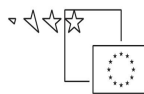




REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA ŠOLSTVO IN ŠPORT



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

VIŠJEŠOLSKI STROKOVNI PROGRAM ŽIVILSTVO IN PREHRANA

ŽIVILSKA MIKROBIOLOGIJA IN BIOTEHNOLOGIJA

1. DEL:

ŽIVILSKA MIKROBIOLOGIJA

VIDA NAHBERGER MARČIČ

Višješolski strokovni program: Živilstvo in prehrana

Učbenik: Živilska mikrobiologija in biotehnologija. 1. del: Živilska mikrobiologija

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

1	UVOD V MIKROBIOLOGIJO.....	3
1.1	ZGODOVINSKO OZADJE MIKROBIOLOGIJE KOT ZNANSTVENE DISCIPLINE.....	3
1.2	EKOLOGIJA MIKROORGANIZMOV.....	4
1.2.1	Mikroorganizmi kot povzročitelji bolezni.....	4
1.2.2	Mikroorganizmi in kmetijstvo.....	4
1.2.3	Mikroorganizmi v živilski industriji.....	5
1.2.4	Mikroorganizmi in energija.....	5
1.2.5	Mikroorganizmi in prihodnost.....	5
1.3	FILOGENETSKA ORGANIZACIJA ŽIVIH BITIJ.....	5
1.4	MIKROORGANIZMI KOT CELIČNE STRUKTURE.....	8
1.4.1	Morfologija mikroorganizmov.....	9
1.4.1.1	Citoplazma.....	10
1.4.1.2	Struktura citoplazmine (celične) membrane prokariota.....	10
1.4.1.3	Funkcija citoplazmine membrane.....	11
1.4.1.4	Bakterijska celična stena – struktura, funkcija in sinteza.....	12
1.4.1.5	Bakterijski organi za premikanje.....	13
1.4.1.6	Bakterijske strukture celične površine in celični organeli.....	13
1.4.1.7	Razmnoževanje in bakterijska endospora.....	14
1.4.2	Mikrobni metabolizem.....	15
1.4.3	Celično dihanje in fotosinteza.....	16
1.5	PLESNI IN KVASOVKE.....	17
1.5.1	Plesni.....	17
1.5.1.1	Morfologija gliv.....	18
1.5.1.2	Fiziologija gliv.....	19
1.5.2	Kvasovke.....	19
1.5.2.1	Fiziologija kvasovk.....	20
2	ŽIVILSKA MIKROBIOLOGIJA.....	21
2.1	PRIMARNI IZVORI V ŽIVILIH ŽIVEČIH MIKROORGANIZMOV.....	21
2.2	KINETIKA MIKROBNE RASTI.....	22
2.3	POJAVNOST IN RAZVOJ MIKROORGANIZMOV MED PREDELAVO.....	23
2.4	EKOLOGIJA RASTI MIKROORGANIZMOV.....	24
2.4.1	Splošne zahteve mikroorganizmov po hrani.....	25
2.4.2	Intrinzični ali notranji parametri (notranjost živila).....	25
2.4.3	Ekstrinzični ali zunanji parametri (okolje, v katerem je živilo).....	29
2.4.4	Implicitni parametri.....	31
3	VPLIV MIKROORGANIZMOV NA KVARJENJE ŽIVIL.....	33
3.1	FIZIKALNI VPLIVI.....	34
3.2	KEMIJSKI VPLIVI.....	34
3.2.1	Razgradnja ogljikovih hidratov.....	35
3.2.2	Razgradnja beljakovinskih živil.....	36
3.2.3	Razgradnja maščob.....	37
3.3	MIKROBNI INDIKATORJI KVARJENJA.....	37
3.3.1	Bakterije.....	38
3.3.2	Kvasovke.....	39

3.3.3	Plesni	40
3.4	INDIKATORJI MIKROBIOLOŠKE KAKOVOSTI.....	40
3.4.1	Indikatorji mikrobiološke kakovosti izdelkov (kvarljivci).....	41
3.4.2	Indikatorji higiene (higienski indikatorji).....	42
4	MIKROBIOLOŠKO NEUSTREZNA ŽIVILA KOT VIR OKUŽBE IN ZASTRUPITVE	44
4.1	PRIMARNI IZVORI ZASTRUPITEV S HRANO.....	46
4.2	SEKUNDARNI IZVORI KONTAMINACIJE	46
4.2.1	Vrste zastrupitev s hrano	48
4.2.2	Bakterije, ki povzročajo s hrano preneseno bolezen z okužbo - infekcijske bakterijske zastrupitve.....	48
4.2.2.1	Salmonelle.....	48
4.2.2.2	Kampilobaktri.....	49
4.2.2.3	Vibrio parahaemolyticus	50
4.2.2.4	Yersinia enterocolitica	51
4.2.3	Bakterije, ki povzročajo s hrano preneseno bolezen s toksini – toksične bakterijske zastrupitve	52
4.2.3.1	Staphylococcus aureus.....	52
4.2.3.2	Clostridium botulinum.....	53
4.2.3.3	Bacillus cereus (emetični tip)	54
4.2.3.4	Clostridium perfringens	54
4.2.3.5	Bacillus cereus (tipa diareje).....	55
4.2.3.6	Escherichia coli (ETEC) - enterotoksična	55
4.2.3.7	E. coli (EHEC) - enterohemoragična 0157.....	56
4.2.4	Druge patogene bakterije prenesene z živali	56
4.2.4.1	Listeria monocytogenes.....	56
4.2.5	Virusno prenesene bolezni z živali.....	57
4.2.6	Mikotoksini.....	58
5	METODE VAROVANJA ŽIVIL IN PODALJŠANJE OBSTOJNOSTI (INHIBICIJA MIKROORGANIZMOV V ŽIVILIH)	59
5.1	TOPLOTNA OBDELAVA	60
5.1.1	Kinetika odmiranja	60
5.1.2	Napake pri toplotni obdelavi.....	62
5.2	HLAJENJE.....	63
5.3	ZAMRZOVANJE.....	63
5.4	DEHIDRACIJA.....	64
5.5	KEMIJSKO KONZERVIRANJE.....	65
5.5.1	Naravni postopki konzerviranja.....	66
5.5.2	Kemično konzerviranje.....	66
5.6	DRUGI POSTOPKI INHIBICIJE MIKROORGANIZMOV V ŽIVILIH	67
6	METODE ODKRIVANJA MIKROORGANIZMOV V ŽIVILIH.....	69
6.1	KONVENCIONALNE METODE – TRADICIONALNE (KLASIČNE) METODE.....	69
6.2	HITRE METODE.....	70
6.2.1	Imunomagnetna separacija.....	70
6.2.2	Fluorogena in kromogena gojišča	70
6.2.3	Petrifilm.....	71
6.2.4	ELISA	71

7	STRATEGIJA MIKROBIOLOŠKEGA NADZORA V ŽIVILSKI INDUSTRIJI .	72
7.1	I. DEL – SPREMLJAJOČI PREDPROGRAMI.....	73
8	MIKROBIOLOŠKI KRITERIJI IN ŽIVILSKA ZAKONODAJA.....	75
8.1	MIKROBIOLOŠKI NORMATIVI ALI STANDARDI.....	75
8.2	METODOLOGIJA MIKROBIOLOŠKEGA PRESKUŠANJA.....	76
8.3	VZORČEVALNI NAČRT ALI NAČRT NADZORA.....	76
8.4	ŠTEVILO USTREZNIH VZORCEV	76
9	LITERATURA.....	78

1 UVOD V MIKROBIOLOGIJO

1.1 ZGODOVINSKO OZADJE MIKROBIOLOGIJE KOT ZNANSTVENE DISCIPLINE

Mikrobiologija je veda, ki proučuje mikroorganizme, obsežno in raznoliko skupino organizmov, ki živijo kot samostojne celice ali celične združbe. Mikrobne celice se razlikujejo od celic živali in rastlin, ki v naravi ne morejo bivati same, ampak so lahko le del mnogoceličnega organizma. Samostojna mikrobna celica je večinoma sposobna procesov rasti, energetskih prenosov in neodvisnega razmnoževanja (Brock et al., 1999).

Mikrobiologija je relativno mlada znanstvena disciplina. Prvi zapisi o mikroorganizmih izvirajo iz 17. stoletja. Beseda je zloženko iz treh besed (mikros – majhen, bios – življenje in logos – beseda) in nam pojasni, zakaj je bil razvoj mikrobiologije kot znanosti tako upočasnen. Z odkritjem optičnih leč (A. van Leeuwenhoek, 1675), ki so že povečale do 300 krat, so postali mikroorganizmi očem vidni, vendar je razumevanje narave njihovega pomena prihajalo zelo počasi.

Mikrobiologija kot znanost se ni razvila prej kot koncem 19. stoletja. Vzrok za pozen razvoj, kljub razviti mikroskopiji, pripisujejo pomanjkanju nekaterih osnovnih tehnik študija mikroorganizmov. Kot osnova mikrobiološkega proučevanja sta se razvili dve znanstveni teoriji: teorija **spontane generacije** in teorija o **nastanku bolezni** (<http://cwx.prenhall.com/brock/chapter1/deluxe.html>).

Prva pojasnjuje, da nastajajo mikroorganizmi iz nežive snovi, vendar je imela veliko nasprotnikov. Najmočnejši nasprotnik te teorije je bil francoski kemik **Louis Pasteur** (1822 – 1895), ki je prvi pojasnil, da so lahko drobne strukture, ki so prisotne v zraku, povzročitelji gnitja snovi. Postavil je postulat o stalni prisotnosti drobnih teles v zraku in na vseh predmetih, ki jih je mogoče odstraniti z vročino ter s poskusom s steklenico z labodjim vratom uspel ovreči teorijo spontane generacije mikroorganizmov. Proces ubijanja mikroorganizmov s toploto danes imenujemo sterilizacija, vendar je že Louis Pasteur uvedel principe aseptičnih tehnik, da je lahko obvladoval mikroorganizme pri svojih poskusih.

Za razvoj mikrobiološke znanosti je imel velik vpliv dokaz, da lahko mikroorganizmi povzročijo bolezen. Velika osebnost na področju medicinske mikrobiologije je bil **Robert Koch** (1843 – 1910), ki je odkril in proučil povzročitelja tuberkuloze ter uvedel izpopolnjene mikrobiološke tehnike in metode. Leta 1881 je našel preprost in zanesljiv način, kako izolirati mikroorganizme v čistih kulturah s pomočjo trdnih gojišč z dodatkom želatine. Na osnovi raziskav infektivnosti mikroorganizmov ter njihove sposobnosti rasti na trnih gojiščih je formuliral znane Kochove postulate, ki so ohranili izjemen pomen laboratorijske kulture do danes (http://www.microbiologytext.com/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=26).

V **20. stoletju** smo priča intenzivnemu razvoju mikrobiologije, ki gre v dveh ločenih smereh: uporabni (aplikativni) ter bazični. Na področju aplikativne se je na osnovah Kochove nemške šole razvijala *medicinska* mikrobiologija in *imunologija*.

V začetku stoletja so bili odkriti številni patogeni mikroorganizmi. Zgodnji razvoj je doživela mikrobiologija v kmetijstvu, ki je vodila v razumevanje mikrobnih procesov v tleh in na

rastlinah. V tridesetih letih doživi razcvet *industrijska* mikrobiologija s pridobivanjem antibiotikov in drugih kemičnih izdelkov. V sodobnosti se srečujemo z vedno večjo skrbjo, kam z odpadki, kako jih predelati in uporabiti. Razvija se področje *sanitarne* mikrobiologije ki se tesno povezuje s področjema mikrobiologije *voda* in *higiene živil* (Brock et al., 1999).

Na področju bazične mikrobiologije v zgodnjih dvajsetih letih doživi intenziven razvoj *bakterijska taksonomija*, kar je bila posledica odkritja novih rodov ter njihova klasifikacija. Bakterijska klasifikacija zahteva proučevanje bakterijskih prebavnih (metaboličnih) lastnosti in se povezuje s področjem *bakterijske fiziologije, citologije in biokemije*. Drugo zelo pomembno področje v proučevanju rasti in razvoja bakterijske celice je *bakterijska genetika* z molekularno biologijo, ki se je intenzivno razvijala v zgodnjih 60. letih, ko je bilo poglobljeno razumevanje delovanja DNA, RNA in sinteze beljakovin (Brock et al., 1999).

1.2 EKOLOGIJA MIKROORGANIZMOV

Mikroorganizmi so razvrščeni v šest večjih kategorij: protozoe, mikroskopske alge, glive (kvasovke in plesni), bakterije, cianobakterije in viruse. Največ je enoceličnih, med algami in plesnimi pa tudi mnogocelični. Bakterije in cianobakterije imajo najenostavnejšo celično strukturo. Struktura praživali (protozoe) pa je bližje celični strukturi živali. Celice alg so podobne celicam rastlin, celice gliv pa celicam rastlin brez klorofila. S primerjanjem podobnosti celične strukture, mikroorganizmov ne moremo razvrstiti niti med rastline, niti med živali. Virusom manjka celična struktura, ki je skupna ostalim mikroorganizmom, zato jih opisujemo kot brez celične delce (<http://cwx.prenhall.com/brock/>).

1.2.1 Mikroorganizmi kot povzročitelji bolezni

V začetku stoletja je bila večina vzrokov smrti pri ljudeh povezana z nalezljivimi boleznimi; danes imajo te bolezni zmanjšan pomen. Obvladovanje nalezljivih bolezni je plod poglobljenega razumevanja bolezenskih procesov. Danes živimo v svetu uspešnega nadzora nad patogenimi mikroorganizmi, čeprav v nerazvitih in razvijajočih državah predstavljajo še vedno pogloblitve vzroke visoke umrljivosti (AIDS, malarija, tuberkuloza, kolera, spolna bolezen in številni enteritisi). Mikroorganizmi ostajajo še vedno resna grožnja bivanja človeka, vendar moramo poudariti, da večina mikroorganizmov ni škodljiva. Pravzaprav so lahko koristni za človeka, saj izrabljanje njihove aktivnosti pomeni izboljšanje človekove kakovosti življenja (farmaceutvska industrija – pridelava antibiotikov) – (<http://cwx.prenhall.com/brock/>).

1.2.2 Mikroorganizmi in kmetijstvo

Celoten sistem kmetijstva je v večini primerov odvisen od mikrobne aktivnosti. Številni kmetijski pridelki spadajo v skupino metuljnic / leguminoz (detelja, soja), ki živijo v tesnem odnosu z bakterijami, živečimi na koreninskih strukturah rastlin. Ti mikroorganizmi predelajo atmosferski dušik v amoniak, ki je rastlinam dostopnejši v organskih molekulah beljakovin in nukleotidov. Glede na dejstvo, da je velika količina dušika vezana v organske molekule z aktivnostjo rastlin, metuljnice na ta način izboljšujejo plodnost zemlje z dušikom.

Mikroorganizmi sodelujejo tudi v procesu kroženja ogljika na Zemlji. Skrbijo za mineralizacijo zelenih rastlin z vezanjem ogljika iz zraka, tal in vod v organske spojine.

Velik pomen v kmetijstvu pripisujemo prebavnemu procesu prežvekovalcev. Te pomembne farmske živali imajo poseben organ imenovan rumen (vamp), v katerem s pomočjo mikroorganizmov poteka prebavni proces in od njegove kakovosti je odvisen pridelek mesa in mleka (<http://cwx.prenhall.com/brock/chapter1/deluxe.html>, Brock et al., 1999).

