plastične petrijevke, dispencer ali pipete po 10 ml, gorilnik, avtoklav.

#### 1. priprava **agarja za štetje mezofilnih mikroorganizmov**

Odtehtamo 4,5 g in dodamo 200 ml destilirane vode. Upoštevamo zgornje postopke (raztapljanje). Avtoklaviramo 15 minuti pri 120 °C. Ohladimo in shranimo v erlenmajerici v hladilniku ali uporabimo za zalivanje petrijevke.

#### 2. priprava **TBX agarja** (selektivno gojišče za ugotavljanje *E. coli*)

Odtehtamo 6,32 g in dodamo 200 ml destilirane vode. Upoštevamo zgornje postopke. Avtoklaviramo 15 minut pri 120 °C. Ohladimo do 50 °C in zalijemo v inokulirane petrijevke. Lahko ga hranimo v erlenmajerici do 14 dni - v hladilniku.

#### 3. priprava agarja za enterobakterije (**Chromocult agar**)

Odtehtamo 5,3 g in dodamo 200 ml destilirane vode. Upoštevamo zgornje postopke. Avtoklaviramo 15 minut pri 120 °C. Ohladimo do 50 °C in razlijemo v petrijevke. Ohlajene petrijevke shranimo v hladilniku.

#### 4. priprava **slanega bujona** (stafilokoki)

Odtehtamo 19,2 g in dodamo 200 ml destilirane vode. Po kratkotrajnem raztapljanju ga raztočimo v epruvete po 9 ml. Epruvete zložimo v košarico in avtoklaviramo 15 minuti pri 120 °C. Ohladimo in ohlajene shranimo v hladilniku.

#### 5. priprava agarja **TSI** (triple sugar iron) – diferencialno gojišče za koliformne MO

Odtehtamo 13 g in dodamo 200 ml destilirane vode. Po raztapljanju ga avtoklaviramo 15 minuti pri 120 °C. Pripravimo si sterilne epruvete (lahko manjše) in pipete po 10 ml.

Avtoklaviran in ohlajen agar na 50 °C pipetiramo po 4-5 ml v pripravljene epruvete. Epruvete polagamo na pripravljeno železno palico ali debelejšo pipeto (20 ml) v pol-ležeči položaj in pustimo, da se agar strdi in ohladi. Uporabimo ali zložimo v košarico in shranimo v hladilnik.

## **1.9 NALOGA 2**

### **1.9.1 Priprava fiziološke raztopine (F.R.)**

Fiziološko raztopino uporabljamo za homogenizacijo osnovnih trdnih vzorcev živil in hkrati za pripravo osnovne razredčine vzorca (1:10). Pripravimo jo tako, da v 1l destilirane vode raztopimo 0,85 g NaCl.

Namesto F.R. lahko uporabljamo peptonsko vodo (1 g peptona, 8,5 g NaCl v 1000 ml dest. vode).

- A. V manjši čaši odtehtamo 0,85 g NaCl in sol raztopimo v 1000 ml destilirane vode – v večji posodi. Pripravljeno raztopimo nalijemo v litrske steklenice, zamašimo s staničevino in folijo ter avtoklaviramo – 15 minut pri 120 °C. Ohlajena F.R. je pripravljena za pripravo vzorcev. Hranimo v hladilniku do 1 teden.
- B. Pripravljeno fiziološko raztopino oz. peptonsko vodo raztočimo v epruvete po 9 ml, zapremo z zamaškom, zložimo v košarice in avtoklaviramo 15 minut pri 120 °C. Ko je popolnoma ohlajena jo uporabimo v postopku priprave razredčin za mikrobiološko preiskavo.

Dnevnik

Ime in priimek:

Vaje 1. del

.....

Vaja 1: Tehtanje, raztapljanje, avtoklaviranje in razlivanje gojišč

Vaja 2: Priprava fiziološke raztopine

Gojišče: .....

Izvedba:

Tehtanje: .....(g) + ..... ml dest. vode.....

Raztapljanje:.....

Sterilizacija:.....

Razlivanje:.....

## 2 VAJE - II. DEL

### 2.1 NALOGA 1: PRIPRAVA VZORCEV ŽIVIL ZA MIKROBIOLOŠKO PREISKAVO

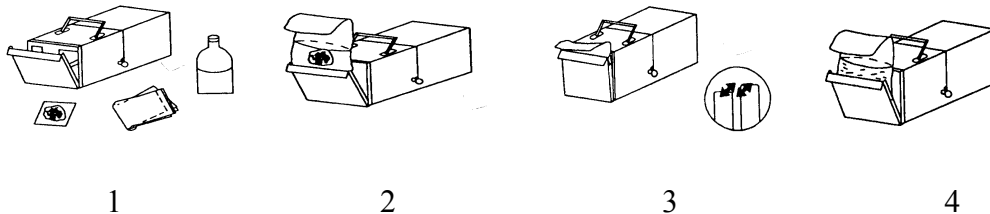
Vse vzorce živil pripravljamo za mikrobiološko preiskavo v aseptičnih pogojih, da bi preprečili kontaminacijo vzorcev z mikroorganizmi iz okolja. Za mikrobiološko preiskavo je pomembno izoliranje mikroorganizmov iz vzorca, ne iz okolja, rok in drugega materiala. Prav tako je pomembno, da se osebe ne kontaminira z morebitnimi patogenimi bakterijami iz vzorca. Upoštevanje aseptičnih tehnik pri delu je zato izjemnega pomena.

Vzorci morajo biti homogeni; če niso take konsistence in sestave jih moramo homogenizirati, preden začnemo preiskavo.

#### Navodila za vzorčenje:

**Pribor:** stekleničke s 40% etanolom, škarje, pincete, kovinski pladnji, spatule, gorilnik, papirne brisače, vata, pipete po 10 ml, precizna tehtnica, sterilna fiziološka raztopina (F.R.) v 11 steklenicah, vrečke za gnetenje vzorcev, plastične sponke za vrečke, gnetilnik.

#### 2.1.1 Postopek homogenizacije vzorca



1. Vzorec odtehtamo v sterilno vrečko in prilijemo fiziološko raztopino.
2. Vrečko vstavimo v gnetilnik in dobro zapremo loputo.
3. Priključimo aparat. Lopatice izmenično udarjajo v vzorec v vrečki.
4. Izključimo aparat (samodejno, če ima nastavitev časa) in s homogeniziranim vzorcem nadaljujemo preiskavo.

#### 2.1.2 Priprava različnih vrst živil za MB preiskavo

**Meso v manjših kosih (razrez), mesni pripravki (zapakirano na podstavkih ter vse vrste nabodal), seseklano meso in drobovina:**

S sterilno lopatko vzorec premešamo, narežemo s sterilnimi škarjami ali vzorčimo z žličko ter prenesemo v pripravljeno sterilno vrečko 20 g. Dodamo 180 ml F.R. ter zgnetemo v gnetilniku. Dobimo osnovno razredčitev.

**Siri in fermentirani izdelki (jogurt, kefir):**

Pri trdih sirih aseptično odstranimo 0,5 do 1 cm debelo plast ter vzamemo vzorec iz globine. Pri topljenih sirih aseptično odstranimo embalažo in vzamemo vzorec. Pri mehkih sirih vzorec najprej premešamo in nato odtehtamo 20 g vzorca v sterilno vrečko. Dodamo 180 ml 2 % raztopine Na-citrata ogretega na 45 °C. Zgnetemo v gnetilniku.

Pri jogurtu in drugih napitkih v lončkih, z vato, namočeno v etanol obrišemo pokrovček, ožgemo ter odpremo. Vzorčimo z žličko.

### **Gotove jedi (pleskavice, čevapčiči, sekljani zrezki):**

S sterilnim nožem odpremo embalažo (vakuumsko vrečko) in vzorčimo 20 g izdelka v vrečko za gnetenje. Dodamo 180 ml F.R. ter zgnetemo v gnetilniku.

### **Začimbe, zelišča:**

So dostopna v vrečicah iz kaširanega laminata. S sterilnimi škarjami odrežemo konico zavitka in s potresanjem odtehtamo 20 g (če je embalaža majhna, je dovolj 10 g in razmerje s F.R. prilagodimo). Dodamo 180 ml ali 90 ml F.R.. Zgnetemo s prsti in dlanjo.

### **Zelenjavni sok, zelenjavna omaka in kečup:**

V sterilno vrečko odpipetiramo 20 g vzorca in dodamo 180 ml F.R.. Pregnetemo v gnetilniku. Imamo osnovno razredčitev.

## **2.2 NALOGA 2: POJEM DECIMALNIH RAZREDČITEV**

(Po SIST ISO 6887- 1 – Priprava vzorcev za mikrobiološko preiskavo)

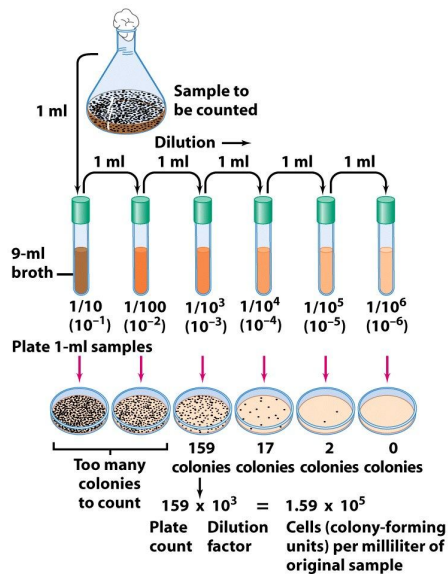
**Začetna suspenzija ali osnovna razredčitev:** je suspenzija vzorca, ki jo dobimo, ko odtehtan vzorec prelijemo z 9X-no količino fiziološke raztopine in homogeniziramo.

**Nadaljnje razredčitve:** dobimo, ko osnovno razredčitev zmešamo z 9x – no količino F.R.. S ponavljanjem te operacije dobimo želeno število razredčitev, ki nam ustreza za preiskavo oz. je zakonsko določena.

### **Navodilo za pripravo razredčitev:**

**Pribor:** stojalo za epruvete s F.R., pipete po 1 ml, kadi z raztopino razkužila, vodoodporni flomaster

V stojalo si pripravimo 5 epruvet s F.R. Iz homogeniziranega osnovnega vzorca živila (osnovna razredčitev), odpipetiramo 1ml in ga prenesemo v 1. epruveto s F.R.. Zamenjamo pipeto. Iz 1. epruvete F.R. odpipetiramo 1ml in ga prenesemo v 2. epruveto s F.R.. Postopek ponavljamo do 5. epruvete. Vselej zamenjamo pipeto.



Slika 2.2: Decimalne razredčitve v epruveh in sajenje agarjev

Vir: [people.rit.edu/.../20073IntroMicroLab3.htm](http://people.rit.edu/.../20073IntroMicroLab3.htm)

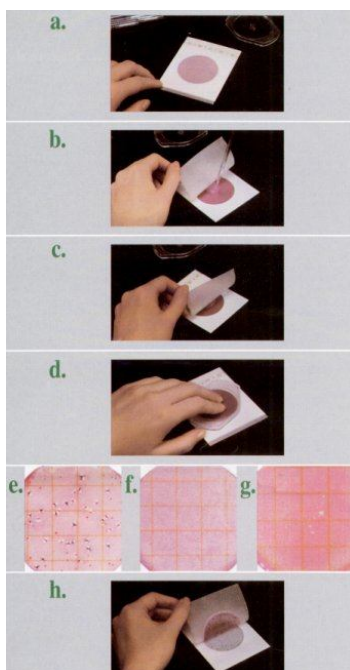
Nato iz posameznih razredčitev odpipetiramo po 1 ml na Petrifilm za skupno število bakterij ali v prazne petrijevke. Pričnemo pri največji razredčitvi in postopek ponavljamo z isto pipeto. Petrifilme in petrijevke označimo z vzorcem in razredčitvami ter datumom preiskave. Petrijevke zalijemo z rekonstituiranim in ohlajenim (na 50 °C) agarjem za SŠB, premešamo in pustimo, da se strdi. Pripravljene petrifilme in petrijevke zložimo na pladenj in inkubiramo v inkubatorju na 30 °C 48 do 72 h. Po inkubaciji preštejemo porasle kolonije.