1.2.3 Mikroorganizmi v živilski industriji

V živilski industriji pripisujemo aktivnosti mikroorganizmov več vlog:

1. kot kvarljivci in zastrupljevalci hrane povzročajo veliko materialno škodo in so nevarni za zdravje porabnikov. Človek je z različnimi metodami konzerviranja in s skrbnim mikrobiološkim nadzorom uspel pripraviti take izdelke, da se ne uspejo pokvariti in za ljudi niso nevarne.
2. kot sestavina cele vrste izdelkov velike gospodarske vrednosti, kot so mlečni izdelki, nekateri mesni izdelki, fermentirana zelenjava, pekarski izdelki in alkoholne pijače. Brez aktivne dejavnosti izbranih mikroorganizmov, si nastanka teh izdelkov ne moremo zamisliti.
3. kot predelovalci raznih substratov na področju biotehnoških procesov z namenom pridobivanja novih izdelkov ali dodatkov (sladkorji, nadomestki sladkorjev, organske kisline in drugo)- (Brock et al., 1999).

1.2.4 Mikroorganizmi in energija

Naša celotna industrializirana družba je velik porabnik energije in tudi tu igrajo mikroorganizmi pomembno vlogo. Velik del naravnega metana in surove nafte je plod mikrobne aktivnosti metanogenih in drugih bakterij. Človek bo v prihodnosti, zaradi porabe obstoječih fosilnih goriv, prisiljen uvajati nove vire zagotavljanja energije. Mikroorganizmi lahko zagotovijo alternativne energijske vire. Fotosintetični mikroorganizmi lahko skladiščijo svetlobno energijo za izdelavo biomase. Mikrobna biomasa in odpadki vseh vrst bodo služili kot energetski viri na vseh področjih aktivnosti človeka (<http://cwx.prenhall.com/brock/>).

1.2.5 Mikroorganizmi in prihodnost

Ena izmed najbolj razburljivih disciplin novodobne mikrobiologije je prav gotovo biotehnologija. Danes pojmuje pod tem imenom novo smer genskega inženiringa, ki ustvarja nove tipe mikroorganizmov za sintezo posebnih proizvodov visoke komercialne vrednosti ali proizvodov, pomembnih v humani medicini (insulin) (Brock et al., 1999).

1.3 FILOGENETSKA ORGANIZACIJA ŽIVIH BITIJ

Ves živi svet na Zemlji je razdeljen na pet kraljestev (po R.H. Whittaker-ju, 1969): na rastline, živali, glive, protiste in prokariote. Glede na celično organizacijo se deli na tri nivoje: prokariote, enocelične evkarionte in večcelične mnogojedrne evkarionte. Razlike med njimi opredeljujejo načini prehranjevanja: fotosinteza, absorbcija in ingestija (požiranje/goltanje hrane).

Med **protiste** prištevamo razne enocelične alge in praživali (protozoe), ki so biološko in biokemijsko neodvisne. V filogenetskem razvoju se nahajajo med prokarioti ter visoko diferenciranimi predstavniki živali in rastlin. So evkarionti, prehranjujejo se s pomočjo vseh treh načinov hranjenja.

Glive sestavljajo glive, plesni in kvasovke. Lahko so enoceličarji ali mnogoceličarji; prehranjujejo se z absorbcijo.

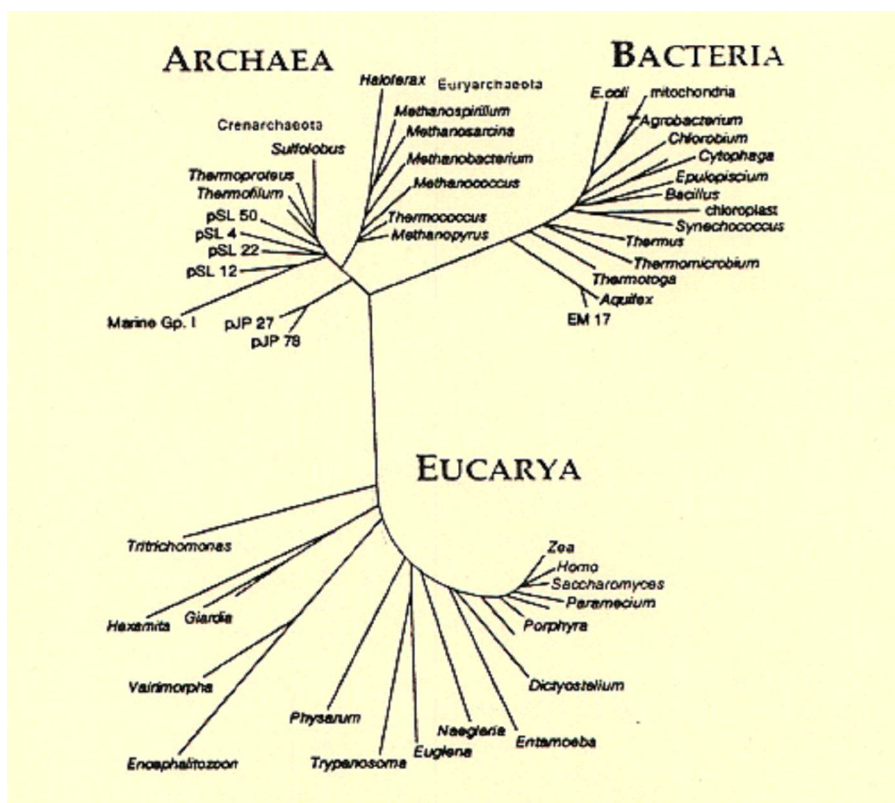
Prokarionti so enocelični in kolonije pridelujoči mikroorganizmi, opisani kot prave bakterije ali eubakterije. Vse življenjske dejavnosti se odvijajo preko citoplazmne membrane – celične ovojnice. Prokarionte sestavlja veliko število različnih bakterij (modro zelene bakterije, rikecije, klamidije ter veliko število koristnih in neškodljivih bakterij). Večinoma imajo absorpcijski način prehrane, čeprav so nekateri prokarionti tudi fotosintetični organizmi.

Moderni filogenetski pristop temelji na poznavanju genetskih struktur (sekvencah ribosomske RNA) in pojasnjuje obstoj trojejnega filogenetskega (evolucijskega) drevesa. Dve izmed vej sta prokariontski (bakterije in arhebakterije), tretja opredeljuje vse evkarionte, vse veje pa izhajajo iz skupnega prednika – prabitja (<http://cwx.prenhall.com/brock/>).

Tabela 1.1: Fenotipične lastnosti bakterij, arhebakterij in evkariontov

Lastnosti	Evkarionti	Bakterije	Arhebakterije
Celična struktura	Evkariontska	Prokariontska	Prokariontska
Jedrna membrana	Prisotna	Ni	Ni
Število kromosomov	>1	1	1
Murein v celični steni	-	+	-
Steroli v membrani	Prisotni	Ni	Ni
Organeli (mitohondriji in kloroplasti)	Prisotni	Ni	Ni
Mejoza in mitoza	Prisotna	Ni	Ni
Inhibicija sinteze proteinov s streptomycinom in kloramfenikolom	-	+	-

Vir: <http://www.textbookofbacteriology.net/bacteriology.html>



Slika 1.1 : Univerzalno filogenetsko drevo (po N.Pace-u)

Vir: <http://www.textbookofbacteriology.net/bacteriology.html>

Taksonomija je znanost o prepoznavanju, poimenovanju in razvrščanju in organizmov. Bakterijska taksonomija temelji na tradicionalnih - fenotipičnih analizah, v sodobnosti pa prevladujejo genotipične metode, ki so se izkazale za mnogo občutljivejše, hitreje in bolj natančne.

Mikrobiologi pri svojem delu želijo iz praktičnih razlogov bakterije identificirati in klasificirati. Osnovna taksonomska enota je **vrsta** (species), ki je definirana kot zbirka podobnih tipov, ki se od ostalih tipov značilno razlikuje. Skupine vrst se zbirajo v **rodove** (genus), ki je zbirka različnih vrst, ki si delijo določeno skupno lastnost. Skupine rodov se združujejo v **družino**, ki je v glavnem najvišja taksonomska enota v rutinskem študiju prokariontov.

Obstaja več načinov grupiranja prokariontov. **Konvencionalna bakterijska taksonomija** meri številne lastnosti različnih tipov znotraj vrste, ki jih nato uporabi v grupiranju organizmov. Lastnosti, ki imajo večjo taksonomsko uporabno vrednost so: morfologija (oblika), gramaska opredelitev (kemizem celične stene), prehranska opredelitev, prisotnost celičnih organelov, kemizem kapsul, pigmenti, prehranske zahteve, sposobnost vezanja ogljika, dušika in žvepla, fermentacijski produkti, zahteve po atmosferi, temperature zahteve in zahteve po pH vrednosti okolja, občutljivost za antibiotike, patogenost, odnosi simbioze, imunološke lastnosti ter okolje (Brock et al., 1999).

Molekularna bakterijska taksonomija - merjenje razmerja guanina G in citozina C v bazični sestavi DNA - je postala del konvencionalne taksonomije. Razmerje je izraženo v mol procentih GC in je pri prokariontih med 20 in 78 procenti.

$$\frac{\text{A} + \text{T} + \text{G} + \text{C}}{\text{A} + \text{T} + \text{G} + \text{C}} \times 100\%$$

Med organizmi je velika razlika v sestavi DNA baz in dva organizma, ki se po sestavi baz značilno razlikujeta, se običajno razlikujeta tudi taksonomsko, vendar pa lahko izkazujeta značilno filogenetsko sorodnost. **Bergeyev priročnik sistematske bakteriologije** je poglobljena zbirka klasičnih in molekularnih informacij o vseh prepoznanih vrstah prokariotov in vsebuje številne ključne za identifikacijo bakterij (Brock et al., 1999).

POVZETEK

Mikrobiologija je mlada znanstvena disciplina, ki proučuje mikroorganizme. Je interdisciplinarna, kar pomeni, da je pristop proučevanja z vidika številnih bazičnih ved - biologije, kemije, fizike.. in posega na različna področja človekove dejavnosti - od kmetijstva, živilstva, humane in veterinarske medicine, ekologije, pa tudi na področje obetajočega pridobivanja energije. Imajo velik vpliv na okolje v katerem živimo; njihov študij nam omogoča razumeti svet okoli nas. Mikroorganizmi se delijo na enoceličarje – bakterije, kvasovke, enocelične alge in praživali - sposobne samostojne rasti in razmnoževanja kot samostojne celice, in večceličarje - plesni, ki imajo v živilstvu pomembno vlogo kvarljivcev. Veda, ki se ukvarja z urejenostjo mikroorganizmov je taksonomija, ki na osnovi metaboličnih in morfoloških lastnosti ter genetskih posebnosti opredeljuje mikroorganizme.

MINI SLOVAR

Evkariot – celica, ki vsebuje nukleus (jedro) z membrano in običajno še druge organele (alge, praživali, plesni, rastline, živali)

Metabolizem – biokemijske reakcije v celici, pretok snovi in energije

Prokariot - celica brez pravega jedra (bakterije, mikoplazme, rikecije, klamidije)

Filogenija - zgodovina evolucije organizmov

Fenotip – skupek vseh lastnosti posameznika, določenih z genotipom in okoljem

Genotip – skupek vseh podedovanih lastnosti

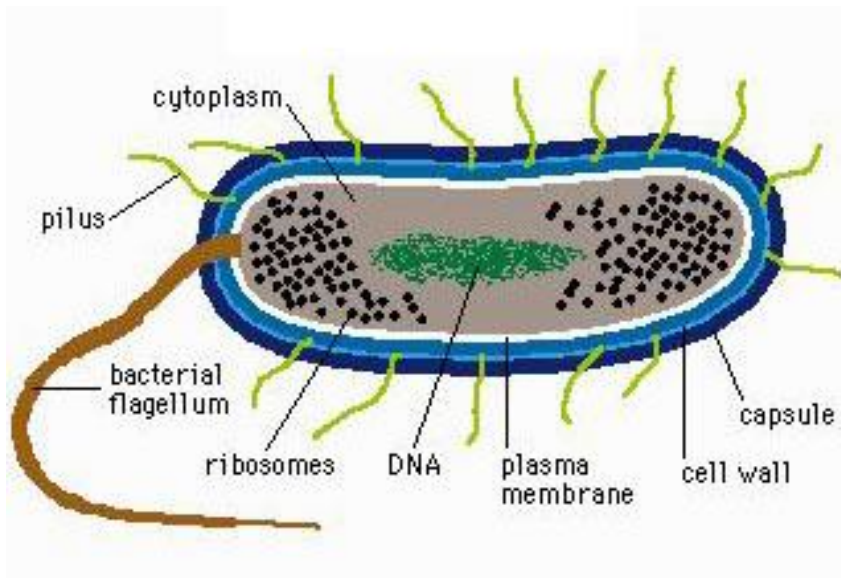
Taksonomija – veda o imenovanju, razvrščanju in prepoznavanju mikroorganizmov

Interdisciplinarnost - je tip [akademskega](#) sodelovanja, pri katerem [specialisti](#) iz [različnih akademskih disciplin](#) delajo k skupnim ciljem.

ŠTUDIJSKA VPRAŠANJA

1. Kaj je mikrobiologija in katera področja proučevanja obsega?
2. V čem se izkazuje interdisciplinarnost mikrobiologije, kot znanstvene vede?
3. Kako so opredeljeni mikroorganizmi kot aktivni dejavniki v živilstvu?
4. Opišite razlike med evkariotsko in prokariotsko celico?
5. Katere lastnosti mikroorganizmov opredeljuje konvencionalna bakterijska taksonomija?

1.4 MIKROORGANIZMI KOT CELIČNE STRUKTURE



Slika 1.3: Struktura bakterijske celice

Vir:

http://www.microbiologytext.com/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=36

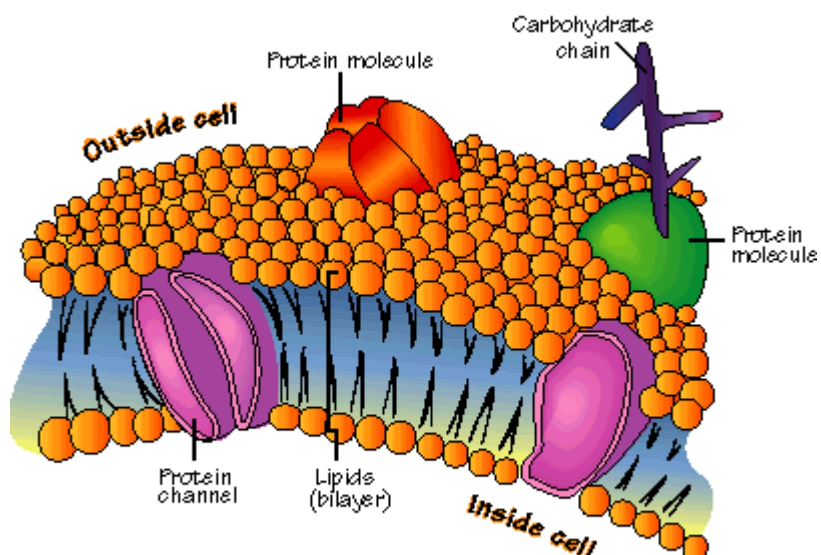
1.4.1.1 Citoplazma

Zavzema večino notranjosti bakterijske celice. Pri mladih celicah je homogena, pri starejših granulirana, kompleksna trodimenzionalna mreža fibril, vezanih okoli jedrne mase. Sestavlja jo 70 do 80 % vode, sladkorji, aminokisliline in soli. V njej so razpršeni celični organeli (nepravo jedro, ribosomi, inkluzijska telesa anorganskih spojin).