## 2.3 PETRIFILM LISTIČI ZA UGOTAVLJANJE SŠB, *E. COLI*, ENTEROBAKTERIJ, KOLIFORMNIH MO IN PLESNI/KVASOVK

**Postopek ravnanja in skladiščenja** komercialno gotovih lističev je pri vseh tipih enak. Hranimo jih v hladilniku, originalno zaprte v vrečicah. Ostanke hranimo v vrečicah, zaprte s posebno sponko pri temperaturi okoli 20 °C.

### 2.3.1 Inokulacija (nasajanje) petrifilma

1. Petrifilm položimo na ravno delovno površino. Zgornji film dvignemo.
2. S pipeto odpipetiramo 1 ml zelene razredčitve vzorca v sredino spodnjega lističa.



Slika 2.3: Inokulacija petrifilma

Vir: <https://www.msu.edu/course/fsc/441/3mc&ec.html>

1. Spustimo zgornji film; pustimo ga pasti. Izogibajmo se vijačenja navzdol.
2. Z konkavno stranjo navzdol položimo modelček za oblikovanje na prekrit inokulum.
3. Nežno pritisnemo na modelček, da razdelimo inokulum v obliki kroga. Ne strižemo ali zvijamo modelčka.
4. Modelček dvignemo. Počakamo minuto, da gel nabrekne.

### 2.3.2 Inkubacija in interpretacija rezultatov

Petrifilme inkubiramo glede na tip, ki smo ga uporabili, z gladko stranjo navzgor. Rezultate interpretiramo s pomočjo navodil proizvajalca, za vsak tip lističev posebej.

## 2.4 NALOGA 3: IZVEDBA MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE ŽIVIL

**Pribor:** pripravljena osnovna razredčina vzorca v vrečki, stojalo z določenim številom epruvet s F.R. (9 ml), pripravljena gojišča za dokazovanje aktivnosti posameznih vrst bakterij, pipete 1ml, kad - napolnjena z raztopino razkužila za odlaganje rabljenega pribora, petrifilmi za SŠB ali prazne petrijevke, agar za SŠB, inkubatorji za 30 °C in 37 °C, vodna kopel (43 °C).

### Navodilo za izvedbo:

Iz osnovne razredčine prenesemo s pipeto po 1 ml vzorca v 1., iz 1. v 2. in iz 2. v 3. epruveto, da dobimo decimalne razredčitve vzorca. Pipete zamenjamo ob vsakem prenosu. Nato iz ustrezne razredčine prenesemo po 1ml vzorca v ustrezno tekoče gojišče za posamezne vrste bakterij (npr. iz epruvete 1 – 1:100 - prenesemo 1 ml v slani bujon, premešamo in inkubiramo 24 h na 37 °C) – pomagamo si s shemo vzorčenja, ki usmerja potek preiskave.

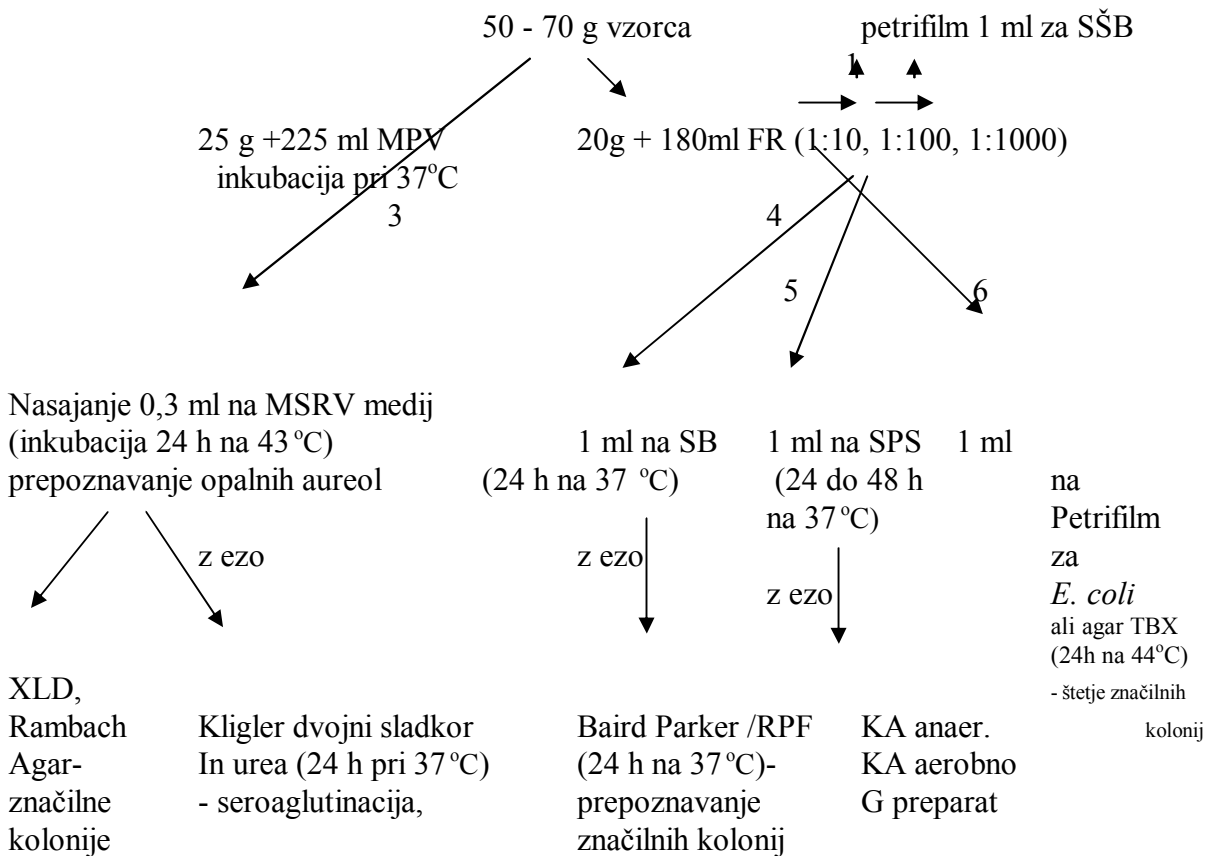
### 2.4.1 Meso v manjših kosih – predpakirano na podstavku

- ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov in higienskih indikatorjev,
- ugotavljanje patogenih mikroorganizmov,
- normativi, ki jim morajo izdelki ustrezati so opredeljeni v tabeli (Smernice za MB varnost...2005)

Merila: 1.1.1.

Živilo	SŠB	SŠP	Sal.	Enterobakterije	<i>E. coli</i>	<i>Stafil. aureus</i>	SRC
Meso v manjših kosih	5,0x10 <sup>5</sup>	/	Neg. v 25 g	/	Do 50 v g	Do 100 v g	Do 100 v g

#### SHEMA PRIPRAVE OBDELAVE IN IDENTIFIKACIJE



Slika 2.4.

Vir: Marčič, 2006.

Legenda gojišč:

**Salmonele** : MPV (modif. peptonska voda), MSRVR (poltrdi agar), XLD agar, Rambach agar

**Stafilokoki**: SB (slani bujon), Baird Parker ali RPF agar

**Klostridiji**: SPS agar, KA (krvni agar)

**Enterobakterije**: Petrifilm za enterobakterije

***E. coli*** : MCB (MacConkey bujon), TBX (triptonski, žolčni, gukoronidni agar) ali petrifilm

**BKN**: biokemijski niz IMVC za enterobakterije

- ugotavljanje SŠB (1) in SŠP (2),

- ugotavljanje prisotnosti salmonel (3), koagulaza pozitivnih stafilokokov (4), sulfitreducirajočih, klostridijev (5), *E. coli* (6) in enterobakterije (7).

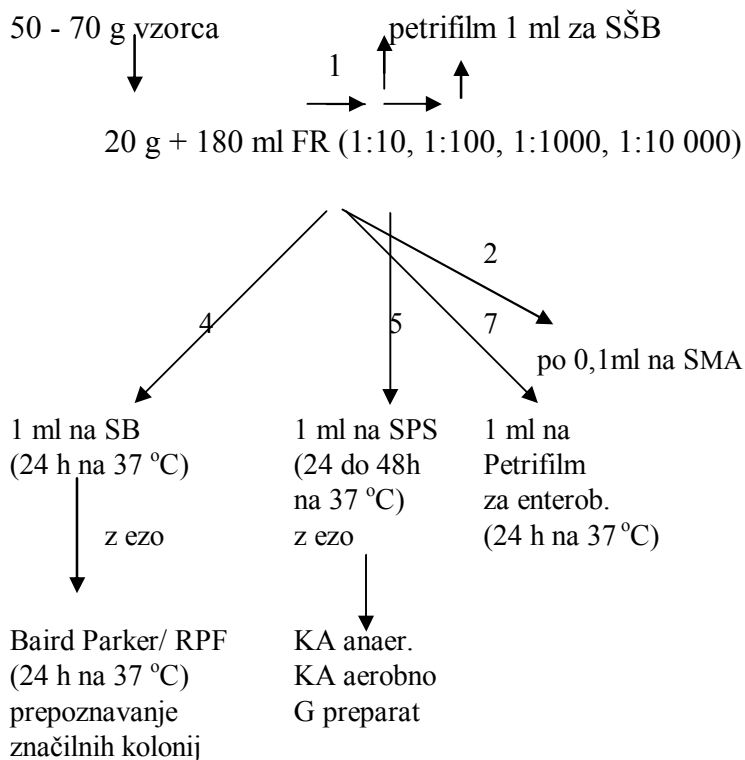
### 2.4.2 Naravne začimbe

- ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov, plesni/kvasovk in higienskih indikatorjev,
- ugotavljanje patogenih mikroorganizmov,
- normativi, ki jim morajo izdelki ustrezati so opredeljeni v tabeli (Smernice za MB varnost...2005)

#### Merila 12.1.1.

Živilo	SŠB	SŠP	Sal.	Enterobakterije	<i>E. coli</i>	<i>Stafil. aureus</i>	SRC
Naravne začimbe	$5,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^2$	Neg. v 25 g	Do 10 v 1 g	/	Do 10 v 1 g	Do 100 v 1 g

#### SHEMA PRIPRAVE OBDELAVE IN IDENTIFIKACIJE



Slika 2.5.

Vir: Marčič, 2006.

Izolacija salmonel je enaka kot pri postopku za manjše kose mesa.

Legenda gojišč: priprava gojišč je opisana v posebnem poglavju G

- ugotavljanje SŠB (1) in SŠP (2),
- ugotavljanje prisotnosti salmonel (3), koagulaza pozitivnih stafilokokov (4), sulfitreducirajočih klostridijev (5), *E. coli* (6) in enterobakterij (7).