1.4.1.2 Struktura citoplazmine (celične) membrane prokariota

Citoplazmina membrana je tanka struktura (5 do 10 nm), ki popolnoma obdaja celico in leži pod celično steno. Je kritična bariera, ki ločuje notranjost celice od okolja. Če se membrana poškoduje, je integriteta celice uničena – nastopi smrt. Pod elektronskim mikroskopom vidimo, da se membrana pojavlja v dveh tankih filmih, ločenih s svetlejším poljem. Sestavljajo jo **fosfolipidi** (dva sloja – hidrofilni in hidrofobni) in **proteini**, ki so večinoma netopni in se povezujejo s hidrofilnimi skupinami fosfolipidov in skupinami vodnih molekul v urejeno strukturo.

Plazmina membrana tvori membranske vezikle (mezosome), ki imajo pomembno vlogo pri encimskih reakcijah razgradnje prehranskih komponent celice in absorpciji hranil in usmerjajo potek delitve celice. (http://www.microbiologytext.com/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=36).



Slika 1.4 : Struktura citoplazmine membrane

Vir: http://library.thinkquest.org/C004535/media/cell_membrane.gif

1.4.1.3 Funkcija citoplazmine membrane

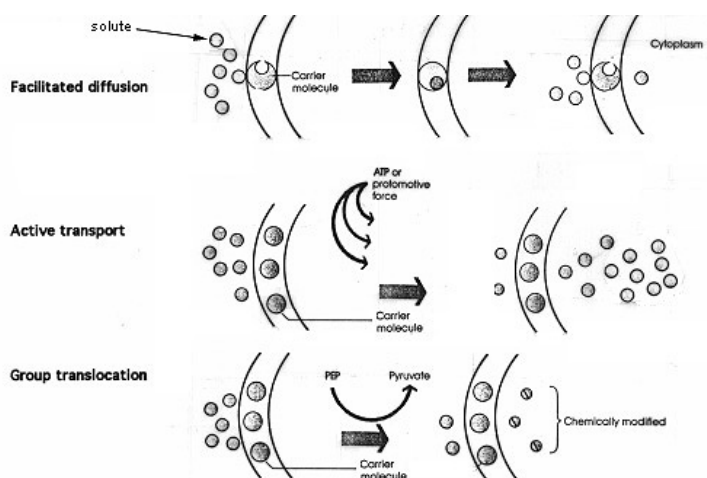
Posamezne hranilne snovi morajo preiti bariero celične membrane, prav tako morajo vsi odpadni produkti celico zapustiti. V celici so aktivne tri oblike specifičnih transportnih procesov: pasivna difuzija, transport fosforiliranih molekul in aktivni transport.

Pasivna difuzija ne omogoča potovanja delcev proti gradientu koncentracije (v smeri večje koncentracije), je počasna, teče spontano od večje k manjši koncentraciji.

Pri transportu kompleksov hranilnih snovi so molekule kemijsko spremenjene s fosforilacijo (energijsko pogojen transport) – je oblika aktivnega transporta.

Aktivni transport pa je energijski proces, pri katerem ostanejo substance kemijsko nespremenjene in potujejo skozi membrano s pomočjo ionov v smeri večje koncentracije. Ta proces omogočajo ponavadi aminokisliline ter Na^+ in K^+ ioni.

(<http://www.northland.cc.mn.us/biology/Biology1111/animations/transport1.html>).



Slika 1.5: Oblike transportnih procesov skozi membrano

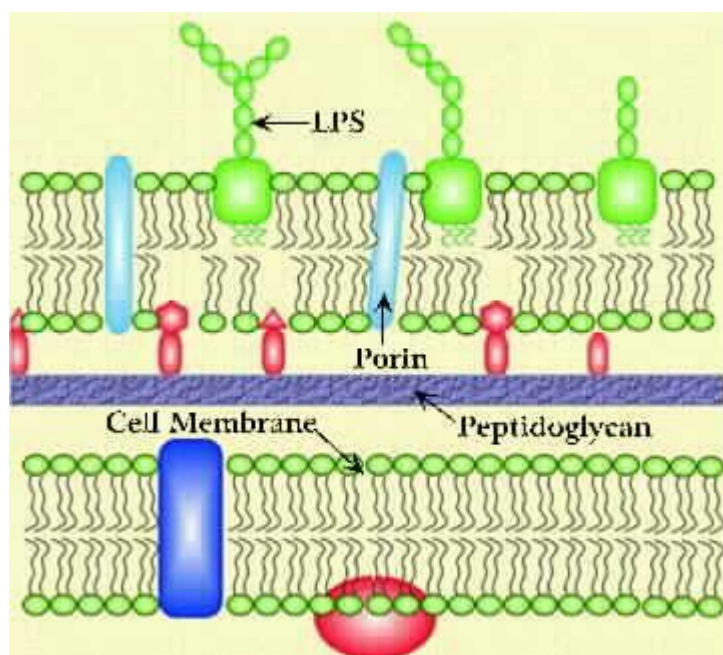
1.4.1.4 Bakterijska celična stena – struktura, funkcija in sinteza

Celična stena daje bakterijski celici trdnost in obliko. Bakterije lahko razdelimo v po Gramu negativne in po Gramu pozitivne; razdelitev je osnovana na specifičnem barvanju celičnih sten. **Celična stena G- celic** je večplastna, kompleksna struktura, **celična stena G+ celic** pa je sestavljena iz enotnih molekul in je večinoma debelejša. Čvrsto strukturo obema daje peptidoglikan (polisaharid). Pri G+ bakterijah je peptidoglikana v celični steni okoli 90 %. G- bakterije ga imajo le 5 do 20%, ostale sestavine so lipidi, polisaharidi in proteini, ki se nahajajo na zunanji steni peptidoglikana. Ta drugi sloj celične stene je mnogo bolj propusten kot celična membrana, zaradi proteinskih struktur. Vmesni prostor, imenovan periplast vsebuje številne proteine, ki sodelujejo v celični presnovi. Značilnost G+ bakterij je odsotnost lipopolisaharidov (LPS – sloj); imajo pa drugo komponento celične stene - tejhojne kisline. (<http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/BacterialStructure/MoreCellWall.html>).

Tabela 1.2 : Primerjava strukture in funkcije celične stene pri G+ in G- bakterijah

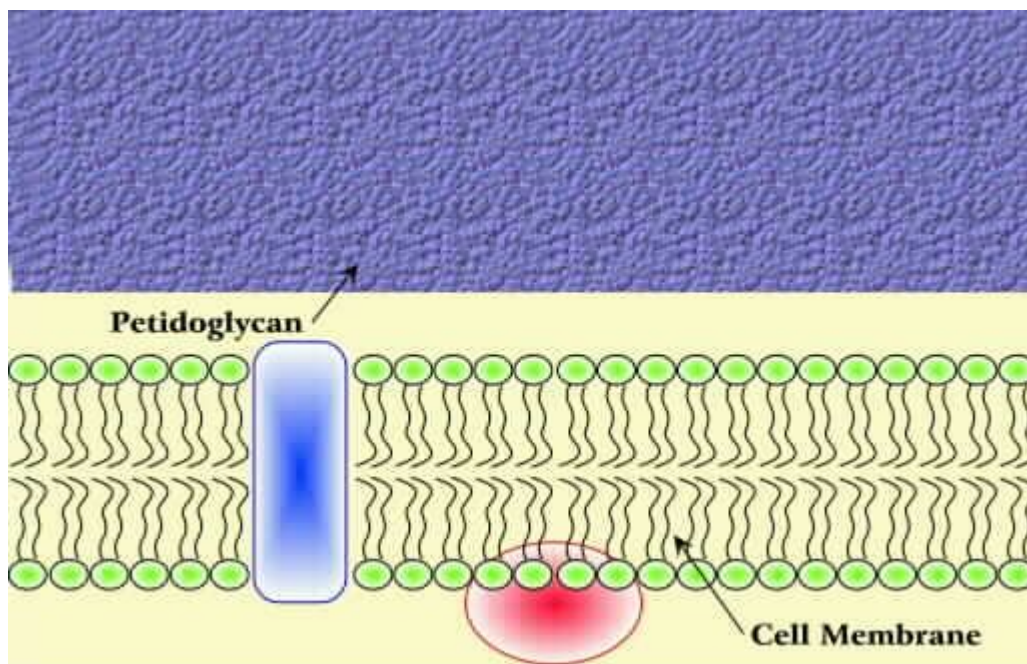
Lastnost	Gram +	Gram -
Debelina celične stene	20-80 nm	10 nm
Število slojev	1	2
Odpornost za osmotski pritisk	Do 25 atm	Do 5 atm
Peptidoglikan	>50%	10-20%
Tejhojne kisline v steni	+	-
Lipidi in lipoproteini	0-3%	58%
Proteini	0%	9%
Lipopolisaharidi	0	13%
Občutljivost za penicilin	+	- ni
Izločena z dejavnostjo lizocima	+	- (ne tako močno)

Vir: <http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/BacterialStructure/MoreCellWall.html>



Slika 1.6: Struktura celične stene G – negativnih bakterij

Vir: <http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/BacterialStructure/CellWall.html>



Slika 1.7: Struktura celične stene G – pozitivnih bakterij

Vir: <http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/BacterialStructure/CellWall.html>

Celico brez celične stene imenujemo protoplast.

Celična stena v rastoči celici se sintetizira z dodajanjem novih glikanskih molekul v obstoječo strukturo celičnega zidu. Aktivnost lizocima (encima telesnih tekočin) in antibiotikov kot je penicilin na celično steno (peptidoglikan) je pogubna. Celična stena postaja šibka, sloj peptidoglikana se tanjša; bakterijska celica umre (liza bakterijske celice), ker ne more obstajati brez celične stene.

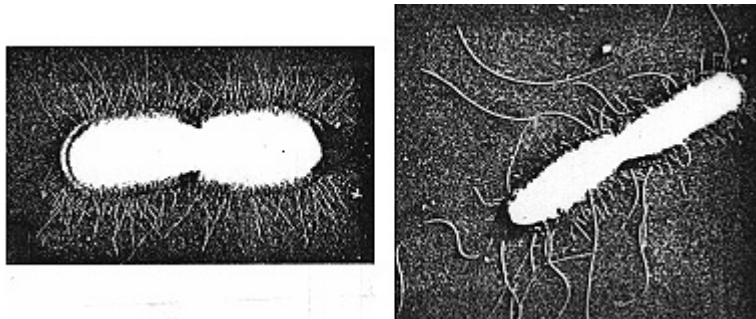
Bakterijska celica nima pravega jedra. Ekstremno dolga molekula DNA se nahaja v zgoščenem delu citoplazme in je ovita okoli posebnih bazičnih proteinov, kar skupaj tvori bakterijski kromosom – **nukleoid**. Delitev genetskega materiala poteka vedno amitotsko - brez delitvenega vretena. S pomočjo replikatorja, vezanega na plazmino membrano se bakterijski kromosom podvoji in s pomočjo mezosoma razdeli celico na dve enaki hčerinski celici.

1.4.1.5 Bakterijski organi za premikanje

Gibanje pri bakterijah je pogojeno z organi za premikanje, imenovanimi **flagele** in **cilije**. Pri prokariontih je flagela mikroskopska struktura iz enotnega proteina – flagelina. Bakterijska flagela je trdna vijačnica, pritrjena na celično telo, ki rotira v smeri gradienta hranilnih snovi ali od gradienta koncentracije hranilnih snovi – ustvarja celično gibanje. Značilno za rast flagel je, da rastejo na koncu – se terminalno podaljšujejo in imajo sposobnost regeneracije. Organizmi s polarnimi flageli (na enem koncu) se ponavadi premikajo hitro in ne vedno ravno, organizmi s cilijami (peritrihne – po vsej celični površini) pa se premikajo ravno, v statičnem ritmu (http://www.microbiologytext.com/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=63)

1.4.1.6 Bakterijske strukture celične površine in celični organeli

Fimbrije in **pili** so kemijsko sorodne flagelam, vendar ne služijo za premikanje. Razdelimo jih v splošne, seksualne (S), ki tvorijo konjugacijske mostičke za prenos DNA iz ene celice v drugo (konjugacija) ter F in R fimbrije, ki prenašajo nalezljivo rezistenco (odpornost) na antibiotike. Vloga fimbrij je adhezija (pripenjanje) na inertne površine; fimbrije so lahko tudi virulenčni faktorji.



Slika 1.8: Fimbrije in pili
Vir: Brock et al., 1999.

Številni prokarionti izločajo na svoji površini sluzaste ali lepljive snovi (največkrat so to polisaharidi, redkeje proteini). Ovoj imenujemo **kapsula** ali glikokaliks, ki je lahko tanka, debela, trdna ali fleksibilna, odvisno od narave kemijske zgradbe. Funkcija ovojev je raznolika: sodelujejo pri pripenjanju patogenih bakterij na gostitelja in varujejo bakterijsko celico pred izsušitvijo.

Bakterijska celica ima v citoplazmi še številne inkluzije, ki so obdane z lipidno membrano, da se med seboj ločijo v citoplazmi. To so rezervni materiali, kot so zrnca glikogena in polihidroksi-butirične kisline (PHB), zrnca polifosfatov (metakromatska zrnca), večja zrnca elementarnega žvepla, magnetosomi (kristalčki magnetita Fe_3O_4), zračni mehurčki (značilni za morske in jezerske bakterije – cianobakterije in nekatere vijolične in zelene bakterije).

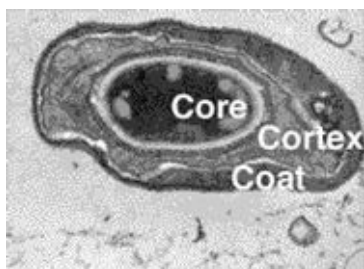
http://www.microbiologytext.com/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=66

1.4.1.7 Razmnoževanje in bakterijska endospora

Prokarionti nimajo opne, ki bi ovijala genetski material – bakterijski kromosom. Ti so povezani s citoplazmino membrano in lahko pri nekaterih bakterijah razvijejo membransko strukturo, imenovano **mezosom**. Mezosomi sodelujejo pri delitvi celice prokarionta. Mezosom – nagubana citoplazmina membrana – razdeli citoplazmo na dva dela – oblikujeta se dve hčerinski celici. Predhodno se genetski material- bakterijski kromosom podvoji. Po prerazporeditvi citoplazme in bakterijskega kromosoma nastaneta s pomočjo membranske strukture mezosoma dve celici.

Nekatere bakterije tvorijo znotraj svojih celic posebne strukture, ki jih imenujemo **endospore**. Endospore so zelo odporne na visoko temperaturo. Bakterije z endosporami najdemo najpogosteje v zemlji; katerikoli vzorec prsti bo vseboval kako sporigeno bakterijo. Odkritje endospor je bilo za mikrobiologijo izjemnega pomena. Znanje o termorezistentnih tvorbah je bilo nujno, saj so se na ta način lahko razvile ustrezne metode sterilizacije, bodisi bakterijskih gojišč, bodisi živilskih izdelkov. Rezistenca (odpornost) endospor se kaže tudi na vplive sušenja, radiacijo, kemijska razkužila

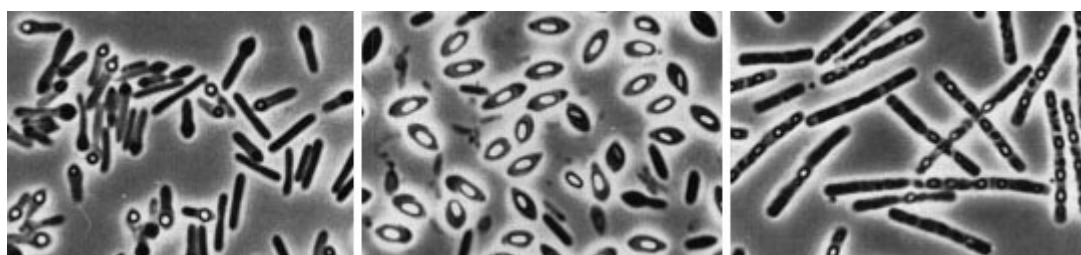
(<http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/BacterialStructure/CellWall.html>).