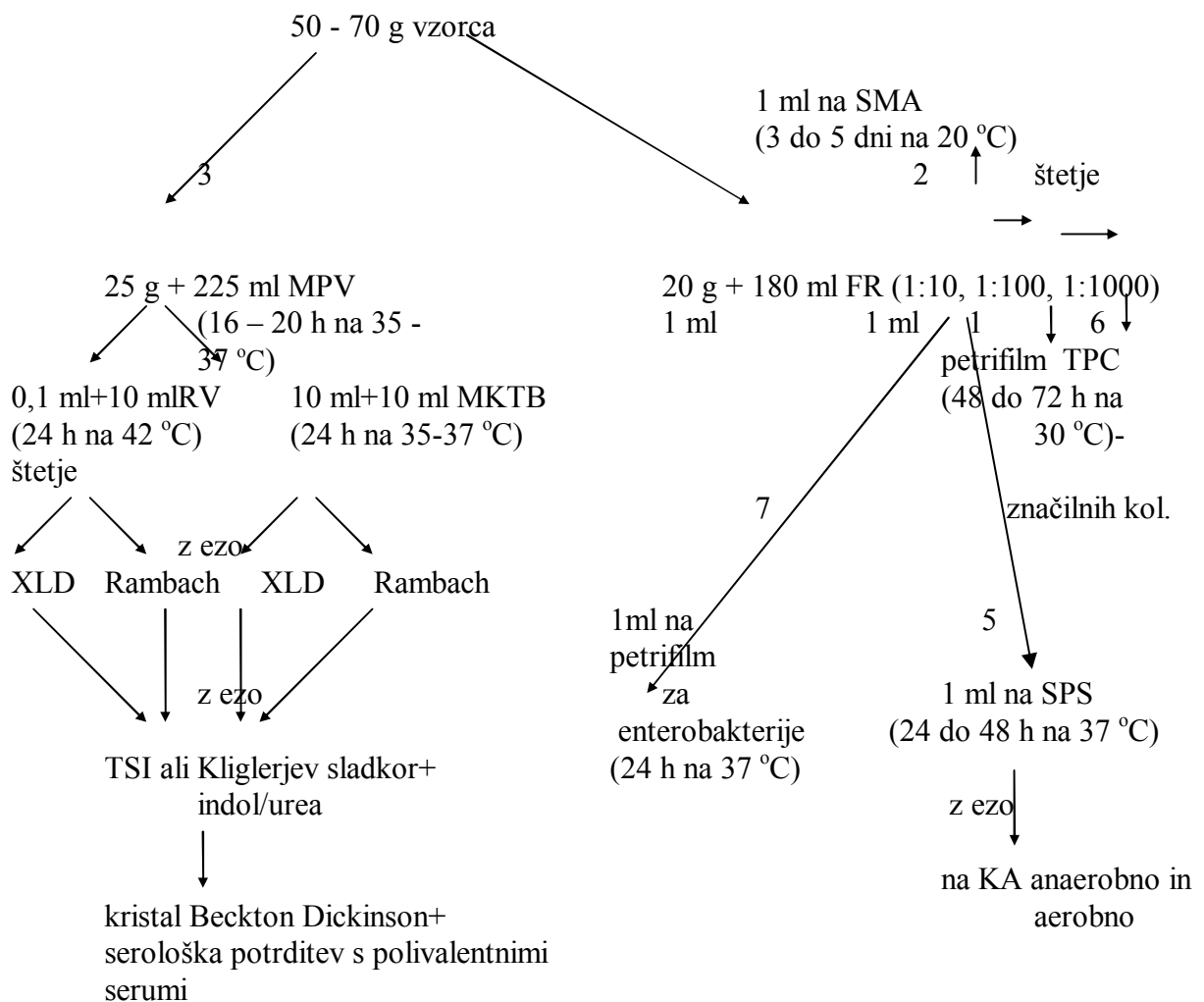
### 2.4.3 Zelenjavni sok, zelenjavne omake in kečup

- ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov, plesni in kvasovk,
- ugotavljanje patogenih mikroorganizmov,
- normativi, katerim mora ustrezati so opredeljeni v tabeli (Smernice za MB varnost...2005)

Merila 8.5.

Živilo	SŠB	SŠP	Sal.	Enterobakterije	<i>E. coli</i>	<i>Stafil. aureus</i>	SRC
Paradižnikov kečup	1,0x10 <sup>3</sup>	10 v 1 g	Neg. v 25 g	Do 10/g	/	/	Do 10/g

SHEMA PRIPRAVE, OBDELAVE IN IDENTIFIKACIJE



Slika 2.6.  
Vir: Marčič, 2006.

Legenda:

- ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov (1) in plesni (2),
- ugotavljanje prisotnosti salmonel (3), sulfit. red. klostridijev (5), *E. coli* (6) in enterobakterij (7).

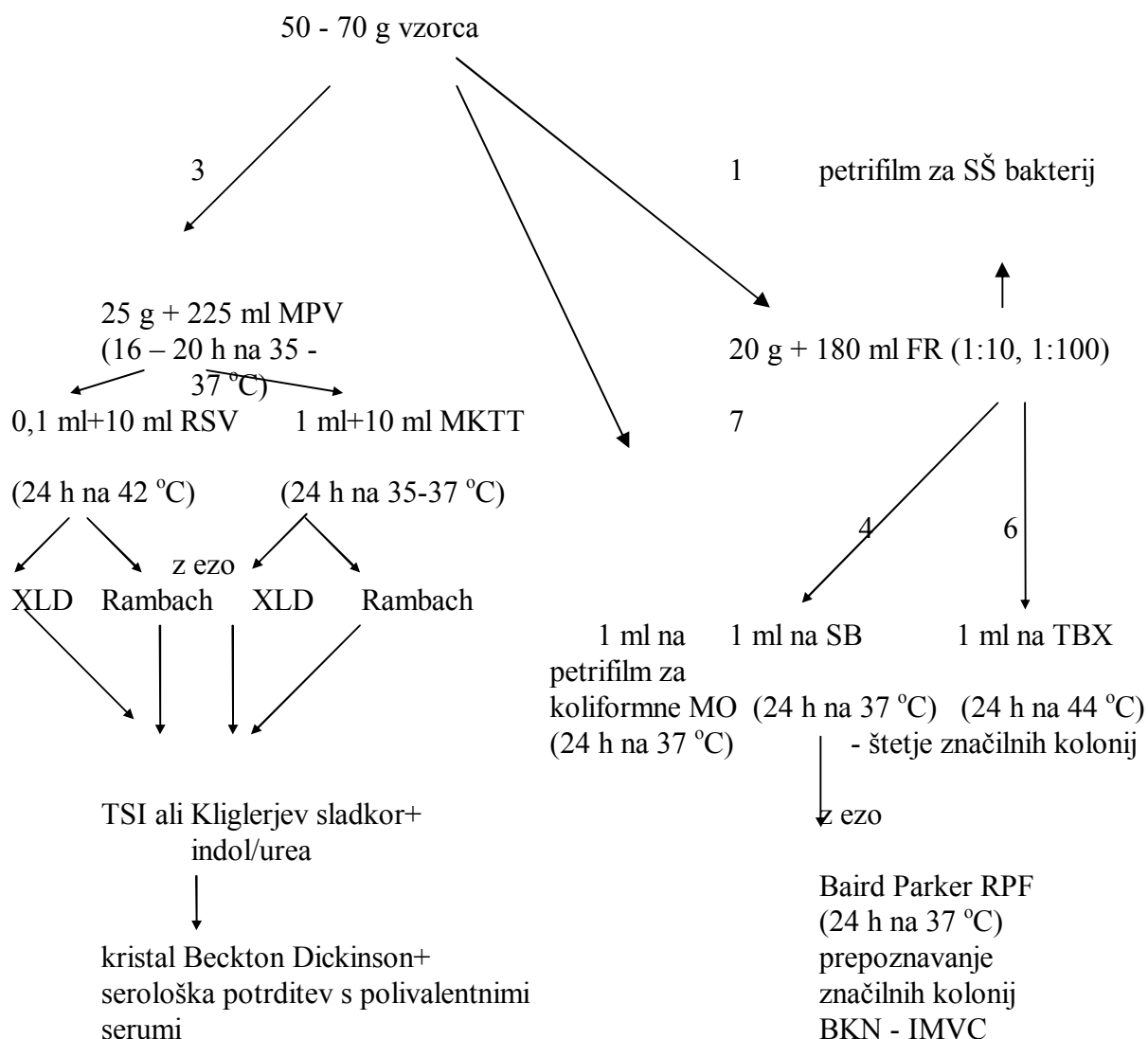
2.4.4 Kislo mleko, jogurt (tekoči fermentirani izdelki)

- ugotavljanje patogenih mikroorganizmov,
- normativi, katerim mora ustrezati so opredeljeni v tabeli (referenčni evropski kriteriji – International Food Hygiene, Vol.13, N 7- 2003 in v Smernicah za MB varnost...2005

Merila: 3.3.1 \* - kriteriji po evropskih smernicah

Živilo	SŠB*	SŠP	Sal.	Koliformni MO*	<i>E. coli</i>	Stafil.	LMO
jogurt	< 1000	< 10	Neg. v 25 g	< 10	Do 10 v 1 g	Do 10 v 1 g	Neg. v 25 g

### SHEMA PRIPRAVE, OBDELAVE IN IDENTIFIKACIJE



Slika 2.7.

Vir: Marčič, 2006.

- ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov (1) in plesni (2),
- ugotavljanje prisotnosti Salmonel (3), *S. aureus* (4), *E. coli* (6) in koliformnih MO (7).

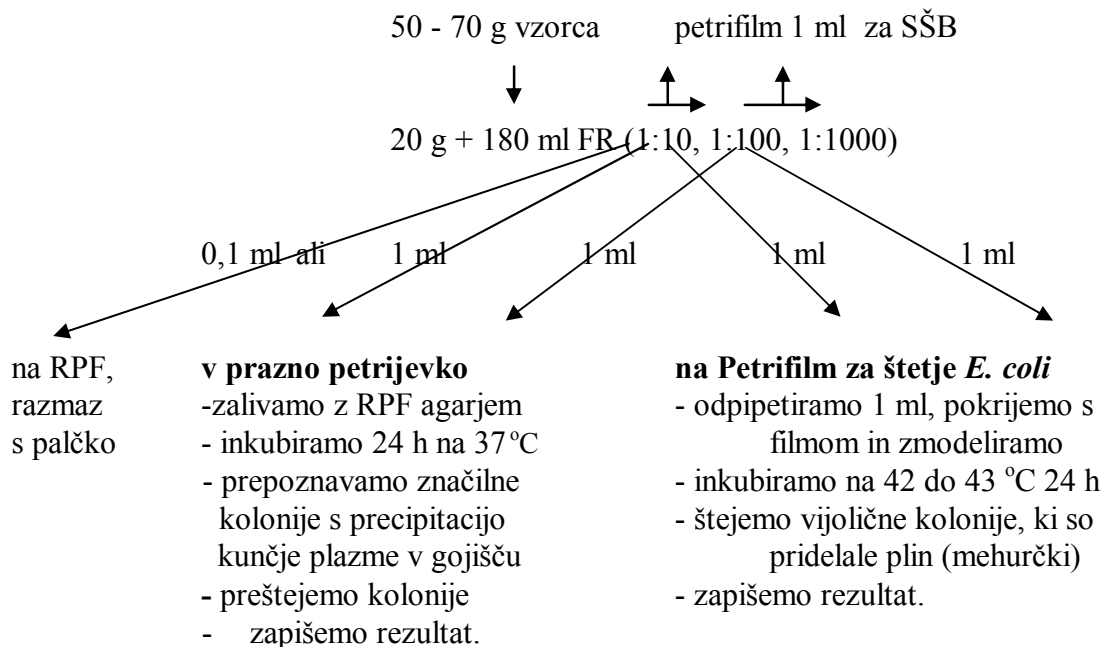
### 2.4.5 Sesekljano (zmleto) meso

- ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov,
- ugotavljanje patogenih mikroorganizmov,
- normativi, ki jim morajo izdelki ustrezati so opredeljeni v dokumentu Uredba komisije ES št. 2083/2005 o mikrobioloških merilih za živila in Smernice za MB varnost

Merila 3.3.1\* - kriteriji po evropskih smernicah

Živilo	SŠB*	SŠP	Sal.	Koliformni MO*	<i>E. coli</i>	Stafil.	LMO
jogurt	< 1000	< 10	Neg. v 25 g	< 10	Do 10 v 1 g	Do 10 v 1 g	Neg. v 25 g

#### SHEMA PRIPRAVE OBDELAVE IN IDENTIFIKACIJE



Slika 2.8.