Slika 1.9: Zgradba bakterijske endospore - sredica, ovoj sredice in sporin plašč

Vir: <http://lecturer.ukdw.ac.id/dhira/BacterialStructure/CellWall.html>

Bakterijske endospore so vidne s svetlobnim mikroskopom. Ne moremo jih obarvati z navadnimi bazičnimi barvili. Struktura spore se razlikuje od strukture vegetativne celice. Je mnogo bolj kompleksna in večplastna: sestavljajo jo eksosporium – tanka prevleka, sporin plašč (kemijsko soroden celični steni), korteks – ovoj sredice in sredica. V sredici najdemo kemijsko snov, ki ni značilna za nobeno vegetativno celico – dipikolinično kislino.



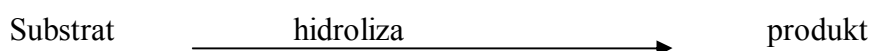
Slika 1.10: Bakterijske endospore (fazno kontrastna mikroskopija)

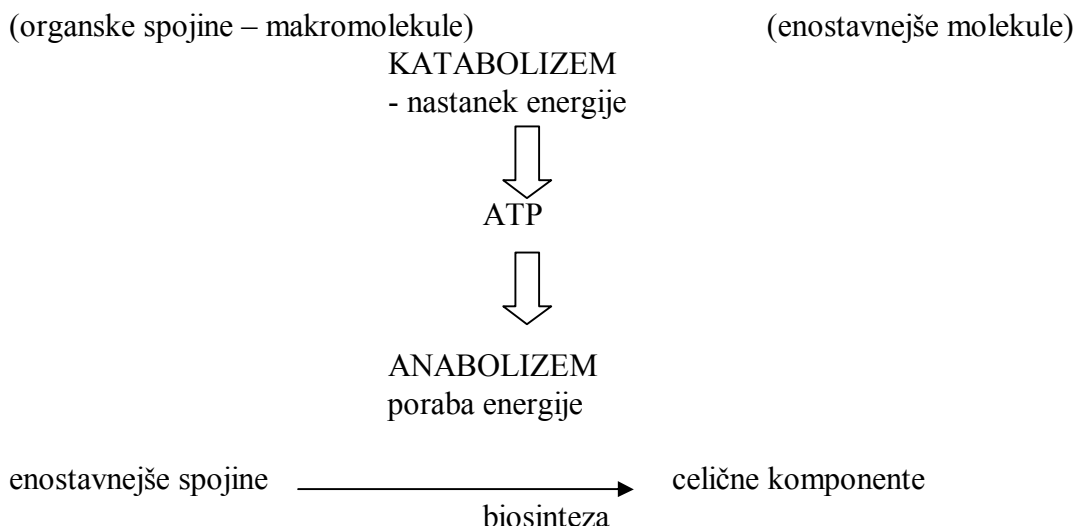
Vir.: Brock et al., 1999.

Za bakterijsko endosporo je značilno, da lahko ostane speča več let in se v ugodnih pogojih povrne v vegetativno celico. Ta proces se odvija v treh fazah: aktivaciji, germinaciji in formiranju vegetativne celice. Prva faza je inducirana s kakšnim zunanjim dejavnikom – toplota pri 70 °C. V drugi fazi spora izgubi trdoživost, postane dovzetna za barvanje in izgubi termorezistenco. Spora vidno nabrekne in njen plašč počni. Nova vegetativna celica se v tretji fazi sprosti iz sporinega plašča in se prične deliti (Brock et al., 1999).

1.4.2 Mikrobni metabolizem

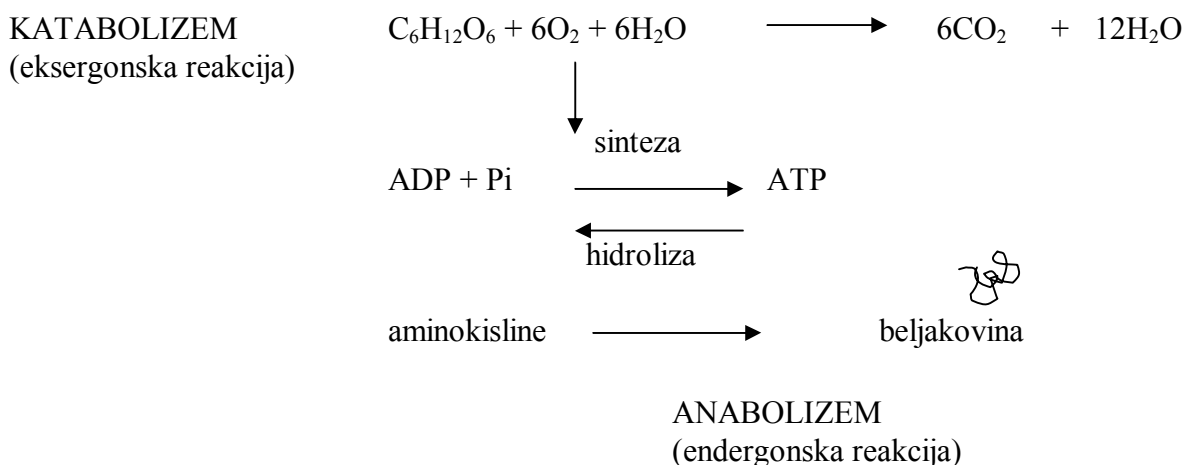
Vse aktivnosti živega organizma zahtevajo energijo. V majhni mikrobni celici potekajo številne biokemijske reakcije. Beseda metabolizem pomeni skupek vseh kemijskih in energetskih sprememb, ki se odvijajo v živih organizmih. Metabolizem ali spremembo snovi sestavljajo reakcije **katabolizma** (reakcije, kjer se energija ustvarja – reakcije hidrolize spojin) in **anabolizma** (reakcije, kjer se energija porablja – reakcije sinteze). V reakcijah katabolizma se razgrajujejo beljakovine, sladkorji in maščobe v enostavne molekule. Te enostavne molekule lahko nato sodelujejo v reakcijah anabolizma, v katerih se sintetizirajo encimi, strukturni proteini, nukleinske kisline, ogljikovi hidrati in ostale biokemijske spojine. http://en.wikipedia.org/wiki/Microbial_metabolism#Types_of_microbial_metabolism





Slika 1.11: Shema anaboličnih in kataboličnih reakcij in zakonitosti ATP
Vir: Marčič, 2000.

Primer:



Slika 1.12: Razgradnja glukoze do ogljikovega dioksida in vode
Vir: Marčič, 2000.

1.4.3 Celično dihanje in fotosinteza

V evkariontski celici opravljajo ti dve funkciji mitohondriji in kloroplasti; v prokariontu se odvijajo na ravni celične membrane, ki ima s pomočjo tvorbe mezosoma še povečano površino in več možnosti za celično dihanje in aktivni transport.

Dihanje ali respiracija pomeni oksidacijo izvora energije, kjer poteka tok elektronov k anorganskemu sprejemniku ob istočasnem skladiščenju energije v obliki ATP, ki se sprošča med prenosom elektronov. Prenašalci elektronov so večinoma citokromi (molekule z vezanim železom, ki sprejme elektrone z visoko energijo in jih predaja naslednjim citokromom v dihalni verigi, pri čemer se sprosti energija v obliki ATP). ATP je visokoenergetska fosfatna molekula, ki je v živih organizmih stalno prisotna. Služi kot glavni prenašalec energije v živih organizmih in se med reakcijami oksidacije in redukcije stalno obnavlja, v reakcijah biosinteze pa porablja. Dihalna veriga (transport elektronov) poteka pri prokariontih na površini celične membrane in mezosomov (Duraković, 1991).

Biokemijske metabolne poti, kjer gre za oksidacijo organskih snovi in ohranjanje energije z ATP lahko razdelimo na tri glavne skupine:

1. fermentacijo – oksidacija poteka brez elektronskega akceptorja (2 mol ATP),
2. respiracija - molekularni kisik služi kot končni akceptor (38 mol ATP) in
3. anaerobna respiracija – namesto kisika je sprejemnik elektronov nitratni, sulfatni ali karbonatni ion (2 mol ATP).

Fotosinteza je eden najpomembnejših bioloških procesov na Zemlji, v katerem se pretvarja sončna energija v kemijsko, ki se lahko nato uporabi za ustvarjanje celičnih struktur. Sposobnost fotosinteze je odvisna od prisotnosti zelenega pigmenta klorofila, ki ga vsebujejo tudi nekatere bakterije. V svetlobnih reakcijah fotosinteze se pretvarja svetlobna energija v kemijsko v obliki ATP (elektronski transport h akceptorju s pomočjo klorofila). V nočnih reakcijah se kemijska energija porablja za redukcijo CO₂ do sladkorja in vode (Duraković, 1991).

Tabela 1.3: Metabolični procesi heterotrofnih mikroorganizmov

Metabolični proces	Tip metabolizma	Procesi	Končni e-akceptor	Produkti	Vir energije	Tip mikroorg.
Fotosinteza	Anabolični	e- transport, fosforilacija	Klorofil, NADP ⁺	ATP, organske spojine	svetlobna	Fotosint. bakterije
Fermentacija	Katabolični	Glikoliza	Organske spojine	2ATP, CO ₂ , etanol, ml. kislina	Kemijska	Fakult. anaerobi, anaerobi, aerotoler.
Aerobno dihanje	Katabolični	Glikoliza, cikel TCA, e-transport	O ₂	38 ATP, CO ₂ , H ₂ O	Kemijska	Aerobne bakterije, fakult. anaerobi
Anaerobno dihanje	Katabolični	Glikoliza, cikel TCA, e- transport	Anorganske soli (NO ₃ , SO ₄ , CO ₃)	CO ₂ , ATP, organske kisline, H ₂ S, CH ₄	kemijska	Anaerobi, fakult. anaerobi

Vir: http://en.wikipedia.org/wiki/Microbial_metabolism#Types_of_microbial_metabolism
<http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/NutritionGrowth/Introduction.html>

1.5 PLESNI IN KVASOVKE

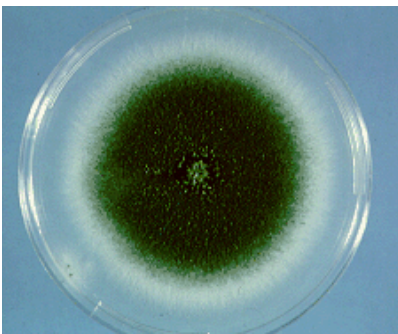
1.5.1 Plesni

Plesni so velika skupina gliv, zgrajenih iz celic brez klorofila. Poleg bakterij so v naravi najbolj razširjeni mikroorganizmi. So nitaste zgradbe (hife) in se v podlogi razraščajo mrežasto (micelij). Po splošni klasifikaciji jih delimo v plesni rastlin, plesni skladišč ter plesni kvarjenja. Delno jih klasificiramo in identificiramo po načelu septiranih (pregrajenih) ali neseptiranih hif (Karakasović et al., 1967).



Slika 1.13: *Aspergillus flavus*- mikroskopsko

Vir: www.mycology.adelaide.edu.au



Slika 1.14: *Aspergillus flavus*- na gojišču

Vir: www.mycology.adelaide.edu.au

1.5.1.1 Morfologija gliv

Po velikosti dosežejo od 1 do 30 μm . Delimo jih v enocelične in večcelične. Enocelične imajo običajno ovalno ali kroglasto obliko. Ne tvorijo hif, v gojišču pa rastejo v obliki kolonij, podobnih bakterijskim. Večcelične glive tvorijo velike večcelične agregate dolgih razvejanih filamentov – hif. Delno jih klasificiramo in identificiramo po načelu septiranih (pregrajenih) ali neseptiranih hif. Kolonije prepredenih hif imenujemo micelij.

Plesni lahko pridelujejo spolne in nespolne spore, ki imajo funkcijo razmnoževanja, širjenja in zaščite pred neustreznimi razmerami (Karaklašević et al., 1967, bugs.bio.usyd.edu.au/.../hyphalStructure.shtml).

Tabela 1.4: Nespolne in spolne spore pri plesnih

Nespolne spore	spolne spore
Klamidospore	askospore
Sporangiospore	bazidiospore
Artrospore	zigospore
Blastospore	oospore

Vir: Karaklašević et al., 1967.

1.5.1.2 Fiziologija gliv

Vse glive so heterotrofne (izvor energije in ogljika je organska snov). Hranijo se z ostanki mrtvih rastlin in živali v zemlji – saprofiti. Nekaj je parazitov. Prehranjujejo se tako, da prodirajo v substrat, ga razgradijo z encimi v manjše organske ali anorganske molekule, ki jih nato vsrkajo. Bolj kot drugi mikroorganizmi prenašajo neugodne ekološke dejavnike (temperaturo, pH). (Karaklašević et al., 1967).

Tabela 1.5: Primerjava lastnosti gliv z bakterijami

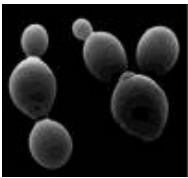
Lastnosti	glive	bakterije
PH	3 do 9	6 do 8
T	22-30°C (saprofiti) 30-37°C (paraziti) 15-25°C (kvasovke)	20-37°C
odnos do O ₂	aerobi (večina)	aerobi/ anaerobi
svetloba	neodvisne	fotosintetske bakterije
koncentracija sladkorjev v gojišču	4-5%	0,5-1%
celična stena	hitin, celuloza, glikan, peptidoglikan	
občutljivost na antibiotike	rezistentne na penicilin, tetraciklin..., občutljive na nistatin, polimiksin	obratno

Vir: Karaklašević et al., 1967.

1.5.2 Kvasovke

Morfologija kvasovk se popolnoma razlikuje od morfologije ostalih gliv. Osnovni tip celice je *blastospora* – kroglasta ali ovalna celica, ki se razmnožuje z brstenjem. Celična stena je zgrajena iz glikana ali glikana, beljakovin in hitina in daje celici zaščito. Plazmino membrano sestavlja fosfolipidni dvosloj s proteini na zunanji strani. V celičnem jedru je 13 kromosomov. Imajo naslednje celične organele: endoplazmatski retikulum, Golgijev aparat, ribosome, vakuole in glikogenska zrna (Karaklašević et al., 1967).

Razmnoževanje je lahko nespolno (z brstenjem in delitvijo - amitoza) ali spolno z *askosporami*. Na blastospori se razvija en ali več brstov, ki se odcepijo (2h), ko dosežejo velikost osnovne celice. V procesu spolnega razmnoževanja se pri kvasovkah razvijajo znotraj celice (askus) štiri ali več negibljive spore.



Slika 1.15: Brstenje kvasovk

Vir: www.mansfield.ohio-state.edu/.../image009.jpg

1.5.2.1 Fiziologija kvasovk

Kvasovke so prehransko heterogene. Kot vir ogljika lahko uporabljajo običajne sladkorje, organske kisline, etanol in druge alkohole. Dušik pridobivajo iz organskih (urea, aminokisline, dipeptidi, polipeptidi) in anorganskih virov (amoniak, nitrati, molekularni dušik) – (Karakašević et al., 1967).