Vir: Marčič, 2006.

Ocenitev rezultatov:

1. **ustrezno**, če so vse ugotovljene vrednosti enake ali nižje od 3m, če je bilo štetje izvedeno na trdnem mediju;
2. **sprejemljivo**, če so vse ugotovljene vrednosti med 3m in 10m na trdnem gojišču in če je razmerje c/n enako ali manjše od 2/5,
3. **neustrezno**:
  - v vseh primerih, kjer so ugotovljene vrednosti večje od M,
  - kadar je  $c/n > 2/5$ .

V mikrobiološkem laboratoriju analiziramo vzorce živil, surovin, pitne vode in obdelujemo brise na čistočo delovnih površin, odvzete v obratu, na opremi, s pribora ter rok zaposlenih. Vzorce za mikrobiološko preiskavo pripravimo tako, da živila vzorčimo, glede na konsistenco s škarjami, žličko ali skalpelom, vzorec stehamo, homogeniziramo z dodatkom fiziološke raztopine, naredimo decimalne razredčine in izvedemo postopek nasajanja različnih bujonov in agarjev, kot zahteva standardna metoda (ISO) po kriterijih zakonodaje ali smernic. Delo poteka zmeraj v aseptičnih pogojih s sterilnim priborom. Preiskave potekajo 2 ali 3 dni, odvisno od časa inkubacije v posameznih stopnjah preiskave. Uporabljamo pribor in laboratorijsko steklovino ali plastične pripomočke za enkratno uporabo.

Dnevnik

Ime in priimek:

Vaje 2. del.

.....

1. Naloga: Priprava vzorcev živil za mikrobiološko preiskavo

Živilo: .....

Izvedba vzorčenja:

- Tehtanje: .....
- Priprava prve razredčine vzorca:.....
- Gnetenje: .....

2. Naloga: Priprava fiziološke raztopine in decimalnih razredčin

Živilo .....

Omejitev sk. št. bakterij po zakonodaji/smernicah.....

3. Naloga: Izvedba mikrobiološke preiskave živila po vzorčevalni skici:

- na osnovi zakonodaje ali smernic določite preiskovane parametre in primerno razredčino
- petrifilm za sk. št. bakterij in / ali agar za SŠB.....
- petrifilm za *E. coli* / koliformne bakterije.....
- petrifilm za enterobakterije.....
- slani bujon za stafilokoke.....
- nasajanje klostridijev v prazno petrijevko in zalivanje z agarjem SPS.....
- TBX- agar za *E. coli*.....
- ETGP in RPF gojišče za stafilokoke.....
- SMA agar za plesni in kvasovke.....

### 3 VAJE – III. DEL

#### 3.1 NALOGA 1: NADALJEVANJE KULTIVACIJE IN IDENTIFIKACIJE MIKROORGANIZMOV IZ PREDHODNIH VAJ

##### 3.1.1 Ugotavljanje skupnega števila bakterij

(SIST ISO 4833 – Splošno navodilo za ugotavljanje števila mikroorganizmov. Štetje kolonij pri 30°C.)

###### 3.1.1.1 Štetje kolonij na inkubiranih gojiščih za skupno število bakterij

Po inkubaciji s pomočjo opreme ali s prostim očesom preštejemo zrasle kolonije. Štejemo razredčine s 15 do 300 kolonijami. Pri štetju upoštevamo razredčitve in število petrijevok pri določeni razredčitvi. Uporabimo formulo:

$$N = \frac{\square C}{(n_1 + 0,1n_2) d}$$

kjer je :

- $\square C$  število prešteti kolonij na vseh ploščah,
- $n_1$  število petrijevok v prvi razredčitvi,
- $n_2$  število petrijevok v drugi razredčitvi,
- $d$  faktor razredčitve za prvo razredčitev.

Rezultat izrazimo kot število mikroorganizmov na ml ali na g preiskovanega vzorca v obliki števila 1,0 do 9,9 pomnoženo z  $10^x$ , kjer je  $x$  ustrezna razredčitev.

##### 3.1.2 Horizontalna metoda za štetje $\beta$ -glukoronidaza-pozitivne *Escherichie coli* –

Po ISO 16649-2: 2001 in modifikacije

Metoda je števna pri  $T = 44\text{ }^\circ\text{C}$  na trdnem gojišču, ki vsebuje kromogeni dodatek za ugotavljanje pridelave encima  $\beta$ -glukoronidaza.

###### Definicije in izrazi:

$\beta$ -glukoronidaza pozitivna *E. coli* je bakterija, ki pri  $44\text{ }^\circ\text{C}$  formira tipične modre kolonije na TBX agarju (triptonski, žolčni, glukoronidni agar). Gojišče pripravimo po navodilih na zavitku.

###### Princip in postopek:

S sterilno pipeto prenesemo 1 ml testnega vzorca ( $10^{-1}$ ) v dve prazni petrijevki. Za vsako razredčino uporabimo dve petrijevki. V vsako petrijevko razlijemo pribl. 15 ml gojišča, ohlajenega na  $44\text{ }^\circ\text{C}$ . Previdno premešamo z inokulumom in pustimo, da se strdi. Petrijevke obrnemo in inkubiramo na  $44\text{ }^\circ\text{C}$ , ne dalj kot 24 h.

Posebnost:

Poškodovane celice potrebujejo začetno inkubacijo za 4 h na 37 °C in nato nadaljevanje inkubacije na 44 °C.

Štetje kolonij na inkubiranih gojiščih:

Po inkubaciji preštejemo tipične modro-zelene kolonije. Štejemo razredčine s 15 do 300 kolonijami. Pri štetju upoštevamo razredčitve in število petrijevk pri določeni razredčitvi. Za plošče, ki vsebujejo najmanj 15 tipičnih kolonij, uporabimo formulo, kot pri postopku štetja skupnega števila bakterij.

3.1.2.1 Sajenje kratke biokemijske vrste IMVC + urea

Tabela 3.1:

enterobakterija	indol	MR	VP	SC	urea	H <sub>2</sub> S
<i>E. coli</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Proteus sp.</i>	V	+	v	v	+	v
Salmonela	-	+	v	+	-	+

MR – metilno rdeče, VP – Voges Proskauer, SC- Simonsov citrat,  
V - variabilno

**3.1.3 Gojišča in ugotavljanje prisotnosti koagulaza pozitivnih stafilokokov (*S. aureus-a*)**

Po SIST EN ISO 6888-1, 6888-2 in referenčni metodi s slanim bujonom.

1. **Slani bujon - SB**, je bujon, ki se uporablja za selektivno namnoževanje in izolacijo *S. aureus* iz živil, vode in mlečnih proizvodov. Pripravimo ga po navodilih proizvajalca ter avtoklaviramo raztočenega v epruvete po 9 ml. Vsebuje 7,5 % NaCl, kar inhibira rast vseh mikroorganizmov, razen stafilokokov. Preiskovano razredčino nasadimo v SB in inkubiramo 24 do 48 ur na 37 °C. Medij vsebuje manit kot edini fermentabilni ogljikovodik in fenolno rdeče kot pH indikator. *S. aureus* kaže produktivno rast po 24 urah, s spremembo barve gojišča v rumeno. *S. epidermidis* raste brez spremembe barve gojišča. Epruvete s pozitivnim predhodnim testom (sprememba barve gojišča v rumeno) nasadimo na trdo gojišče s kunčjo plazmo (RPF) ali Baird Parker ETGP agar.
2. **RPF medij** inkubiramo na 37 °C 24 ur. Pripravimo ga po navodilih proizvajalca (glej navodila za pripravo gojišča Biokar Diagnostics) in raztočimo v petrijevke. *S. aureus* predstavljajo sive ali črne kolonije obkrožene s prozorno cono, ki je zaključena z motnim prstanom fibrina. Rezultata ni potrebno potrjevati s testom koagulaze v epruvetah.

Nova metodologija ugotavljanja in izolacije koag. poz. stafilokokov predvideva nasajanje zahtevanih razredčin za posamezna živila v prazne petrijevke in zalivanje s tekočim RPF agarjem ob predhodnem dodatku RPF (rabbit plasma fibrinogen). Ta metoda je vzporedno tudi kvantitativna, saj omogoča štetje značilnih kolonij v trdnem mediju iz določene razredčitve.

### 3.1.4 Uporaba SPS agarja za izolacijo in štetje vegetativnih celic *Clostridium perfringens* ter *Clostridium botulinum* iz vseh vrst živil

Po ISO 7937 – modifikacija po Angelottiju

SPS agar (sulfite polymyxin sulfadiazine agar) vsebuje širok spekter hranil. Večina klostridijev reducira sulfit do sulfida, ki reagira z železovim citratom, kar se vidi v črni barvi kolonij. Ostali sulfit reducirajoči mikroorganizmi se inhibirajo s polimiksinom in sulfadiazinom.

**Sajenje in inkubacija:** v epruveto odpipetiramo 1 ml ustrezne razredčine zalijemo do 1/3 s SPS agarjem (47 °C - ustrezna temperatura, da ne uničimo vegetativnih celic) ter pustimo, da se agar strdi, nato dolijemo agar do vrha epruvete. Inkubiramo 24-48 h na 37 °C.

**Štetje kolonij:** v petrijevko odpipetiramo 1 ml ustrezne razredčine zalijemo s SPS agarjem (47 °C - ustrezna temperatura, da ne uničiš vegetativnih celic) ter s krožnimi gibi premešamo, nato pustimo, da se agar strdi. Petrijevke v anaerobnih pogojih inkubiramo 24-48 h na 37 °C.

Klostridiji rastejo kot črne kolonije. Potrebni so še nadaljnji testi za identifikacijo kot pri metodi s sulfitnim agarjem.

### 3.1.5 Gojišča, uporabljena pri ugotavljanju prisotnosti salmonel (priprava in uporaba) po (ISO 6579:2002). Horizontalna metoda za ugotavljanje prisotnosti *Salmonella* spp.

**Puferirana (moderirana/modificirana) peptonska voda (MPV)-** neselektivna predobogatitev salmonel v vzorcih živil in voda

- priprava gojišča je na embalaži proizvajalca gojišč; raztopina se avtoklavira pri 121 °C, 20 minut,
- za živila odtehtamo 25 g vzorca (ali drugo odtehto, če narava vzorca to zahteva) v sterilne vrečke in dodamo aseptično 225 ml MPV (oz. v razmerju 1:10) ter homogeniziramo v gnetilniku. Inkubiramo 18 ur na 37 °C (priporočilo ne < 16 in ne > 20 h),
- po inkubaciji dodamo po 0,1 ml v **RVS** in po 10 ml v **MKTT**.