POVZETEK

Kljub svoji majhnosti, imajo bakterijske celice močno molekularno kompleksnost. So osupljivo razumni majhni stroji. Celične strukture so zgrajene iz polimerov (velikih kompleksnih molekul). Ti polimeri so aminokisline, sladkorji, nukleinske kisline in maščobne kisline. Sekvence polimerov narekujejo njihovo zgradbo in funkcijo. Prokariot je organiziran v funkcionalne enote: (i) nukleoid organizira, prideluje in replicira DNA. (ii) Citoplazma je nosilka številnih celičnih reakcij, vključno z biosintezo (anabolizem) in katabolizmom. (iii) Ribosomi so sedež sinteze proteinov. (iv) Membrane definirajo celične meje in delujejo kot bariere številnim molekulam. (v) Celična stena definira obliko mikroba in jo ščiti pred vplivi okolja. Plesni in kvasovke se značilno razlikujejo od prokariotov; prve so večcelične, druge enocelični organizmi s kompleksno celično diferenciacijo (organeli).

ŠTUDIJSKA VPRAŠANJA

1. Kakšna je struktura in funkcija bakterijske celične stene?
2. Kakšna je funkcija citoplazmine membrane prokariota?
3. Opišite osnovne razlike med bakterijami in glivami!
4. Kakšno vlogo imajo strukture bakterijske celične površine v odnosu do gostitelja?
5. Kako poteka bakterijski metabolizem?
6. Na čem temelji G+ in G- klasifikacija bakterij?
7. Pojasnite razmnoževanje bakterij z endosporo in njihove lastnosti v ekologiji rasti mikroorganizmov!
8. Pojasnite strukturo in funkcijo citoplazmine membrane v transportnih procesih?
9. Kakšna je funkcija pilov in fimbrij pri bakterijah?
10. Definirajte razlike med vegetativno celico in bakterijsko endosporo!

2 ŽIVILSKA MIKROBIOLOGIJA

UVOD

Živila ne predstavljajo človeku samo izvora hranljivih snovi za rast, obstoj in razvoj, temveč so lahko substrat za razvoj mikroorganizmov. Nenadzorovana rast mikroorganizmov (MO) v hrani povzroča kvarjenje in škodo. Pomembno področje v mikrobiologiji živil je poznavanje in razumevanje procesov kvarjenja ter razvoj tehnik za zaščito živil. Posebno pomembno je preprečevanje onesnaženja živil s patogenimi MO, ki lahko pridelujejo toksine in z zaužitjem povzročajo zastrupitev gostitelja (Pokorn, 1990, Jay, 2000).

Obvladovanje in preprečevanje razvoja MO v živilih kot povzročiteljev zastrupitev s hrano mora biti osnovna naloga odgovornih v procesu predelave živil. Rast MO lahko spremeni kakovost izdelkov in povzroča znatno gospodarsko škodo. Poleg negativnih vidikov rasti MO v predelavi živil pa so nekateri MO koristni in sodelujejo v procesih pridelave cele palete mlečnih, rastlinskih, pekarskih izdelkov ter v tehnologijah vin ter piva. V tem primeru je rast in pridobivanje mikrobne mase za izdelavo določenih živil koristno in zaželeno (Pokorn, 1990).

2.1 PRIMARNI IZVORI V ŽIVILIH ŽIVEČIH MIKROORGANIZMOV

Zemlja in voda – MO teh dveh naravnih okolij so ponavadi prebivalci obeh hkrati; MO zemlje vstopajo v atmosfero z vetrom in se vračajo na zemljo z dežjem. V vodi živeči MO skozi oblake in dež prehajajo na zemljo. V vodi najdemo pogosto predstavnike rodov *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella* in *Escherichia coli*.

Gostota MO na površini tal je ponavadi večja kot v globini in je odvisna od klimatskih pogojev. V tleh najdemo najpogosteje predstavnika rodov *Bacillus* in *Clostridium* (Pokorn, 1990).

Rastline in njihovi produkti - Številni MO iz zemlje, vode, zraka in iztrebkov kontaminirajo rastline. Te morajo imeti sposobnost pripenjanja na rastlinske dele, da lahko rastline zagotovijo njihove prehranske zahteve. Takšne vrste MO so nekatere mlečno kislinske bakterije in nekatere kvasovke (*Saccharomyces*, *Hansenula*, *Torulopsis*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Kloeckera*). Rastlinska živila so ponavadi tudi prenašalci klostridijev in enterobakterij ter skoraj vseh vrst plesni.

Orodja, posoda, oprema v manipulaciji živil – vsebuje na površini začetno število mikroorganizmov, ki se lahko prenaša iz predhodnih vsebin (odpornost na razkužila) na sveža živila bodisi s polnjenjem, rezanjem, mletjem in drugimi postopki priprave. Mikrobne združbe na orodju, posodah in strojih so ponavadi specifične in različne, glede na naravo proizvodnje. Značilno je, da je ta mikroflora običajno odporna na razkužila, ki se uporabljajo v proizvodnem procesu, zato je posebnega pomena tudi izbira in zamenjava razkužil v določenem proizvodnem obratu.

Prebavila živali in človeka – kadar so iztrebki v vodi vir onesnaženja vode, s katero peremo surova živila. V vodi lahko pričakujemo vse enterobakterije, vključno s salmonelami ter nekatere protozoje. Živali so potencialni prenašalci patogenih MO in tehnoloških kvarljivcev, saj so MO prisotni v prebavnem traktu, sluznicah, na koži, dlaki, perju ter v procesu predelave prehajajo na živila.

Delavci v živilski verigi - MO na rokah delavcev z živila je odsev njihovih higienskih navad, zato so lahko na rokah MO z različnih življenjskih okolij (voda, zemlja, prah, nosna votlina, usta, koža ali prebavila). Če delavci delajo v skladu s kodeksi dobre higienske prakse, lahko preprečijo prenos MO na živila.

Krmila - še zmeraj lahko predstavljajo potencialni vir patogenih bakterij (*salmonel*) v integralni reji piščancev in drugih farmskih živali. Nepravilno silirana krma je lahko izvor *Listerie monocytogenes* pri govedu.

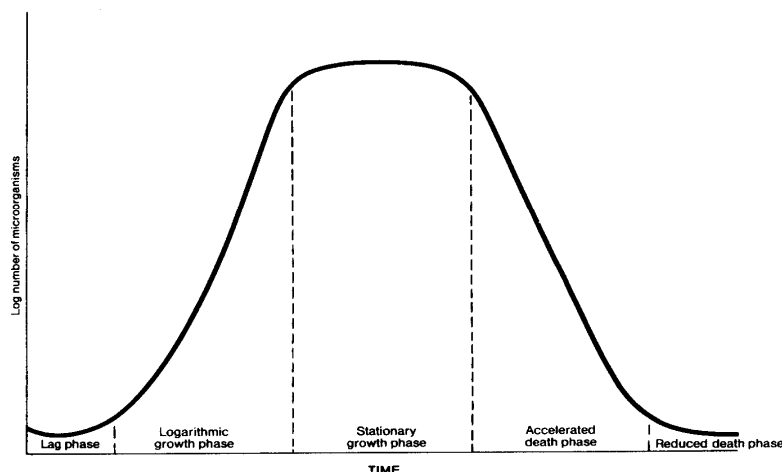
Živalska koža – je lahko vir onesnaženja z mikroorganizmi zlasti v procesu pridobivanja mleka, če delavci ne upoštevajo higienskih navodil. MO s kože živali prehajajo na molzne naprave, posode za mleko, roke zaposlenih, torej na celovito delovno okolje.

Zrak in prah - v splošnem preživljajo v prahu in zraku G+ bakterije ter nekatere plesni in kvasovke. Izvor plesni je ponavadi razpadajoč rastlinski material na površini tal. Prevladujejo rodovi kot so *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* in *Fusarium*. Zrak pri tleh je vedno močnejše kontaminiran kot v višjih legah. Kvasovke so v zraku nekoliko močnejše zastopane v vinorodnih območjih (Pokorn, 1990, Duraković, 1991, Jay, 2000).

2.2 KINETIKA MIKROBNE RASTI

Mikroorganizmi se razmnožujejo po načelu delitve celic in sledijo vzorec tipične rastne krivulje v štirih fazah.

The Relationship of Microorganisms to Sanitation



1 Typical growth curve for bacteria.

Lag faza je obdobje prilaganja mikrobne asociacije na novo okolje. Lahko je daljša, če hranimo surovine na nizki temperaturi. Temperatura je najpomembnejši fizikalni dejavnik trajanja lag faze.

Slika 2.1: Tipična krivulja bakterijske rasti

Vir: Marriot, 1999.

Faza logaritmične rasti je faza intenzivnega deljenja celic na dve enakovredni hčerinski celici. Kako dolga bo logaritmična faza je odvisno od pogojev okolja (T, hranilne snovi itd.), 2 ali več ur.

Stacionarna faza ali faza uravnotežene rasti nastopi, ko so hranila že omejena in ko kakšna druga mikrobnna populacija izrine prvotno. Rast postane počasnejša, konstantna. V tej fazi je število mikroorganizmov dane populacije največje. Faza običajno traja 24 ur do 30 dni, odvisno od razpoložljive energije za vzdrževanje celičnega življenja.

Pospešena faza odmiranja je posledica izčrpanih hranilnih snovi, delovanja metaboličnih produktov na biomaso in preraščanja drugih mikrobnih populacij. Pospešena faza odmiranja je podobna logaritemski fazi rasti in lahko traja od 24 ur do 30 dni, odvisno od dejavnikov okolja in narave mikrobne populacije.

Faza odmiranja je nasprotna lag fazi. Je končna faza pospešenega odmiranja, mikrobnna populacija se je zmanjšala na nivo začetne kontaminacije (Marriot, 1999).

2.3 POJAVNOST IN RAZVOJ MIKROORGANIZMOV MED PREDELAVO

Vrste mikroorganizmov in njihovo število v končnem izdelku je odvisno od štirih dejavnikov:

- od okolja, v katerem je bil izdelek proizveden,
- mikrobiološke kakovosti uporabljenih surovin,
- higienskih razmer proizvodnje in manipulacije z izdelkom in
- ustreznih pogojev manipulacije po pakiranju (pogoji skladiščenja).

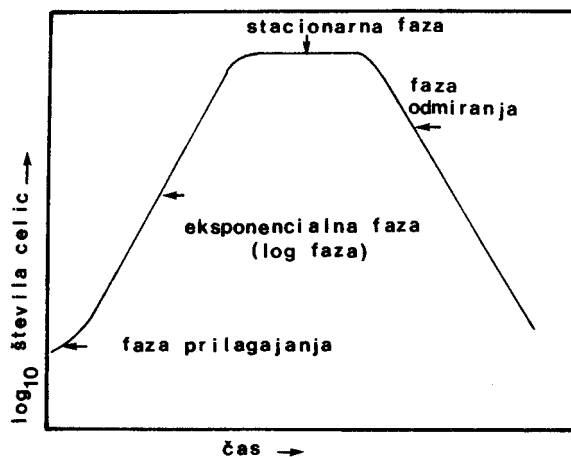
V želji po izdelavi živil visoke kakovosti, si proizvajalci prizadevajo obvladovati MO iz več razlogov: estetskih, varovati porabnikovo zdravje ter podaljšati čas obstojnosti izdelkov. Razen živil, ki so proizvedena sterilno, vsa živila vsebujejo določeno število MO različnih vrst. Število MO na končnem izdelku nam odseva celovite pogoje priprave: predelavo, manipulacijo, skladiščenje, hlajenje in drugo. V mikrobiologiji živil nam splošni mikrobiološki status nekega izdelka pove **skupno število bakterij**. Napredek v moderni tehnologiji omogoča proizvajalcem izdelavo prehrabnenih izdelkov, ki so vedno manj mikrobiološko obremenjeni, zato se zakonsko določena (ki je za posamezne proizvode različna) spodnja meja zaznavanja skupnega števila mikroorganizmov v analizi živil dinamično znižuje (Pokorn, 1990).

Vir hrane za človeka so rastline in živali, zato so tudi mikroorganizmi v živilih izvorno rastlinski in živalski. Po svojem izvoru so talni ali vodni in se pojavljajo v **saprofitski** (prebavljajo nežive organske snovi – praviloma nepatogeni) in **parazitski** (zajedalski) obliki. Iz vode in zemlje prehajajo na rastline, nato v prebavila živali in ljudi, nato nazaj v vodo in zemljo; tako je krog prehajanja sklenjen. Mikroorganizmi s svojo fiziološko dejavnostjo kvarijo živila. Kateri mikroorganizmi bodo povzročili kvarjenje je odvisno od vrste živila, naravne mikroflore surovin ter pogojev skladiščenja surovin in izdelkov (Pokorn, 1990).

Rast in razvoj mikrobne populacije med predelavo lahko razdelimo v štiri faze:

Primarna faza poteka v obdobju pred predelavo – označuje mikrobni status surovine, ki vstopa v tehnološki proces predelave. V tej fazi prevladuje naravna mikroflora, ki jo surovine prinesejo s seboj. S skrbnim mikrobiološkim nadzorom surovin si ovrednotimo njihovo kakovost, ki nam služi kot izhodišče za pravilno skladiščenje surovin in vodenje proizvodnje (v sodobnih tehnologijah in obvladovanju kakovosti nam mikrobiološke parametre zagotavljajo certifikati dobaviteljev).

Sekundarna faza je obdobje rasti in razmnoževanja MO od statusa surovin do časovne točke, ko s toplotnim postopkom zmanjšamo njihovo število. Ta faza je pogosto v proizvodnji kritična, saj se odvija prepočasi, surovine se hranijo na neprimernih temperaturah; mikrobnna populacija preide po Monodovi rasti krivulji iz latentne (mirujoče) v eksponencialno (faza intenzivnega razmnoževanja) fazo rasti.



Slika 2.2: Monodova rastna krivulja

Vir: Pokorn, 1990.

$$N_t = N_0 \cdot 2^N$$

Enačba nam pove, kakšno bo število celic v času t , ob začetnem številu N_0 , kjer je N število delitev oz. število mikrobnih generacij. Pri bakterijah znaša generacijski čas pri temperaturi 35 °C 20 do 40 minut, pri kvasovkah pa 1 do 2 uri. Surovine, ki vstopajo v predelavo z visoko začetno kontaminacijo moramo čim hitreje predelati, saj se v 1 uri lahko mikrobnna populacija podvoji ali tri krat poveča.

V terciarni fazi (fazi tehnološke predelave) si prizadevamo, da s posebnim tehnološkim postopkom (toplotno obdelavo, zmrzovanjem, konzerviranjem, sušenjem) mikroorganizme v nastajajočem izdelku omejimo ali uničimo. Za tehnologe je ta faza izredno pomembna, saj zahteva veliko izkušenj in spretnosti pri varovanju že obdelanih živil pred ponovno okužbo, bodisi s surovino, orodji, stroji ali z embalažo, zaposlenimi ali transportom.

Kvartarna faza po tehnološki obdelavi nastopi med skladiščenjem, transportom in v tržni mreži. V tej fazi prevladuje že selekcionirana mikrobnna populacija, ki je preživela specifičen tehnološki postopek. Tudi to mikrobnno populacijo moramo kvalitativno in kvantitativno ovrednotiti. Pomagamo si z zakonsko določenimi normativi za posamezne skupine živil, ki določajo minimalne vrednosti higienskih indikatorjev, patogenih bakterij ter skupno število saprofitne mikroflore v izdelku. Ti podatki nam povedo, kakšna bo obstojnost izdelka in kakšen režim skladiščenja moramo izbrati (Pokorn, 1990).

2.4 EKOLOGIJA RASTI MIKROORGANIZMOV

Hrana, ki jo uživamo je rastlinskega in živalskega izvora, zato predstavljajo rastlinska in živalska tkiva tisto ekološko sredino, v kateri se bo mikrobnna populacija razvijala. Rastline in živali, ki služijo kot izvor hrane imajo obrambne mehanizme pred vdorom mikroorganizmov, ki

se ohranjajo tudi v fazi svežega živila. Če upoštevamo ta naravni fenomen, lahko uspešno varujemo živila in upočasnimo kvarjenje, ki jih povzročajo mikroorganizmi (Duraković, 1991).

2.4.1 Splošne zahteve mikroorganizmov po hrani

Rast, gibanje, metabolične aktivnosti (prenos snovi), sinteza beljakovin in ostali celični procesi zahtevajo energijo. Najosnovnejša zahteva MO je potreba po ogljiku, ki je temeljni gradbeni element celice.

Glede na izvor energije, ki ga MO izrabljajo jih razdelimo na **fototrofne** in **kemotrofne**. Fototrofni MO pridobivajo energijo s sončno energijo preko procesa fotosinteze. Kemotrofi pridobivajo energijo s cepljenjem organskih spojin (sladkorjev, aminokislin).

Organizme klasificiramo tudi glede na naravni izvor ogljika. **Heterotrofni** MO izkoriščajo organske izvore ogljikovih spojin in dobro rastejo v vsakem okolju. **Autotrofni** MO sintetizirajo skoraj vse bistvene organske snovi iz anorganskih izvorov ogljika. Najbolje uspevajo v tleh in vodah. Tretja skupina so obligatni celični paraziti - **hipotrofi** in uspevajo znotraj celice gostitelja. Med hipotrofe prištevamo vse viruse, rikecije in klamidije (Duraković, 1991). Na osnovi zgornje klasifikacije MO razdelimo v štiri tipe, ki jih prikazuje tabela:

Tabela 2.1: Tipi mikroorganizmov glede na izvor energije in ogljika

skupina	izvor energije	izvor ogljika	tipični predstavniki
fotoavtotrofi	svetloba	CO ₂ organske	alge, fotosintetične bakterije
fotoheterotrofi	svetloba	snovi	fotosintetične bakterije
kemoavtotrofi	anorganske	CO ₂	bakterije, ki oksidirajo žveplo, železo in amoniak, metanogene bakterije
kemoheterotrofi	organske spojine	organske spojine	praživali, glive, večina bakterij

Vir: <http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/NutritionGrowth/Introduction.html>

Rast mikrobne populacije je odvisna od mnogih dejavnikov, ki jih razdelimo v tri skupine:

- intrinzične ali notranje,
- ekstrinzične ali zunanje in
- implicitne.

2.4.2 Intrinzični ali notranji parametri (notranjost živila)

So tisti parametri, ki se nanašajo na fizikalne, kemijske in biološke lastnosti rastlinskega in živalskega tkiva, ki služi kot živilo.

pH vrednost - ali negativni logaritem aktivnosti oksonijevih ionov (H₃O) določa, kakšna bo sestava mikrobne združbe v živilu. Naravna kislost živil, ki jo merimo z aktivnostjo oksonijevih

ionov je tista, ki selekcionira mikrobnno asociacijo. V splošnem velja, da so bakterije aktivne v območju pH – 4,5 do 10, plesni med 0 do 11 in kvasovke v območju 1,5 do 8,5 (Jay, 2005).

Tabela 2.2: Približne pH vrednosti nekaterih živil

Živilo	pH	živilo	pH
fižol	4,6 do 6,5	jabolka	2,9 do 3,3
brokoli	6,5	banane	4,5 do 4,7
zelje	5,4 do 6,0	smokve	4,6
korenje	4,9	pomaranče	3,6
koruza	7,3	melone	6,3 do 6,7
olive	3,7	slive	2,8 do 4,6
maslo	6,1 do 6,4	govedina	5,1 do 6,2
mleko	6,3 do 6,5	šunka	5,9 do 6,1
sir	4,9 do 5,9	piščanec	6,2 do 6,4
ribe	6,6 do 6,8	raki	7,0
ostrige	4,8 do 6,3	tunina	5,2 do 6,1

Vir: Jay, 2000.

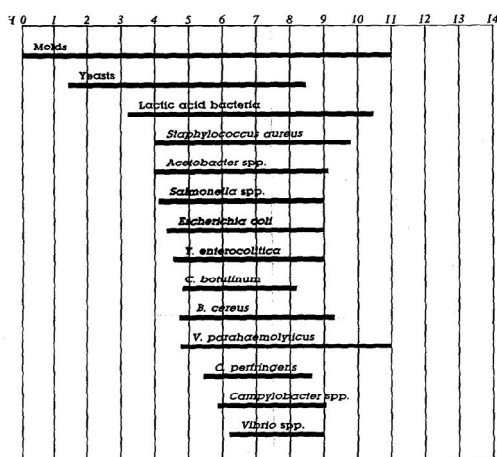


FIGURE 3-1. Approximate pH growth ranges for some foodborne organisms.

Slika 2.3: Približne vrednosti pH za nekatere mikroorganizme živil

Vir: Jay, 2000.

Aktivnost vode ali a_w – vrednost – nekega živila je poleg temperature najpomembnejši fizikalni dejavnik rasti in razvoja MO v živilu. Voda v živilu predstavlja topilo za številne organske in anorganske snovi in je mikroorganizmom potrebna za aktivni in pasivni transport snovi skozi membrane. Intenzivnost življenjskih procesov pri MO je odvisna od razpoložljive vode. Vodna aktivnost je izražena kot razmerje med parnim tlakom živila in parnim tlakom topila – vode pri konstantni T:

$$a_w = \frac{p}{p_o}$$

p = parni tlak živila
p_o = parni tlak topila (vode)

Za sistem v ravnotežju je a_w vrednost enaka :

$$a_w = \frac{RV \%}{100}$$

RV = relativna vlažnost

100

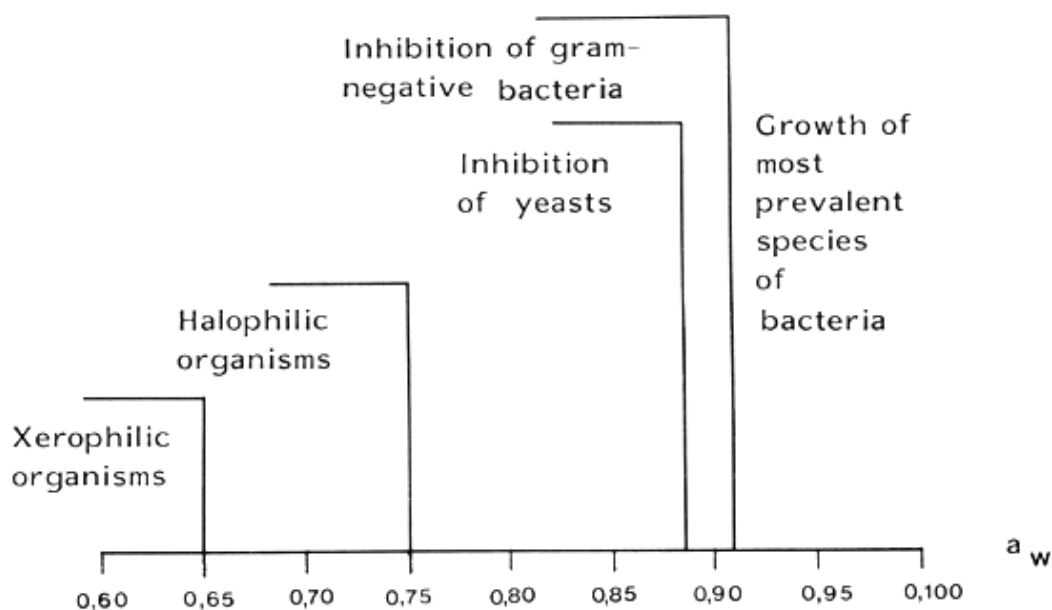
$$\%RV = a_w \times 100$$

Vodna aktivnost ima selektiven vpliv na rast MO in je v večini svežih živil nad 0,99. V splošnem velja, da bakterije zahtevajo višje vrednosti a_w za rast kot glive in G- bakterije zahtevajo višje vrednosti kot G+. Večina kvarnih bakterij ne raste pod 0,91, medtem kot večina kvarnih kvasovk raste tudi pri 0,80. Pravilo aktivnosti plesni in kvasovk v širšem pH območju kot aktivnost bakterij velja tudi pri aktivnosti v povezavi z a_w – vrednostjo (Pokorn, 1990, Jay, 2005).

Tabela 2.3: Približne min. a_w vrednosti za rast za živila pomembnih MO

Skupina	a_w		
Večina kvarnih bakterij	0,9	halofilne bakterije	0,75
Večina kvarnih kvasovk	0,88	kserofilne plesni	0,61
Večina kvarnih plesni	0,80	osmoofilne kvasovke	0,61
Specifični MO	a_w		
<i>C. botulinum</i> tip E	0,97	<i>Candida utilis</i>	0,94
<i>Pseudomonas</i> spp.	0,97	<i>Botrytis cinerea</i>	0,93
<i>E. coli</i>	0,96	<i>Rhizopus stolonifer</i>	0,93
<i>E. aerogenes</i>	0,95	<i>Mucor spinosus</i>	0,93
<i>Bacillus subtilis</i>	0,95	<i>S. aureus</i>	0,86
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	0,94	<i>Aspergillus glaucus</i>	0,70

Vir: Jay, 2000.

Slika 2.4: Približne min. a_w vrednosti za rast za živila pomembnih MOVir: www.fao.org/docrep/003/x6556e/X655639.gif

V živilski tehnologiji običajno vrednosti vode ne izražamo z vodno aktivnostjo, temveč kot vlago živil. Če želimo vlago v živilu preračunati v vodno aktivnost se poslužujemo sorpcijskih izoterm (SI). SI je funkcija, ki je odvisna od intenzivnosti vezave vode v živilu pri določeni T.

Znano je namreč, da imajo maščobe minimalno kapaciteto vezave vode, prav tako celuloza; škrob in sladkorji pa veliko sposobnost vezave vode (Pokorn 1990, Jay 2005).

Oksido-redukcijski potencial (O/R, Eh) živila – je merilo za sposobnost substrata (živila), da sprejme ali odda elektrone (oksidacijo in redukcijo). Če neka spojina v substratu zgubi elektrone se oksidira, spojine, ki elektrone sprejmejo pa se reducirajo. Pri tem prehodu elektronov nastane med spojinama razlika v potencialu, ki ga merimo v mV. Oksidirane spojine imajo pozitiven el. potencial, reducirane pa negativnega. O/R potencial je odvisen od kemijske sestave živila in od parcialnega tlaka kisika v sestavu plinske faze živila (Pokorn, 1990, Jay, 2005).

Mikroorganizme lahko glede na O/R odnos razdelimo v:

- aerobne MO, ki potrebujejo za rast veliko kisika in visoko pozitivno vrednost el.potenciala (med +350 do 500 mV),
- mikroaerofilne MO, ki potrebujejo za rast majhne količine O₂ (nekateri streptokoki, kampilobaktri, *Haemophilus spp.*) – 50 do +50 mV,
- obligatne ali striktno anaerobe, ki rastejo le v odsotnosti kisika (klostridiji) – pod –150 mV in
- fakultativne anaerobe, ki lahko rastejo brez ali s kisikom, vendar imajo intenzivnejšo rast s kisikom (-100 mV do 350 mV).

Rastlinska živila imajo relativno visok O/R, zato jih kvarijo aerobne kvasovke in plesni. Meso v večjih kosih ima nizek O/R potencial, ki omogoča rast striktnim anaerobom, zmleto meso in površina mesnih izdelkov pa ima visok pozitivni O/R, ki omogoča aktivnost aerobnih bakterij. Mikroorganizmi sami s svojim metabolizmom spreminjajo O/R potencial v živilih. Aerobne bakterije potrebujejo za rast kisik; ko ga v substratu izrabijo, O/R substrata pade. Rast anaerobov ima za posledico povečanje O/R v živilu (Pokorn, 1990, Jay, 2005).

Hranilna sestava živila bistveno vpliva na razvoj mikrobne združbe v živilu. Hranilne snovi, ki jih mikroorganizmi izrabljajo za rast in razvoj so: voda, sladkorji in škrob – ogljikovodiki (izvor energije), beljakovine (izvor dušika), vitamini in sorodni dejavniki rasti ter minerali.

Pomen vode smo že pojasnili pri pojmu aktivnosti vode. Do ostalih štirih elementov v sestavi živila imajo plesni najmanjše zahteve, nato kvasovke, G – bakterije in nato G + bakterije.

V živilih MO za izvor energije izrabljajo sladkorje, alkohole in beljakovine. Nekateri so sposobni izkoriščati tudi kompleksnejše molekule - škrob, celulozo in maščobe. Za vir dušika izkoriščajo nukleotide in proste aminokisliline ali kompleksnejše peptide in proteine (Jay, 2000).

Antimikrobne sestavine so naravni inhibitorji rasti mikroorganizmov v živilih. Inhibicija rasti poteka na različne načine: zavirajo biosintezo celične stene in metabolične procese v celicah MO ali poškodujejo citoplazmno membrano. Ti inhibitorji so prisotni v živilih rastlinskega in živalskega izvora in jih imenujemo **bakteriostatični** dejavniki in **baktericidi**.

Jajca – vsebujejo *lizocim*, ki lizira celične stene G + bakterij in *ovomukoid*, ki zavira sintezo proteinaze plesni.

Mleko – vsebuje *levkocite* in *fagocite*, ki presnavljajo MO ter nekatere proteine ter *encime*, ki delujejo proti streptokokom in enterobakterijam.

Meso – vsebuje prav tako lizocim kot jajca, razna protitelesa in hormoni pa imajo podobno funkcijo. V mesu so odkrili *poliamine*, ki so aktivni inhibitorji številnih bakterij in virusov.

Rastlinska živila – poleg lizocima vsebujejo številne višje alkohole, organske kisline, glikozide, polifenole, barvila in taninske spojine, ki delujejo antimikrobno (Jay, 2000).

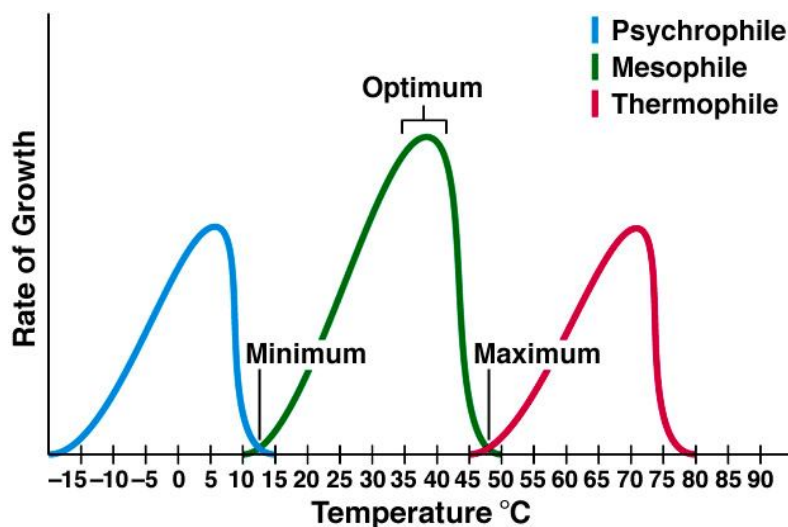
Biološke strukture - naravna, neobdelana živila lahko predstavljajo oviro za vdor MO v živilo. To so naravne zaščitne povrhnjice kot so lupine pri jajcu, ribje luske, mišične ovojnice pri živalskih tkivih, ovojnice semen in lupine sadežev. Če te povrhnjice pri obiranju in predelavi poškodujemo, so živila izpostavljena hitremu kvarjenju (Jay, 2000).