**Rappaport Vassiliadis sojin bujon (RVS)** - je selektivni bujon za obogatitev za ugotavljanje salmonel iz živil, okolja in kliničnega materiala

- pripravlja se po proizvajalčevih navodilih; avtoklavira se raztočena v epruvete po 10 ml,
- 0,1 ml predhodno inkubiranega vzorca dodamo 10 ml RVS, predhodno ogretega na 43°C in inkubiramo pri 41,5 °C (± 1 °C) 24 h (± 3 h).

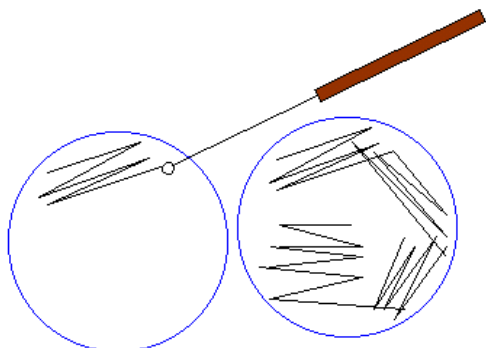
**Mueller Kauffmann Tetrationsat bujon (MKTT)** - je obogatitveni bujon za izolacijo salmonel iz živil in krmil

- pripravlja se po navodilih na embalaži certificiranega proizvajalca; se ne avtoklavira, dodaja se selektivni dodatek novobiocin,
- 1 ml predhodno inkubiranega vzorca prenesemo v 10 ml MKTT in inkubiramo 24 h na 37 °C.

Po inkubaciji s cepilno zanko presadimo vzorce iz obeh selektivnih gojišč na trdna gojišča:

4. **XLD** - Xilose Lysine Desoxycholate Agar ali **XLT-4** - Xilose Lysine Tergitol Agar in
5. **Rambach** agar (kromogeno selektivno gojišče).

Izberemo po dve gojišči. Gojišča pripravimo po proizvajalčevih navodilih. Gojišča v ploščah nasadimo z tremi ali štirimi zankami.



Slika 3.1: Sajenje plošč s štirimi zankami

Vir: [http://openwetware.org/images/5/55/Streak\\_plates.png](http://openwetware.org/images/5/55/Streak_plates.png)

Po inkubaciji na 37 °C, 24 h ( $\pm$  3 h) izberemo značilne kolonije, ki jih nasadimo na **Kliglerjev dvojni sladkor (6)** in **ureo-indol medij (7)** ter inkubiramo na 37 °C 24 ur. Po inkubaciji ugotavljamo značilnost poraslega gojišča v epruveti. Tipične salmonele kažejo alkalno / rdeče obarvano reakcijo poševnika s pridelkom plina in črn stebriček (formacija vodikovega sulfida). Ureaza z indolom kaže negativno / neobarvano reakcijo. Za netipične ali dvomljive teste na KDS uporabimo Cristal – komercialno dosegljivo galerijo biokemijskih testov (Becton Dickinson).

Tipične stebričke na Kliglerjevem sladkorju pregledamo z uporabo O- somatskih antiserumov. Na predmetnici rahlo zmešamo kapljico antiseruma s preiskovano kulturo (s cepilno zanko) ter počakamo pojav izkosmičenja. Reakcijo imamo za pozitivno, ko se po nekaj trenutkih pojavijo kosmiči.

### **MODIFICIRANA ISO 6579 metoda -**

Po inkubaciji v MPV na 37 °C se prenese 0,1 ml gojišča na **poltekoči MSRV (Modified semi-solid Rappaport Vassiliadis)** medij z novobiocinom (Biocar) in inkubira na 42,5 do 43 °C. Po 24 urah se ugotavlja sprememba turkizno zelene prozorne barve gojišča. Sumljive so plošče, ki kažejo opalno turkizni sij okoli inokuliranega vzorca. Sij ne sme biti manjši od 2 cm v premeru. Sumljive vzorce nasadimo na dvojni sladkor po **Kliglerju** in **ureo**. Sadimo iz roba gojišča. Nadaljnji postopek je opisan zgoraj.

#### **3.1.6 Uporaba kristala Becton Dickinson za identifikacijo enterobakterij, g - pozitivnih bakterij ter anaerobov**

V pripravljenem kitu (setu) Crystal BD se nahaja **sledječ material**:

1. kiveta z vdolbinami za razlivanje inokuluma ter pivnik,
2. kiveta (kristal) z že pripravljenimi gojišči (substrat) za ugotavljanje biokemijske aktivnosti,
3. epruvete s fiziološko raztopino (F.R.) za pripravljane inokuluma preiskovane kulture.



Slika 3.2: Diagnostični testni pripomoček Crystal

Vir: [wonderworkerdistributors.com/catalogue.html](http://wonderworkerdistributors.com/catalogue.html)

Postopek **priprave** kristala je sledeč:

1. Kiveto z gojišči vzamemo iz papirne folije. Uporabimo v 1h.
2. Vzamemo epruveto z F.R. in označimo vzorec, ki ga preiskujemo. Ob uporabi aseptične tehnike pobere enake kolonije z agarja in jih razmešamo v F.R. Uporabimo mešalo - pribl. 15 sekund.
3. Vzamemo bazno kiveto - rjavo in jo označimo s številko vzorca.
4. Vsebino epruvete / inokuluma zlijemo v pripravljen bazenček ter s krožnimi gibi inokulum enakomerno razporedimo po vdolbinah kivete. Ostanek suspenzije zberemo v ciljnem bazenčku s pivnikom.
5. Zgornji del kivete – bel, pritisnemo v spodnji s klikom. Izogibamo se mehurčkom, ker motijo odčitavanje.
6. Kristale inkubiramo, glede na uporabljen tip pri ustrezni temperaturi z večjimi okni navzgor.
7. Odčitavamo jih v 30 minutah od končane inkubacije.

### **3.2 NALOGA 2: STANDARDNE METODE ZA BAKTERIOLOŠKI PREGLED PITNE VODE**

V objektih za proizvodnjo in promet živil se vzorec pitne vode odvzame na mestu, kjer voda vstopa v območje proizvodnje in prometa živil. Odvzem, konzerviranje, transport in hranjenje vzorca morajo potekati tako, da se ohrani enaka kakovost vzorca do začetka preiskave (**SIST ISO 5667-5: Navodilo za vzorčenje pitne vode in vode, ki se uporablja pri predelavi hrane in pijač – v Pravilnik o pitni vodi UL RS 19 in 35/2004**).

Vzorci vode se odvijajo iz notranjih ali zunanjih pip, čim bližje rezervoarju. Pred odvzemom vzorca pustimo vodo teči 2 do 3 minute, da se omrežje prečisti morebitne zastale vode. Da se izognemo sekundarni kontaminaciji, pipe pred vzorčenjem steriliziramo (ožgemo s plamenom ali obrišemo s kosom vate, namočenim v etanol). Steklenico za vzorčenje odpremo, odvijamo curek vode (500 ml) ter sterilno zapremo. Danes so na voljo že priročni plastični sterilni kontejnerji za odvijanje vode, ki nam olajšajo transport. Kontejnerji že vsebujejo 0,3ml 5% raztopine Na-tiosulfata za nevtralizacijo zaostalega (rezidualnega) klora v pitni vodi (samo, če je voda klorirana). Čas transporta v laboratorij ne sme presegati 6 do 8 ur, če transportna embalaža ni hlajena.

Vzorci vode v obratu odvijamo v skladu z monitoringom bakteriološke kontrole, ki ga izdelajo tehnologi (nosilci dejavnosti) skupaj z uradnim veterinarjem (velja za živilske obrate predelave živil živalskega izvora).

Nova zakonodaja obvezuje le pregled dveh parametrov: prisotnost *E. coli* in enterokokov v 100 ml vode. Standardni bakteriološki pregled pitne vode pa je sestavljen iz dveh tipov kontrol. Parametre, ki jih preiskujemo, mejne vrednosti ter količino preiskanega vzorca nam prikazuje tabela:

Tabela 3.2: Občasne preiskave pitne vode

Parameter	Vrednost	Enota/količina vzorca
<i>E. coli</i>	0	Število/100 ml ali MPN/100 ml
Fekalni streptokoki (enterokoki)	0	Število/100 ml ali MPN/100 ml
<i>Clostridium perfringens</i>	0	Število/100 ml
Skupne koliformne bakterije	0	Število/100 ml ali MPN/100 ml
SŠ MO pri 22 °C	manj kot 100	Število/1 ml
SŠ MO pri 37 °C	Manj kot 100	Število/1 ml

Vir: Prirejena tabela bivše zakonodaje

Za *E. coli*, koliformne bakterije in enterokoke najprej ugotavljamo prisotnost v nizu epruvet (1x 50 ml + 5 x 10 ml), po potrdilnem testu pa na osnovi posebnih računskih tablic določamo verjetno število klic v 100 ml vode (MPN – most probable number).

**Gojišča** uporabljena pri standardnih metodah za bakteriološki pregled pitne vode:

***E. coli*** - MacConkey bujon z Durchamovimi cevkami - MacConkey agar

**Koliformni MO** – MCA bujon - MA agar

***Clostridium perfringens*** – **DRCM** – clostridien differential bujon,

**Fekalni streptokoki** - kanamicin eskulin azidni bujon - kanamicin eskulin azidni agar,

**SŠ MO** – petrifilmi za SŠ bakterij.

### 3.2.1 Metoda membranske filtracije

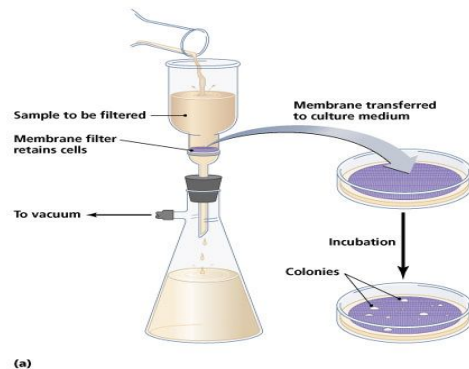
Membranska filtracija je metoda, ki nam omogoča štetje manjšega števila klic (*E. coli*, enterokokov) v določenem volumnu vode. Volumen vode (100 ml) filtriramo skozi membranski filter. To je poseben filtrirni papir s porami velikosti 0.45 µm, tako, da vsi preiskovani MO (fekalni koliformni MO / enterokoki) ostanejo na membrani. Membrano nato položimo na primerno gojišče za izolacijo fekalnih koliformnih (McA agar) mikroorganizmov ali enterokokov (Azid dekstrozni agar). Inkubiramo po ustaljenem postopku za koliformne MO in enterokoke. Med inkubacijo se na membrani pojavijo značilne kolonije, ki jih preštujemo (če so prisotne) in rezultat izrazimo kot število koliformnih MO ali enterokokov v 100 ml vode.

Oprema in pribor za membransko filtracijo

- Pinceta za membransko filtracijo – nosilec membrane,
- petrijevke z gojišči,
- naprava za filtracijo (plastična ali steklena),
- 5-ml ali 10-ml in 1-ml serološke pipete,
- črpalka,
- vakuumska črpalka,
- gorilnik, inkubator

### Postopek filtracije

1. Pripravimo vzorce vode, odvzete v sterilne kontejnerje ali erlenmajerice.
2. Pinceto razkužimo z etanolom in ožgemo. Aseptično položimo sterilno membrano v nastavek za membrane v napravi za filtracijo.
3. V čašo filtracijske naprave vlijemo določen volumen preiskovanega vzorca vode.
4. Vključimo vakuumsko ali ročno črpalko in pustimo, da se vsa vsebina prefiltrira.
5. Aseptično prenesemo membrano v petrijevko z ustreznim gojiščem. Poskušamo se izogniti nastajanju mehurčkov med površino membrane in gojišču.