2.4.3 Ekstrinzični ali zunanji parametri (okolje, v katerem je živilo)

So tisti pogoji, ki vladajo v okolju in vplivajo na živila in mikrobne združbe v živilu. Najpomembnejši so:

Temperatura - mikroorganizmi rastejo v razmeroma širokem temperaturnem razponu. Vsak MO ima svojo minimalno, optimalno in maksimalno temperaturo rasti, kar nam omogoča izbrati pravo temperaturo med proizvodnim procesom in v času skladiščenja. Glede na temperaturne pogoje rasti deli mikrobiologija MO na tri osnovne skupine:

- na fakultativne (med 35 in 50 °C) in obligatne termofile (med 50 °C in 80 °C). Psihrofilni rastejo pri nižjih T, v območju od – 15 °C do 20 °C. Psihrotrofi, ki jih najdemo v živilih so najpogosteje iz rodov *Pseudomonas* in *Enterococcus* ter se uspešno razmnožujejo na T hladilnika. Povzročajo kvarjenje mesa, rib, perutnine, jajc in drugih živil, hranjenih na nižji temperaturi.
- mezofilni MO rastejo v srednjem temperaturnem območju, med 20 °C in 45 °C. Delimo jih v dve podskupini: v saprofitne mezofilne MO z območjem rasti med 20 °C in 35 °C ter patogene mezofilne MO, z območjem rasti med 35 °C in 45 °C. Tipični predstavniki so *laktobacili* in *stafilokoki*,
- termofilni MO rastejo pri višjih T v območju med 35 °C in 80 °C (Pokorn, 1990, Jay, 2005).



Slika 2.5: Temperaturna območja rasti mikroorganizmov
Vir: www.bmb.psu.edu/.../micro107/notes/tempcurv.jpg

Kritični temperaturni območji pri predelavi in shranjevanju živil sta med **20 °C in 25 °C ter med 35 °C in 45 °C**, zato se jih v procesu izogibamo. Najpomembnejša rodova termofilnih bakterij sta rod *Bacillus* in *Clostridium*, čeprav je le nekaj vrst teh dveh rodov termofilnih.

Temperatura skladiščenja ali zadrževanja surovin v procesu ima neposreden vpliv na razmnoževanje MO (generacijski čas) in na mikrobiološko kakovost surovin ali končnih izdelkov (Pokorn, 1990).

Spodnja tabela prikazuje sposobnost razmnoževanja tudi pri T zmrzovanja, kar je značilnost prihrofilnih bakterij. Vpliv temperature na mikrobiološko kakovost in obstojnost surovin in živil je izrazitejši pri relativno visoki začetni vrednosti skupnega števila bakterij. Za čas obstoynosti surovin in končnih izdelkov so torej bistvenega pomena trije soodvisni dejavniki – začetno skupno število bakterij, temperatura in čas izpostavljenosti pri določeni temperaturi.

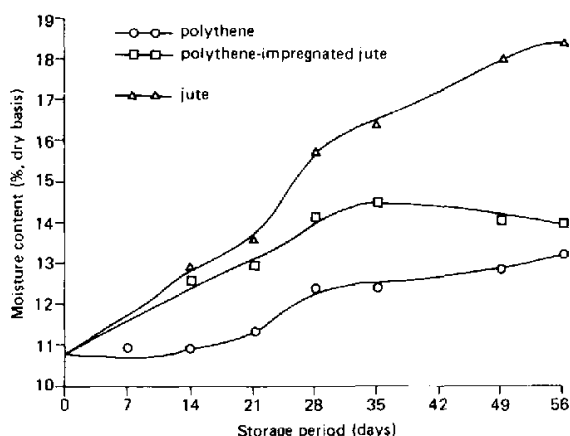
Tabela 2.4: Vpliv temperature in časa na razvoj mikrobne združbe

Bakterije se podvojijo (čas)	T (°C)
Vsake pol ure	32 °C
vsako uro	21 °C
vsaki 2 uri	16 °C
vsake 3 ure	10 °C
vsakih 6 ur	5 °C
vsakih 20 ur	0 °C
vsakih 60 ur	-2 °C

Vir: Pokorn, 1990.

Razlike v mikrobni asociaciji, ki se razvijejo pri različnih temperaturah skladiščenja imajo velik vpliv na biokemijske procese pri kvarjenju živil (Pokorn, 1990).

Relativna vlaga - skladiščnega prostora je pomembna za rast MO v živilu. V splošnem velja, da je za razvoj bakterij optimalna relativna vlaga 91 %, za kvasovke 88 % in za plesni 80 %. Če je predpisana a_w vode nekega živila zelo nizka, je pomembno, da živilo skladiščimo pri nizki relativni vlagi prostora in s tem preprečimo izmenjavo vode med živilom in okoljem (**migracijo vode**). Če ga izpostavimo višji relativni vlagi prostora bo živilo vpijalo vlago iz okolja, dokler ne bo doseglo ravnotežja z vlago okolja. Če hranimo živila z visoko vodno aktivnostjo pri nizki relativni vlagi, izgubljajo vodo, se izsušijo in izgubijo svojo kakovost. Hitrost migracije vode med živilom in okoljem je odvisna od konsistence in vodne aktivnosti živila. Pri praškastih živilih je izmenjava hitra, pri večjih kosih pa počasnejša in omejena na površino živila. Kadar hlajena živila izpostavimo toplejšemu zraku, pride do površinskega vodnega efekta kondenzacije, ki ga imenujemo rosenje ali potenje živil. Pri mesu povzroča sluzavost na površini, pri sadju in zelenjavi pa pospešuje razvoj plesni na površini plodov (Pokorn, 1990, Jay, 2005).



Slika 2.5: Vpliv vrste embalaže na migracijo vode v suhi snovi

Vir: www.unu.edu/Unupress/food/8F061e/8F061E0C.GIF

Ravnotežje plinov v okolju - je pomembno za razvoj mikrobnih združb v živilu. Najpomembnejši je parcialni tlak kisika (pO_2), ki vpliva tudi na O/R potencial živila. Številne raziskave so pokazale, da plesni in aerobne bakterije dobro uspevajo na površinah, ki so izpostavljene kisiku (50 do 100 mmHg), lahko pa se razmnožujejo tudi pri parcialnem tlaku 2 do 6 mm Hg. Še tako majhne količine kisika lahko v anaerobnem sistemu povzročijo razvoj aerobnih mikroorganizmov. Z uporabo modificirane atmosfere lahko podaljšamo rok obstojnosti živilom. Za skladiščenje sadja in zelenjave uporabljamo atmosfero s pribl. 10 % CO_2 , ki zavira razvoj številnih plesni in bakterij, ki povzročajo gnitje. Specifični inhibitorni učinek ogljikovega dioksida je odvisen od pH živila in temperature in je večji v živilih z nižjim pH, skladiščenih pri temperaturi hlajenja. Nekatera živila lahko skladiščimo v atmosferi z nekaj ppm ozona (O_3), ki kot močan oksidant zavira razvoj anaerobov (Jay, 2005).

2.4.4 Implicitni parametri

Se nanašajo na sestavo mikrobne združbe v živilu in na medsebojno delovanje posameznih predstavnikov mikrobne združbe.

Sinergizem imenujemo pojav, kadar ena vrsta mikroorganizmov ustvari pogoje za razvoj drugih vrst.

Antagonizem je pojav, kjer neka vrsta mikroorganizmov ustvari s svojo aktivnostjo take spojine, ki zavirajo razvoj drugih vrst (CO_2 , H_2O_2 , antibiotiki, bakteriocini).

Kompetitivna inhibicija, je pojav kjer posamezni predstavniki mikrobne združbe v živilu tekmujejo za izkoriščanje istega substrata. Odločilen je generacijski čas. MO s krajšim generacijskim časom prerastejo predstavnike z daljšim generacijskim časom (Pokorn, 1990).

POVZETEK

Živila predstavljajo substrat za rast in razvoj mikroorganizmov. Izvori MO so povsod: rastline, živali, človek, orodja, krmila, zemlja, voda. MO se razmnožujejo skladno z rastnimi pogoji po načelu eksponencialne (logaritemske) rasti. Glede na izvor energije in ogljika jih razdelimo v štiri skupine.

Ekološke (rastne) pogoje razdelimo v dve veliki skupini:

- notranje (intrinzične - vrednost pH, vodna aktivnost, O/R potencial, hranilna sestava, protimikrobne sestavine, biološke strukture) in so odraz integritete živila ali surovine in
- zunanje (ekstrinzične - temperatura, relativna vlaga, ravnotežje plinov v okolju) in so odraz pogojev, v katerem se nahaja živilo ali surovina.

3 VPLIV MIKROORGANIZMOV NA KVARJENJE ŽIVIL

UVOD

MO s svojo **metabolično** aktivnostjo kvarijo živila. Bakterijski **metabolični produkti** se skladiščijo v notranjosti bakterijske celice ali pa se sproščajo v okolje (substrat- živilo). Kvarjenja ne povzročata celotna mikrobna populacija, temveč njen majhen del. Kateri mikrobni indikatorji bodo povzročili kvarjenje je odvisno predvsem od vrste živila, od sestave mikrobne populacije in od ekoloških parametrov rasti, ki delujejo na mikrobno populacijo. V splošnem velja, da živila predstavljajo dober medij za razvoj večine MO. Vrsta in obseg kvarjenja je odvisna od hranilne sestave živila. Živilo, sestavljeno iz hranilnih snovi iz preprostih molekul se hitreje kvari kot živilo, ki vsebuje sestavljene molekule beljakovin in ogljikovih hidratov, ki jih morajo MO razgraditi z lastnimi encimi v preprostejše molekule (Duraković, 1991).

Pokvarjena živila lahko definiramo kot živila, ki so poškodovana in neprimerna za prehrano ljudi. Kvarjenje je lahko posledica vdora insektov, fizikalnih vplivov zaradi zmrzovanja, encimske aktivnosti živila ali encimske aktivnosti MO. V bakterijski celici je okoli 1000 encimov, ki so lahko glede na substrat:

- saharolitični,
- lipolitični in
- proteolitični.

Kljub dejstvu, da se živalska in rastlinska tkiva branijo s pomočjo intrinzičnih mehanizmov pred vdorom kvarljivcev lahko ti premagajo naravno zaščito in uničijo živalsko ali rastlinsko (organsko) sestavo živila in ga pretvorijo v anorgansko snov (Duraković 1991).

Rast patogenih MO v hrani je prav tako nezaželen; živilo lahko postane nevarno za uživanje, ostale spremembe povzročene z aktivnostjo MO pa so : zmanjšanje vsebine hranljivih snovi, sprememba senzoričnih lastnosti (okusa, vonja, barve) in celovite kakovosti izdelka. Toksini so lahko del celične zgradbe pri G - negativnih bakterijah (endotoksini) ali metabolični produkti (eksotoksini) pri G - pozitivnih bakterijah (Pokorn, 1990, Duraković, 1991).

Glede na občutljivost živil na mikrobno aktivnost jih lahko razdelimo na obstojna (nepokvarljiva), pol-obstojna in neobstojna (pokvarljiva).

Neobstojna živila, kot so meso, ribe, perutnina, sadje, zelenjava, jajca in mleko hitro podležejo mikrobni aktivnosti, razen če ne uporabimo tehnoloških postopkov uničevanja ali preprečevanja rasti MO.

Polobstojna živila, kot so jabolka, krompir se običajno ne kvarijo, če z njimi pravilno ravnamo.

Obstojna živila, kot so sladkor, moka in številni dehidrirani izdelki se v normalnih okoliščinah ne kvarijo, vendar se pogosto kvarijo, če so pogoji skladiščenja neprimerni (Pokorn, 1990).

Številna živila vsebujejo mnoge rodove bakterij in spor gliv (plesni in kvasovk). Mnogi rodovi so normalna mikrobna populacija in ne povzročajo nobenih težav; nekateri pa lahko substrat (živilo) razgrajujejo in povzročajo kvarjenje. Izvor MO v živilih je zrak, voda, prah, zemlja,

posoda, stroji, delovne površine, roke zaposlenih in prebavni trakt človeka in živali, kot smo že omenili v poglavju 2.1.

3.1 FIZIKALNI VPLIVI

Fizikalne spremembe pri kvarjenju živil so običajno izrazitejše od kemijskih. Mikrobno aktivnost lahko zaznamo kot spremembo barve, oblike in razvoj neustreznega vonja. Kvarjenje živil lahko klasificiramo kot aerobno ali anaerobno, odvisno od pogojev kvarjenja in od mikroorganizmov, ki povzročajo kvarjenje.

Aerobno kvarjenje, povzročeno s plesnimi je običajno omejeno na površino, kjer je dostop kisika neoviran. Če pa se pojavi na površini intenzivna bakterijska rast, se običajno razširi tudi v notranjost, zato so lahko prisotni toksini v globini živila.

Anaerobno kvarjenje se običajno pojavi v notranjosti živila ali v nepropustni embalaži, kjer ni kisika ali pa je prisoten v omejeni količini. Kvarjenje povzročajo fakultativni anaerobi ali striktni anaerobi, izraža pa se kot vonj po kislem, gnilobnem. Kislost povzročajo akumulirane organske kisline, ki nastajajo v procesu mikrobne razgradnje kompleksnih molekul. Kislost lahko spremljajo nakopičeni plini. Primer nastanka kislosti je mleko ali kislost mesnin kot so šunke ter kislost kosti (Pokorn, 1990, Jay, 2005).

3.2 KEMIJSKI VPLIVI

Endogeni encimi (encimi v sestavi živila) in aktivnost mikrobnih encimov vpliva na razgradnjo hranilnih snovi – proteinov, lipidov, ogljikovodikov. Večje, kompleksno zgrajene molekule se razgradijo v manjše in enostavnejše. V prvi fazi poteka aktivnost endogenih encimov, ki razgradijo sestavljene molekule do enostavnejših. V drugi fazi mikroorganizmi izrabljajo manjše, enostavnejše molekule, ki so nastale v razgradnji z endogenimi encimi za svojo rast in razvoj. Narava končnih produktov razgradnje je odvisna od razpoložljivega kisika (Pokorn, 1990).

Tabela 3.1: Pregled nekaterih živil in mikroorganizmov kvarjenja

vrsta živila*	prevladujoči rodovi MO v standardnih pogojih skladiščenja
žitarice (ogljikovodiki)	<i>Aspergillus, Fusarium, Monilia, Penicillium, Rhizopus</i>
kruh (ogljikovodiki)	<i>Bacillus, Aspergillus, Endomyces, Neurospora, Rhizopus</i>
zelenjava (ogljikovodiki)	<i>Achromobacter, Pseudomonas, Lactobacillus, Flavobacterium, Bacillus</i>
sadje in sokovi (ogljikovodiki)	<i>Acetobacter, Lactobacillus, Torulopsis, Saccharomyces</i>
sveže meso (beljakovine in maščobe)	<i>Micrococcus, Cladosporium, Achromobacter, Pseudomonas, Thamnidium, Flavobacterium</i>
salame, slanina, šunka (beljakovine, maščobe)	<i>Micrococcus, Lactobacillus, Streptococcus, Debaromyces, Penicillium</i>
perutnina (beljakovine, maščobe)	<i>Achromobacter, Pseudomonas, Micrococcus, Flavobacterium, Salmonella</i>
ribe, raki, školjke (beljakovine)	<i>Achromobacter, Pseudomonas, Micrococcus, Flavobacterium, Vibrio</i>
mleko in mlečni izdelki (ogljikovodiki, maščobe in beljakovine)	<i>Streptococcus, Lactobacillus, Micobacterium, Achromobacter, Pseudomonas, Flavobacterium, Bacillus</i>
jajca (beljakovine, maščobe)	<i>Pseudomonas, Cladosporium, Penicillium, Sporotrichium</i>

* - v oklepaju so prikazane prevladujoče hranilne snovi

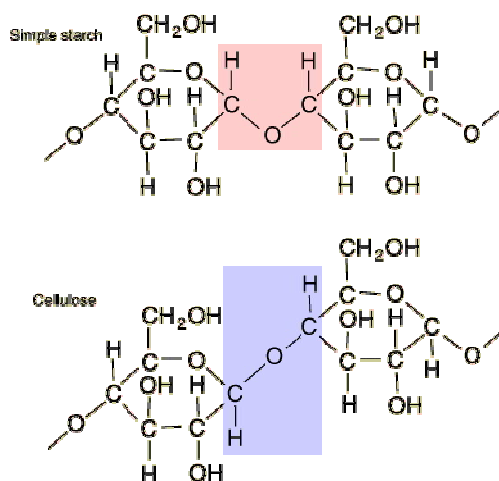
Vir: Pokorn, 1990.