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Slika 3.2: Postopek membranske filtracije pitne vode

Vir: [www2.bakersfieldcollege.edu/bio16/6\\_Nutrition...](http://www2.bakersfieldcollege.edu/bio16/6_Nutrition...)

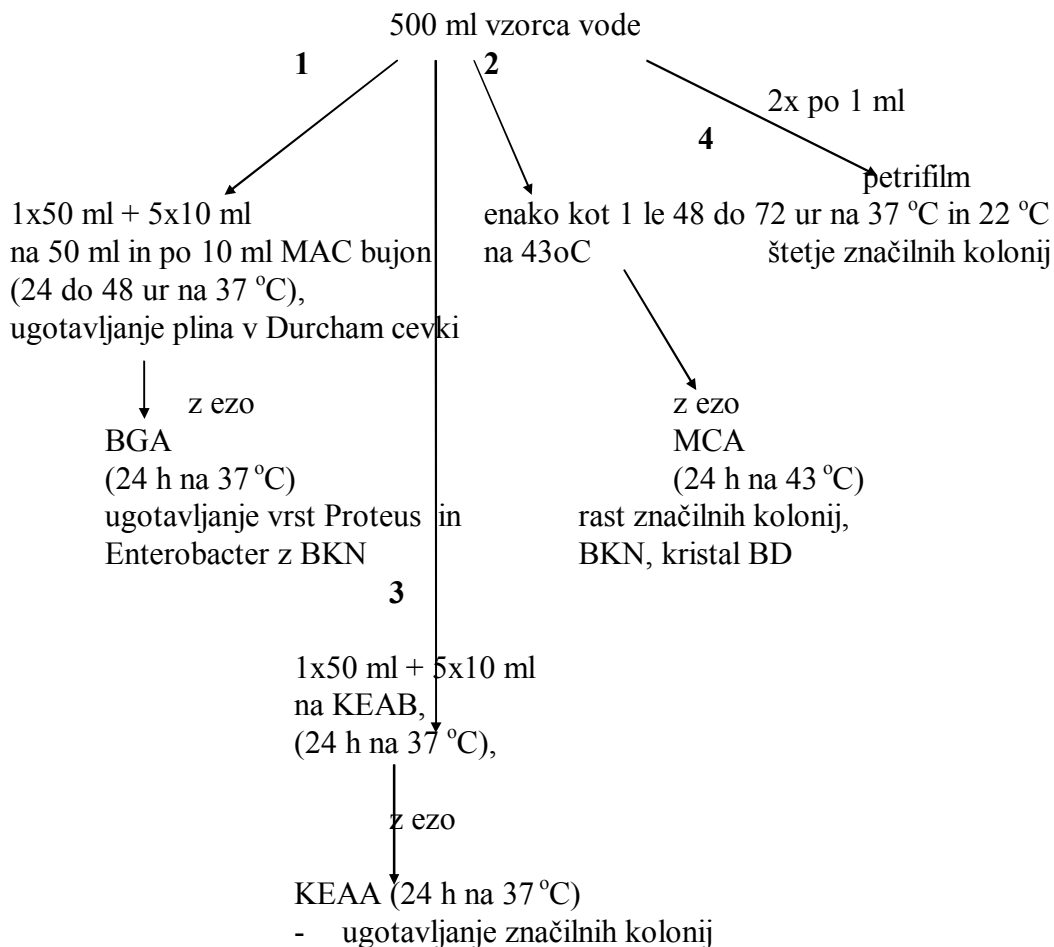
6. Za vsako skupino mikroorganizmov izberemo novo membrano (za koliformne, za enterokoke) in ponovimo postopek vstavljanja membrane in filtracije določenega volumna vzorca vode.
7. Pripravljene petrijevke z gojišči in membranami postavimo v inkubator na 43 °C ( $\pm 0.5$  °C in na 37 °C).
8. Po inkubaciji preštajemo značilne kolonije, zrasle na membrani in izrazimo rezultat kot število koliformnih MO / enterokokov v 100 ml vode.

### 3.2.2 Odvzemanje in metoda obdelave pitne vode po metodi MPV (most probable number)

- ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov,
- določanje najverjetnejšega števila koliformnih bakterij, *E. coli*, enterokokov

**Pribor:** epruvete za vodo s po 50 ml in 10 ml MaC bujona in KEA bujona, petrifilme za SŠB, pipete za 1 ml in 20 ml, gorilnik, košarice za epruvete, pisala za steklo.

- voda se odvzame v kontejner ali erlenmajerico volumna 500 ml iz predhodno ožgane pipe, po 2 do 3 minutah odtekanja



- ugotavljanje SŠB (4)
- ugotavljanje najverjetnejšega števila koliformnih bakterij (1), *E. coli* (2), enterokokov (3)

Vir: Marčič, 2006.

### 3.2.3 Metode za mikrobiološke preiskave vzorcev pitnih vod

#### Določanje najverjetnejšega števila *E. coli* (MPN – most probable number) po SIST ISO – 9308 - 2

Vzorec vode (1x50 ml, 5x10 ml) odpipetiramo v niz epruвет z dvojno koncentracijo **MacConkey bujona** (1x50 ml, 5x10 ml). Epruvete inkubiramo **24 do 48 ur na 43 °C**. Če po inkubaciji ugotovimo v epruветah prisotnost plina v Durchamovi cevki ter spremembo barve gojišča iz vijolične v rumeno (tvorba kislin), nasadimo take epruvete na **MacConkey agar** (potrditveni test). Sledi inkubacija plošč na **43 °C za 24 ur**. *E. coli* raste kot roza do vijolična kolonija s cono precipitiranih žolčnih soli.

Po potrditvenem testu iz števila pozitivnih epruвет, na podlagi posebnih statističnih tabel (ISO 8199), izračunamo najverjetnejše število *E. coli* v 100 ml vzorca vode.

#### Določanje najverjetnejšega števila koliformnih bakterij (MPN – most probable number)

## po SIST ISO – 9308 - 2

Vzorec vode (1x50 ml, 5x10 ml) odpipetiramo v niz epruвет z dvojno koncentracijo **MacConkey bujona** (1x50 ml, 5x10 ml). Epruvete inkubiramo **24 do 48 ur na 37 °C**. Če po inkubaciji ugotovimo v epruветah prisotnost plina v Durchamovi cevki ter spremembo barve gojišča iz vijolične v rumeno (tvorba kislin), nasadimo take epruvete na **briljantno zeleni (BG) agar** (potrditveni test). Sledi inkubacija plošč na **37 °C za 24 ur**.

Po potrditvenem testu iz števila pozitivnih epruвет, na podlagi posebnih statističnih tabel (ISO 8199), izračunamo najverjetnejše število koliformnih bakterij v 100 ml vzorca vode.

### **Določanje skupnega števila mikroorganizmov pri 22 °C po SIST ISO 6222**

1 ml vzorca vode odpipetiramo na petri film za skupno število bakterij. Petri film inkubiramo 48 do 72 ur na 22 °C. Po inkubaciji preštujemo značilne kolonije.

### **Določanje skupnega števila mikroorganizmov pri 37 °C**

1 ml vzorca vode odpipetiramo na petri film za skupno število bakterij. Petri film inkubiramo 48 do 72 ur na 37 °C. Po inkubaciji preštujemo značilne kolonije.

### **Gojišča, uporabljena pri ugotavljanju prisotnosti enterokokov (fekalnih streptokokov) - priprava in uporaba**

**Kanamycin eskulin azidni - KEAB ali Azid dekstrozni bujon**, je bujon, ki se uporablja za selektivno namnoževanje in izolacijo enterokokov iz živil, vode in mlečnih proizvodov. Pripravimo ga po navodilih proizvajalca ter avtoklaviramo. Po metodi Mossel, Harewijn in Elzebroek se priporoča 1. gojišče, ker prisotni fekalni streptokoki obarvajo bujon črno (hidroliza eskulina). Omenjeni avtorji priporočajo pripravo decimalnih razredčitev vzorca (1 g : 9 ml FR.....), nato pa sajenje razredčitev po 1 ml v 9 ml omenjenega bujona. Opazuje se nastanek črnenja bujona, kar imamo za pozitivni poprejšnji test.

Pri zahtevah kontrole streptokokov v večji količini živila, zatehtamo 25 g preiskovanega vzorca in dodamo 225 ml ADB oz. KEAB. Inkubiramo pri 37 °C 24 h. Nato precepljamo na Kanamicin eskulin azidni agar.

**Kanamycin eskulin azidni agar - KEAA** je agar za selektivno izolacijo enterokokov. Principi delovanja so enaki reakcijam v bujonu. Pozitivne poprejšnje teste (črnenje bujona) nasadimo na KEAA, inkubiramo za 24 h pri 37 °C in odčitavamo rezultate. Kolonije, obkrožene s črnim sijem lahko imamo za fekalne streptokoke, brez nadaljnjih biokemijskih testov.

Pri pripravi obeh vrst gojišč je pomemben dodatek kanamicinsulfata (1 ampula na 500 ml OXOID), pred avtoklaviranjem.

### 3.3 NALOGA 3: ODVZEMANJE IN METODA OBDELAVE BRISOV IZ STROJNE OPREME, DELOVNIH POVRŠIN IN ROK ZAPOSLENIH

#### Vzorčenje:

V primerih, kjer pričakujemo ostanke dezinfekcijskega sredstva, površine testiramo dve uri po dezinfekciji, najbolje če so suhe. Kot nevtralizator dezinfekcijskega sredstva lahko uporabljamo Tween 80 (30 g/l) ali lecitin (3 g/l) v obliki dodatka razredčevalnemu sredstvu (FR) v laboratorijskem delu .

#### 3.3.1 Kontaktna metoda

Če uporabljamo **Hygicult ploščice** (Orion Diagnostica) ali kontaktne agarske pripomočke drugih proizvajalcev, pritisnemo površino agarja močno na površino, ki jo želimo testirati. Izogibamo se rotiranja ali striženja ploščice. Po uporabi ploščico ustrezno označimo in sterilno zapremo v kontejner, ki je sestavni del pribora. Transportiramo v najkrajšem času (do 4 ure) v hladilni torbi v laboratorij.



Slika 3.6: Odvzemanje odtisa s pomočjo Hygicult ploščice

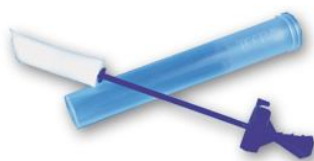
Vir: <http://www.geng-hygiene.com/images/phaluffry9p.gif>

#### 3.3.2 Metoda brisov po Kelchu (modificirana)

Za odvzemanje brisov s površin in opreme uporabljamo **vatne brise**, z navitkom 3 cm, potopljene v 9 ml fiziološke raztopine. Bris odvijemo iz epruvete in odvečno tekočino z rotirajočim pritiskanjem ob steno epruvete odstranimo z navitka. Bris položimo vodoravno na površino ter s polkrožno rotacijo obrišemo površino 9 cm<sup>2</sup>, nato bris zavrtimo za 180 ° in obrišemo isto površino z drugo stranjo navitka. Bris položimo v epruveto s F.R. Vzorce transportiramo v hladilni torbi kakor hitro je mogoče (v 4 urah) v laboratorij.

- ugotavljanje skupnega števila mikroorganizmov,
- ugotavljanje stafilokokov, enterokokov in *E. coli*

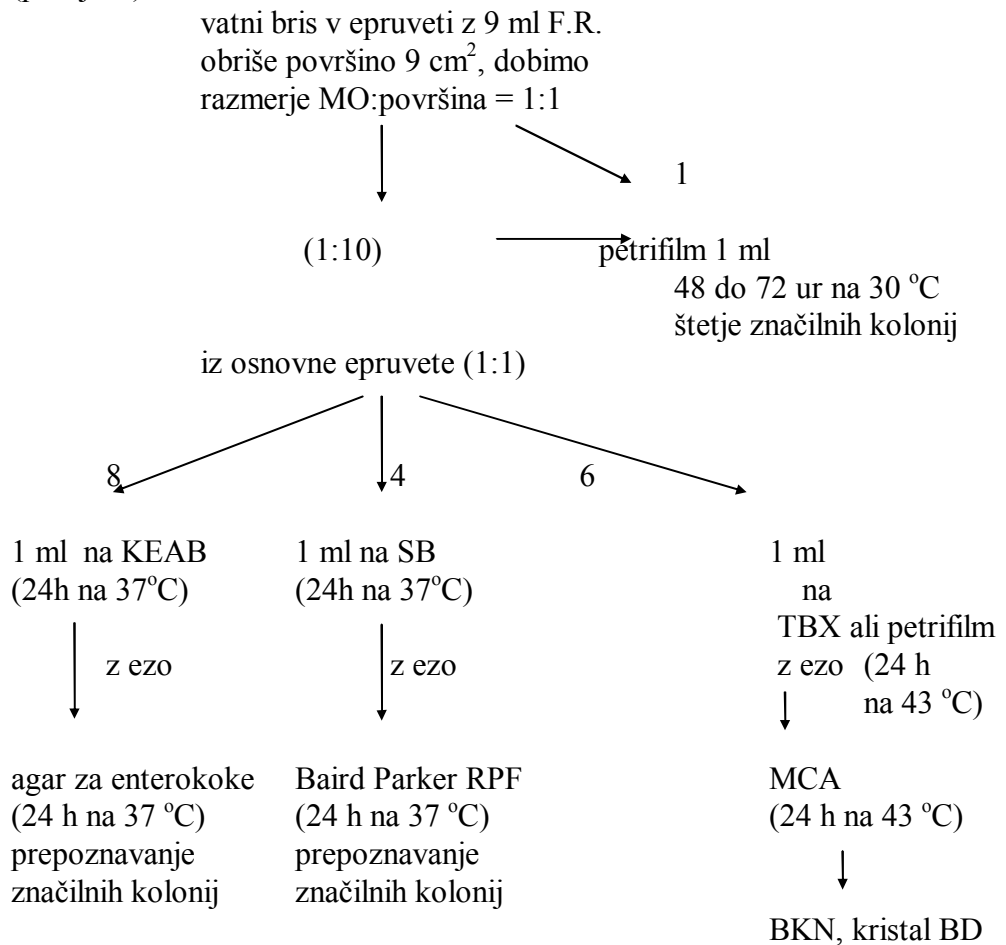
**Pribor:** Vatni brisi – modificirani v 9 ml F.R., petrifilmi za SŠB in *E. coli*, slani bujon – stafilokoki, KEAB – enterokoki, MCB – *E. coli*, gorilnik, pipete po 1 ml, stojalo za epruvete, pisala za steklo, pripomočke za odvzemanje odtiskov.



Slika 3.7: Vatni bris

Vir: [http://www.tecra.net/\\_data/page/156/ENVIROSWAB.jpg](http://www.tecra.net/_data/page/156/ENVIROSWAB.jpg)

SHEMA ODVZEMANJA, OBDELAVE IN IDENTIFIKACIJE  
(prirejena)



- ugotavljanje SŠB (1),
- ugotavljanje prisotnosti koagulaza pozitivnih stafilokokov (4), *E. coli* (6), in fekalnih streptokokov (8).

Vir: Marčič, 2006

POVZETEK

V mikrobiološki analizi živil uporabljamo postopke štetja in ugotavljanja prisotnosti mikroorganizmov, ki so se razvili na umetnih substratih (gojiščih). V sodobni analizi se vedno bolj uveljavljajo postopki štetja, ki so standardizirani. Z analizo želimo ugotoviti, ali živilo/surovina zadovoljuje kriterije, navedene v zakonodaji ali smernicah, ali je obstojno, glede na določene roke obstojnosti, ali je higiensko in ali je varno (prisotnost patogenih bakterij). Metode vključujejo tudi diagnostične postopke, kjer z reagenti ali na osnovi vgrajenih indikatorjev v gojiščih prepoznavamo biokemijske in fiziološke lastnosti preiskovanih mikroorganizmov, na osnovi katerih jih lahko potrdimo ali ne.

Dnevnik

Ime in priimek:

Vaje 3. del.

.....

1. Naloga:

a). določanje SŠB v preiskovanem živilu

$$N = \frac{\square C}{(n_1 + 0,1n_2) d} = \text{petrifilm} \dots\dots\dots$$
$$= \text{agar} \dots\dots\dots$$

kjer je :

- $\square C$     število prešteti kolonij na vseh ploščah,
- $n_1$     število petrijevk v prvi razredčitvi,
- $n_2$     število petrijevk v drugi razredčitvi,
- $d$     faktor razredčitve za prvo razredčitev

Izračun:    agar     $N =$  \_\_\_\_\_

petrifilm     $N =$  \_\_\_\_\_

- b). ugotavljanje prisotnosti: *označi s križcem*
- *E. coli*.....
  - Enterobakterij.....
  - Salmonel.....
  - Koagulaza pozitivnih stafilokokov.....
  - *Clostridium perfringens*.....
  - SŠ plesni.....
  - SŠ bakterij.....
- c). biokemijska vrsta pri enterobakterijah
- iz gojišča / bujonske kulture.....
- d). nasajanje kristala Becton Dickinson
- iz gojišča / bujonske kulture.....
- e). nasajanje agarških plošč:.....
- .....



## 4 VAJE – IV. DEL

### 4.1 NADALJEVANJE MIKROBIOLOŠKE PREISKAVE ŽIVIL, PITNE VODE IN BRISOV

- izvedba biokemijskih analiz vzorcev živil in potrditveni testi za posamezne vrste mikroorganizmov – glej vzorčevalne skice,
- interpretacija rezultatov mikrobioloških preiskav živil – glej normative na VS.

### 4.2 NALOGA 1: MIKROSKOPIRANJE

**Svetlobni mikroskop:** sestavljen iz optičnega in mehničnega dela. Optični del sestavljajo okular, objektiv, kondenzor, zaslonka, filter in vir svetlobe. Mehanični del sestavljajo stojalo s tubusom, ki ima na enem koncu okular na drugen pa revolver z objektiv, makrometrski in mikrometrski vijak, kondenzorjev vijak in mizico za objektiv. Glede na to, kakšne vrste objektiv in kondenzor uporabljamo, govorimo o mikroskopiranju v svetlem polju, v temnem polju, s faznim kontrastom in s fluorescentnim mikroskopom.

**Mikroskopiranje v svetlem vidnem polju:** s kombinacijami različnih okularjev in objektivov lahko sliko različno povečamo – najpogosteje 10x, 40x in 100x. Povečava je označena z arabskimi številkami na vsakem okularju in objektivu. Običajne povečave okularjev so 3x, 6x, 10x in 15x, običajne povečave okularjev pa 10x, 40x in 100x.

Glede na način uporabe razlikujemo suhe (majhne povečave) in imerzijske objektivne (velike povečave).

**Priprava mikroskopskih preparatov:** pri ugotavljanju morfoloških značilnosti mikroorganizmov opazujemo njihovo obliko, velikost, grupiranje, razporeditev bičkov in spor, prisotnost kapsul ter kako se obarvajo z različnimi barvili. Opazujemo jih v **mikroskopskih preparatih**, ki jih pripravimo na predmetnem steklu, ki mora biti popolnoma čisto. Poznamo nativne in obarvane mikroskopske preparate.

Nativni mikroskopski preparati: gledamo žive, neobarvane mikroorganizme, največkrat bakterije. Opazujemo njihovo gibanje, velikost, obliko in razporeditev. Poznamo dve obliki nativnih preparatov: pokrito kapljico in visečo kapljico.

Obarvani mikroskopski preparati: mikroorganizme obarvamo zato, da jih lažje opazujemo, predvsem kadar ugotavljamo njihovo obliko in delitev po Gramu. S specialnimi barvanji ugotavljamo ustvarjanje kapsul, spor, bičkov ali drugih celičnih struktur (Bole in Hostnik, 1996).

#### 4.2.1 Navodilo za izvedbo vaje

**Pribor za nativne preparate:** suspenzija preiskovane čiste kulture mikroorganizmov, predmetno stekelce, pokrovno stekelce, sadilne zanke in svetlobni mikroskop.

Pokrito kapljico pripravimo tako, da kanemo kapljico suspenzije oz. tekočega gojišča z mikroorganizmi na predmetnico in pokrijemo s pokrovnico.

Za visečo kapljico potrebujemo posebno predmetnico, ki je v sredini vdolbena. Kapljico z mikrobi kanemo na pokrovnico. Okrog vdolbine na predmetnici namažemo vazelin in predmetnico z vdolbino položimo na pokrovnico, tako, da je kapljica v vdolbini. Hitro obrnemo, da kapljica s pokrovnice prosto obvisi v vdolbino predmetnice.

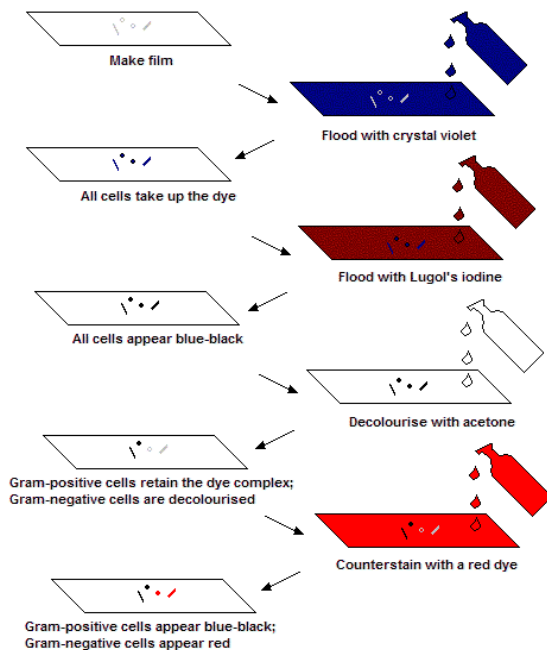
**Pribor za obarvane preparate:** Suspenzija preiskovane kulture mikroorganizmov, predmetno stekelce, sadilne zanke, barvila za barvanje po Gramu, stojalo za predmetnice, krep papir, cedrovo olje, svetlobni mikroskop, 40% alkohol.

Najprej pripravimo razmaz, v katerem so mikroorganizmi.

- Razmaz s tekočih gojišč pripravimo tako, da s cepilno zanko prenesemo nekaj kapljic na predmetno steklo in tekočino zelo tanko razmažemo.
- Razmaz s trdnih gojišč pripravimo tako, da v kapljici F.R. suspendiramo (razmešamo) mikroorganizme iz gojišča in nato pripravimo čim tanjši razmaz.

Razmaz pustimo, da se posuši na zraku. Suh razmaz fiksiramo s toploto – s pinceto potegnemo predmetnico 3 do 4x čez plamen .

**Barvanje po Gramu** je oblika sestavljenega barvanja, [http://www.youtube.com/watch?v=OO6C-gj\\_UHM](http://www.youtube.com/watch?v=OO6C-gj_UHM), <http://video.google.com/videoplay?docid=-1207145583242274630>, kjer uporabljamo razne vrste barvil, da dosežemo razlikovanje med G+ in G- bakterijami – bakterije se obarvajo rdeče ali temno vijolično. Do razlik v barvanju prihaja zaradi različne kemijske sestave celične stene in različne dovzetnosti stene za barvila. Gramsko pozitivne bakterije se obarvajo z genciansko vijoličnim barvilom in jih etanol ne razbarva. Tudi gramsko negativne bakterije se najprej obarvajo z genciansko vijoličnim barvilom, vendar jih zaradi drugačne zgradbe stene etanol razbarva in se naknadno s fuksinom obarvajo rdeče.



Slika 4.1: Priprava predmetnice za barvanje po Gramu in potek barvanja

Vir: [www.bmb.leeds.ac.uk/.../flora/Gram.html](http://www.bmb.leeds.ac.uk/.../flora/Gram.html)

#### 4.2.2 Navodilo za potek barvanja

- razmaz posušimo na zraku in fiksiramo nad plamenom,
- razmaz pokrijemo s filtrirnim papirjem in prelijemo s karbolnim genciansko vijoličnim barvilom. Barvamo 2 do 3 minute,
- barvilo odlijemo in za 2 minuti prelijemo razmaz z lugolom,
- odlijemo lugol in razmaz za nekaj sekund prelijemo s 96% etanolom, toliko da se razbarva,
- speremo z navadno vodo,
- odlijemo vodo in prelijemo razmaz z 1% raztopino karbolnega fuksina, ter barvamo 30 sekund,
- speremo z navadno vodo in preparat posušimo na zraku ali popivnemo s filtrirnim papirjem.

Op.: za gramsko barvanje so na voljo komercialno dosegljivi kompleti barvil in reagentov.

### 4.3 NALOGA 2: ODČITAVANJE KRATKE BIOKEMIJSKE VRSTE IN BIOKEMIJSKE VRSTE KRISTALA BECTON DICKINSON

#### 4.3.1 Kratka biokemijska vrsta IMVC + urea (prirejena)

Tabela 4.1: Kratka biokemijska vrsta IMVC + urea (prirejena)

enterobakterija	indol	SC	urea	H <sub>2</sub> S
<i>E. coli</i>	+	-	-	-
<i>Proteus sp.</i>	V	v	+	v
Salmonela	-	+	-	+

SC- Simonsov citrat, V - variabilno

#### 4.3.2 Kristal Becton Dickinson

Za odčitavanje uporabljamo t.i. Panel viewer, ki deluje na osnovi osvetljevanja barvnih reakcij s pomočjo bele in UV svetlobe. Po inkubaciji vstavimo kristale v PV z ležečo stranjo na ekran ter prižgemo stikalo. S pomočjo barvnih kartic in primerjavo poz. in neg. biokemijskih reakcij izračunamo identifikacijsko številko (profile number), ki jo vstavimo v računalniški software. Program nas vodi do končne identifikacije mikroorganizma.

### 4.4 NALOGA 3: BAKTERIOLOŠKI PREGLED PITNE VODE

#### 4.4.1 Interpretacija rezultatov mikrobioloških preiskav pitne vode

- ugotovitev prisotnosti *E. coli* skupaj s kakim drugim fekalnim indikatorjem, pomeni obstoj sveže fekalne kontaminacije; voda je epidemiološko nevarna,
- ugotovitev osamljene *E. coli*; najverjetneje gre za staro onesnaženje z odpornimi bakterijami - voda je epidemiološko sumljiva,
- ugotovitev prisotnosti **enterokokov**, brez *E. coli* ali skupaj s *C.perfringens*-om kaže na staro fekalno kontaminacijo; če so prisotni še enterovirusi je epidemiološko nevarna,
- ugotovitev prisotnosti osamljenega *C.perfringens*-a pomeni staro fekalno kontaminacijo in nima epidemiološkega značaja,

5. ugotovitev prisotnosti **koliformnih** bakterije, brez *E. coli*, vendar skupaj z drugimi fekalnimi indikatorji pomeni svežo fekalno kontaminacijo in jo imamo za epidemiološko sumljivo,
6. ugotovitev prisotnosti **koliformnih bakterij** brez drugih fekalnih MO, kaže na staro kontaminacijo in obstoj rezistentnih bakterij in nima epidemiološkega značaja,
7. ugotovitev večjega števila saprofitov v vodi (500 do 1000 v 1ml) brez fekalnih MO nima večjega higienskega niti epidemiološkega značaja, če je odnos med mezofilnimi in psihrofilnimi bakterijami manjši od 3:10. V primeru, da psihrofili MO presežejo to razmerje imamo vodo za higiensko sumljivo (Karaklašević et al., 1967).

#### 4.5 NALOGA 4: OCENA MIKROBIOLOŠKE ČISTOSTI POVRŠIN

##### 4.5.1 Interpretacija rezultatov čistosti površin

Tabela 4.2: **Interpretacija rezultatov:** (velja za vrednotenje v živilski industriji)

število kolonij/cm <sup>2</sup>	rezultat	ocena
0-2	0	zelo dobra
3-9	1	dobra
10-29	2	zadovoljiva
30 -90	3	vprašljiva
> 90	4	nezadovoljiva

Vir: kriteriji GLP-lastni

Pri vrednotenju rezultatov v klavnicah do pakiranja razreza upoštevamo normative prejšnjega Pravilnika o postopkih izvajanja notranjega nadzora higiene v obratih za klanje in proizvodnjo mesa parkljarjev, kopitarjev in perutnine UL RS 45/2003 (zamenjala ga je Odločba komisije št. 2001/471/ES). Kriteriji so podani v spodnji tabeli:

	Sprejemljivo območje	Nesprejemljivo območje
Skupno število bakterij	0-10/cm <sup>2</sup>	> 10/cm <sup>2</sup>
<i>Enterobacteriaceae</i>	0-1/cm <sup>2</sup>	> 1/cm <sup>2</sup>

Vir: Odločba komisije št. 2001/471/ES

#### POVZETEK

Mikroskopiranje gramskih preparatov je način diagnostike, s katerim spoznavamo obliko celic ter gramsko opredelitev. Novejši postopek za biokemijsko diagnostiko je t.i. kristal, ki z enkratnim inokulumom za 36 diagnostičnih testov omogoča prepoznavanje bakterij s pomočjo primerjave barvnih testov in izračunavanja identifikacijske številke, ki jo vpišemo v računalniški software.

Postopek preiskave pitne vode nam pove ustreznost ali neustreznost vzorca, glede na prisotnost higienskih indikatorjev.

Postopki preiskave čistosti površin so različni: odvzemanje vatnih brisov ali odtiskov (Hygicult, Petrifilm). V skladu z dobro higiensko prakso so postavljeni tudi kriteriji vrednotenja v živilski industriji, v klavnicah pa kriterije postavlja zakonodaja.

Dnevnik

Ime in priimek:



## 5 LITERATURA

Bell, C. et al. *Food Microbiology and Laboratory Practice*. 1. izd. Oxford: Blackwell science, 2005.

Bole, H.V. in Hostnik, P. *Osnove dela v mikrobiološkem laboratoriju. Priročnik za vaje iz mikrobiologije za veterinarje*. 1. izd. Ljubljana: Veterinarska fakulteta, 1996.

*Development and Use of Microbiological Criteria for Foods*. London: Institut of Food Science & Technology, 1999.

Karakašević, B. et al. *Priručnik standardnih metoda za mikrobiološki rad*. 3. izd. Beograd-Zagreb: Medicinska knjiga, 1967.

Marčič, V.N. *Živilska mikrobiologija in biotehnologija. Mikrobiologija – vaje iz mikrobiologije*. 7. izd. Maribor: Živilska šola Maribor, Višja strokovna šola, 2006.

ISO TR/11333-1:2000. *Splošna navodila o zagotavljanju kakovosti priprave gojišča v laboratoriju*. 2000.

ISO 16649-2:2001 - *Horizontalna metoda za štetje  $\beta$ -glukoronidaza-pozitivne Escherichie coli*. 2001.

ISO 6579: 2002. *Horizontalna metoda za ugotavljanje prisotnosti Salmonella spp.* 2002.

ISO 7937 – *Izolacija in štetje vegetativnih celic Clostridium perfringens ter Clostridium botulinum iz vseh vrst živil*. Modifikacija po Angelottiju. 2004.

SIST ISO 6887- 1 – *Priprava vzorcev za mikrobiološke preiskave*. 1999.

SIST ISO 4833 – *Splošno navodilo za ugotavljanje števila mikroorganizmov. Štetje kolonij pri 30 °C*. 2003.

SIST ISO 7218 – *Splošna pravila za MB preiskav*. 2007.

SIST ISO 5667-5: *Navodilo za vzorčenje pitne vode in vode, ki se uporablja pri predelavi hrane in pijač*.

SIST ISO – 9308 – 2. *Določanje najverjetnejšega števila E. coli (MPN – most probable number)*. 2001.

SIST ISO 6222 - *Določanje skupnega števila mikroorganizmov pri 22 °C in 37 °C*. 1999.

*Odločba komisije št. 2001/471/ES*.

*Pravilnik o pitni vodi UL RS 19 in 35/2004*.

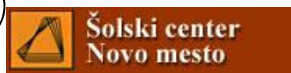
*Pravilnik o postopkih izvajanja notranjega nadzora higiene v obratih za klanje in proizvodnjo mesa parkljarjev, kopitarjev in perutnine UL RS 45/2003*.

[http://www2.bakersfieldcollege.edu/bio16/6\\_Nutrition...](http://www2.bakersfieldcollege.edu/bio16/6_Nutrition...) 26.11.2008  
<http://www.biotopics.co.uk/microbes/tech1.html> 26.11.2008  
<http://www.bmb.leeds.ac.uk/.../flora/Gram.html> 26.11.2008  
<http://www.geng-hygiene.com/images/phaluffry9p.gif> 26.11.2008  
<http://www.labnews.co.uk/.../1523/3/gas-safety-burner/> 26.11.2008  
<http://www.merck.de/> 26.11.2008  
<https://www.msu.edu/course/fsc/441/3mc&ec.html> 26.11.2008  
[http://openwetware.org/images/5/55/Streak\\_plates.png](http://openwetware.org/images/5/55/Streak_plates.png) 26.11.2008  
<http://people.rit.edu/.../20073IntroMicroLab3.htm> 26.11.2008  
[http://www.tecra.net/\\_\\_\\_data/page/156/ENVIROSWAB.jpg](http://www.tecra.net/___data/page/156/ENVIROSWAB.jpg) 26.11.2008  
<http://video.google.com/videoplay?docid=-1207145583242274630> 26.11.2008  
<http://wonderworkerdistributors.com/catalogue.html> 26.11.2008  
<http://www.youtube.com/watch?v=vhDrCIN7MP4> 26.11.2008  
[http://www.youtube.com/watch?v=QQ6C-gj\\_UHM](http://www.youtube.com/watch?v=QQ6C-gj_UHM) 26.11.2008

Projekt **Impletum**

Uvajanje novih izobraževalnih programov na področju višjega strokovnega izobraževanja v obdobju 2008-11

Konzorcijski partnerji:



Operacijo delno financira Evropska unija socialnega sklada ter Ministrstvo RS za šolstvo in šport. Operacija se izvaja v okviru operativnega programa razvoja človeških virov za obdobje 2007-2013, razvojne prioritete 'Razvoj človeških virov in vseživljenjskega učenja' in prednostne usmeritve 'Izboljšanje kakovosti in učinkovitosti sistemov izobraževanja in usposabljanja'