3.2.1 Razgradnja ogljikovih hidratov

Ogljikovi hidrati so spojine, ki zagotavljajo živi celici energijo. So spojine ogljika, vodika in kisika, kjer je razmerje vodika in kisika 2:1. Ogljikove hidrate, ki jih uživamo kot hrano, so pridobljeni s fotosintezo rastlin. Imajo obliko sladkorjev, škroba in celuloze.

Polimerne (visoko molekularne) ogljikovodike kot so škrob, celuloza, pektin razgrajujejo le redki MO iz primarne mikrobne združbe. **Škrob** razgrajujejo nekatere plesni in predstavniki rodu *Bacillus* z encimi amilazami do oligosaharidov, disaharidov in monosaharidov, ki jih MO lahko sprejmejo v celice. To vrsto kvarjenje najprej zaznamo s spremembo barve, vonja in teksture (npr. nitavost kruha pri kvarjenju z *Bacillus* vrstami).

Pri kvarjenju škrobnih živil kot so žita ali krompir je soudeležena le zelo majhen del mikrobne združbe, saj niso aktivni na substratu, revnem na dušiku in mineralih.



Slika 3.1: Sinteza glukoznih molekul v škrobu in celulozi

<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/organic/imgorg/starchcellu.gif>

Celulozo razgrajujejo nekatere plesni in redke bakterije (*P. fluorescens* var. *celluloza*, *Acetobacter xylinum* ter nekatere mlečnokislinske bakterije), ki aktivirajo encime in razgradijo pektine do glukoze.

Pektine v celičnih stenah rastlin razgrajujejo mnoge plesni, pektolitične kvasovke in nekatere bakterije (*Erwinia*) z encimi imenovanimi pektinesteraze in poligalakturonidaze, pri čemer uničijo oporno tkivo rastline in ga zmehčajo (mehka gniloba).

Ogljikovodike z nižjo molekularno težo, zlasti **sladkorje**, izrabljajo kot hrano vse vrste MO. Živila bogata s sladkorji se kvarijo predvsem anaerobno, kvarjenje pa se kaže s kisanjem, tvorbo plina, tvorbo alkohola in tvorbo nekaterih maščobnih kislin (maslena). Kvasovke sladkorje fermentirajo (razgrajujejo v odsotnosti kisika) do etanola in CO₂, etanol pa naprej oksidirajo očetno kisle bakterije do očetne kisline (kis). Živila kot so sadni koncentracije, džemi, melasa tvorijo iz saharoze dekstrane, ki povzročajo sluzavost izdelkov (*Leuconostoc*). Fakultativno anaerobne bakterije (bacili in enterobakterije) fermentirajo sladkorje do različnih kislin, etanola, CO₂, H₂ in drugih komponent. Ti procesi povzročajo kislost (Pokorn, 1990).

3.2.2 Razgradnja beljakovinskih živil

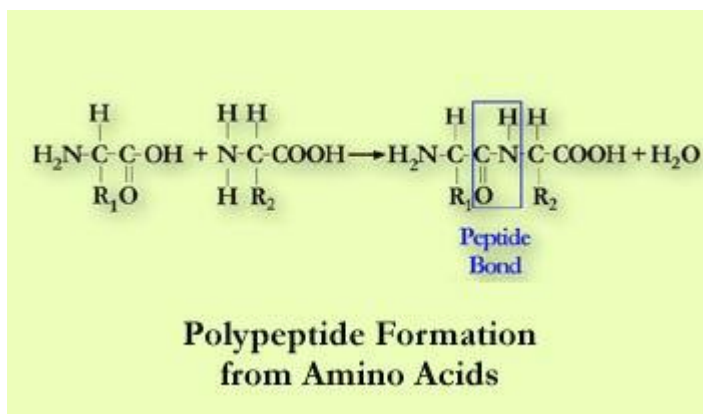
Beljakovinska živila se pokvarijo tem hitreje, čim višja je njihova vsebnost aminokislin, peptidov in topnih dušikovih spojin. Ko mikroorganizmi izčrpajo te snovi, se prične razgradnja beljakovin z ekstracelularnimi (zunajceličnimi) proteazami (encimi, ki razgrajujejo proteine) do peptidov, nato pa z intracelularnimi (znotrajceličnimi) peptidazami do aminokislin.

Ekstracelularne proteaze izločajo številne bakterije iz rodov *Bacillus*, *Clostridium*, *Streptococcus*, *enterobakterije* ter nekatere kvasovke ter plesni. Aminokislina, ki nastanejo pri razgradnji proteinov, lahko uporabijo celice MO neposredno v metabolizmu ali pa jih razgradijo do žveplovodika, amoniaka, biogenih aminov, ki neprijetno spremenijo organoleptične lastnosti živil.

Tvorba škodljivih snovi neugodnega vonja, ki so nastale v procesu razgradnje proteinov, spremeni živila do te mere, da so neprimerna za prehrano ljudi.

V aerobnih pogojih se lahko razvijejo spremembe, ki jih ne spremlja značilno neprijeten vonj. Za sveže meso je značilno kvarjenje na površini, ki se prične z akumuliranjem sluzi na površini, kar povzročajo bakterije iz rodov *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Micrococcus* in *Lactobacillus*.

Živila, ki poleg beljakovin vsebujejo še 5 do 10 % ogljikovodikov se hitreje kvarijo s fermentacijo le-teh, kot pa z razgradnjo beljakovin. Zaradi tekmovalnega procesa rasti glikolitični MO hitreje razgradijo ogljikovodike, znižajo pH in zavrejo razvoj proteolitov (Pokorn, 1990).



Slika 3.2: Tvorba polipeptidov iz aminokislin
Vir: interactive.usask.ca/.../constit_prot.html

3.2.3 Razgradnja maščob

Maščobe so trigliceridi, ki jih mnoge plesni, kvasovke in bakterije hidrolizirajo (razgrajujejo) s pomočjo zunajceličnih lipaz (encimov). V procesu razgradnje nastane glicerol in proste maščobne kisline, kot so maslena, kaprinska, kaprilna in kaprinska, ki so odgovorne za žarek priokus in kislost pri živilih z maščobno sestavo.

V splošnem razdelimo spremembe, ki nastanejo s kvarjenjem v štiri različne kemijske procese, ki se nanašajo na substrat, ki ga mikroorganizmi izkoriščajo.

Tabela 3.2: Kemijske spremembe v procesu kvarjenja živil

proces	substrat/hranilna snov	metabolični produkti
gnitje	beljakovine	aminokislina, amoniak, vodikov sulfid
kislost	ogljikovodiki	kislina, alkoholi in CO ₂
žarkost	maščobe	maščobne kisline in glicerol
mehko gnitje	pektin	metanol, galakturonska kislina, poligalakturonska kislina

Vir: Pokorn, 1990.

3.3 MIKROBNI INDIKATORJI KVARJENJA

Mikrobno kvarjenje živil spremljajo spremembe vonja, okusa, barve, konsistence in kemijske sestave živil. Za vodenje tehnoloških procesov je nujno poznavanje mikrobnega statusa vhodnih surovin, omejitev z internimi standardi ter seznanjanje dobaviteljev z internimi kakovostnimi parametri. V letu 2005 sta pričela veljati v uradnem mikrobiološkem nadzoru živil dva temeljna dokumenta:

1. Uredba komisije ES št. 2073/2005 in 1441/2007 o mikrobioloških merilih za živila in
2. Smernice za mikrobiološko varnost živil, ki so namenjene končnemu potrošniku (IVZ RS) – niso obvezujoče, toda priporočajo kriterije.

Če so obrati veliki proizvajalci z usposobljenim internim mikrobiološkim laboratorijem, je interni nadzor surovin ter končnih izdelkov po določenih vzorčevalnih shemah (monitoringih) nujen.

Indikatorje kvarjenja razdelimo:

- glede na vrsto mikroorganizmov v skupino kvarljivih **bakterij, kvasovk in plesni,**
- glede na vrsto kvarjenja, ki ga povzročajo v **saharolite/kislinotvorce, proteolite in lipolite,**
- glede na ekološke pogoje v katerih se razvijajo v **psihrofilne, termofilne, halofilne in osmofilne** mikroorganizme (Pokorn, 1990).

3.3.1 Bakterije

Bakterije, kot kvarljivci, lahko povzročajo razgradnjo vseh vrst ogljikovodikov, beljakovin in maščob.

Tabela 3.3: Najpogostejši bakterijski kvarljivci

saharoliti/ kislinotvorci	vrsta
kislinotvorne	<i>Gluconobacter, Acetobacter, Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Bacillus, Lactobacillus, Propionobacterium</i>
gnilobne, pektolitične	<i>Enterobacter, Erwinia</i>
proteoliti	<i>Pseudomonas, Proteus, Micrococcus, Bacillus Clostridium</i>
lipoliti	<i>Pseudomonas, Alcaligenes, Aeromonas, Staphylococcus, Micrococcus, Bacillus, Lactobacillus, Enterobacter, Corynebacterium</i>

Vir: Pokorn, 1990.

Nekateri rodovi bakterij imajo predstavnike saharolitov in proteolitov (rod *Clostridium*), nekateri rodovi (*Bacillus*) pa imajo predstavnike saharolitov, proteolitov in lipolitov in so najnevarnejši rod kvarljivcev živil.

3.3.2 Kvasovke

Kvarjenje s **kvasovkami** ima svoj specifičen značaj. Posamezna vrsta kvasovk je lahko za neko živilo zaželena, koristna mikroflora, za drugo živilo pa kvarljiviec. Tako je npr. kvasovka *Saccharomyces cerevisiae* var. *elipsoides* žlahtna kvasovka za fermentacijo namiznih vin, pri proizvodnji sadnih sokov pa nezaželen kvarljiviec. Tudi kvasovka *S. diastaticus* je zaželena pri razgradnji škroba, v pivovarstvu pa povzroča motnost piva (Pokorn, 1990).

Smernice za mikrobiološko varnost živil so omejile kvasovke v številnih živilih – pakirane mesnine, mlečni posladki, kislomlečni fermentirani izdelki, mlečni-sirni namazi, sladoledi, čokolada in izdelki, med in izdelki iz medu, zelenjava, sadje ter izdelki, brezalkoholne pijače, sadni sokovi in sirupi, pasterizirano pivo ter začimbe in njihovi izvlečki (Smernice..., 2005).

Mleko in mlečne izdelke kvarijo predvsem kvasovke, ki razgrajujejo laktozo in saharozo. Svežega mesa, hlajenega pri običajni temperaturi kvasovke ne kvarijo, nekoliko drugače pa je s hlajenim mesom pri 90 % vlage ter pri razsoljenih ter **fermentiranih mesnih izdelkih**, kjer so pogosti rodovi *Candida*, *Rhodotorula*, *Debariomyces*. Pri **svežem sadju in zelenjavi** so kvasovke sestavni del naravne mikroflore in lahko pri nezadostni toplotni obdelavi v tehnološkem procesu povzročajo kvarjenje. Kot potencialne prenašalce kvasovk iz ene kulture sadja/ zelenjave na drugo kulturo so ameriški strokovnjaki spoznali čebele; iz čebeljih nožic so izolirali 21 različnih vrst kvasovk (Pokorn 1990).

V **vinarstvu** in **pivovarstvu** pa predstavljajo posebno vrsto kvasovk tako imenovane divje kvasovke. Pivovarji ločijo tri vrste pivovarskih kvasovk:

- **kulturne kvasovke**, ki jih namensko uporabljajo v kulturah in ki vodijo vrenje. Glede načina vrenja jih ločijo v kvasovke spodnjega in zgornjega vrenja,
- **divje kvasovke**, ki povzročajo bolezn piva, kot so napake v vonju, okusu in motnost,
- **kvasovke naknadnega vrenja**, ki piva ne kvarijo temveč mu dajejo specifičen okus pri počasnem zorenju v kletih.

Vinarji pa razlikujejo dve vrsti kvasovk:

- **žlahtne**, to so tiste, ki vodijo alkoholno in naknadno vrenje ter
- **divje**, ki motijo normalen potek vrenja, kvarijo vonj in okus ter povzročajo motnost. Njihova značilnost je hitra sporulacija ter lebdenje v substratu (Pokorn, 1990).

Posebno skupino kvasovk - kvarljivcev predstavljajo **osmofilne** kvasovke, ki kvarijo živila z visoko koncentracijo sladkorja, kot so npr. med, marmelade, sadni koncentracije, sirupi, marcipan, sadni želeji, omake in razne paste. Natančna opredelitev med lastnostjo osmofilne in osmotolerantne ni mogoča, zaradi prilagoditve kvasovk rastnim pogojem (na povišano koncentracijo sladkorja ali soli). Značilno je, da osmofilne kvasovke kvarijo živila z nizko aw vrednostjo (pod 0,60). Neugodna lastnost te vrste kvasovk je tudi, da že nekaj celic zadostuje da se začnejo intenzivno množiti in pokvarijo živilo.

Pektolitične kvasovke predstavljajo posebno skupino kvarljivih kvasovk, ki v sadju in zelenjavi razgrajujejo pektin. Zaradi njihovega delovanja sadni izdelki izgubijo sposobnost želiranja,

metabolični produkti delovanja kvasovk pa povzročajo sluzavost, zlasti pri sadnih sokovih. Pektolitične kvasovke določamo na gojišču, ki ga namesto z agarjem utrdimo s pektinom (Pokorn, 1990).

3.3.3 Plesni

Plesni so od vseh mikrobnih kvarljivcev najbolj razširjene in povzročajo največ škode v živilski industriji. So prehransko nezahtevne, zato lahko rastejo tudi na papirju, lesu, usnju, tekstilu. Skoraj ni živila, razen sterilnih konzerv, ki ga plesni ne bi kontaminirale. Po metabolični aktivnosti so saharoliti, proteoliti in lipoliti. Za rast potrebujejo kisik, zato rastejo na površini živil. Najbolje rastejo v kislem območju pH, vendar pa ne preraščajo samo kislih živil. Optimalna temperatura njihove rasti je 20 do 25 °C, čeprav so meje od 0 do 40 °C. Plesni najpogosteje kvarijo rastlinska živila, sadje, zelenjavo, žitne izdelke in sire. Povzročajo spremembe, kot so tvorba barvil, zatohel vonj in okus. Mnoge tvorijo mikotoksine, ki jih prištevamo med zastrupljevalce živil (aflatoksini rodu *Aspergillus*).

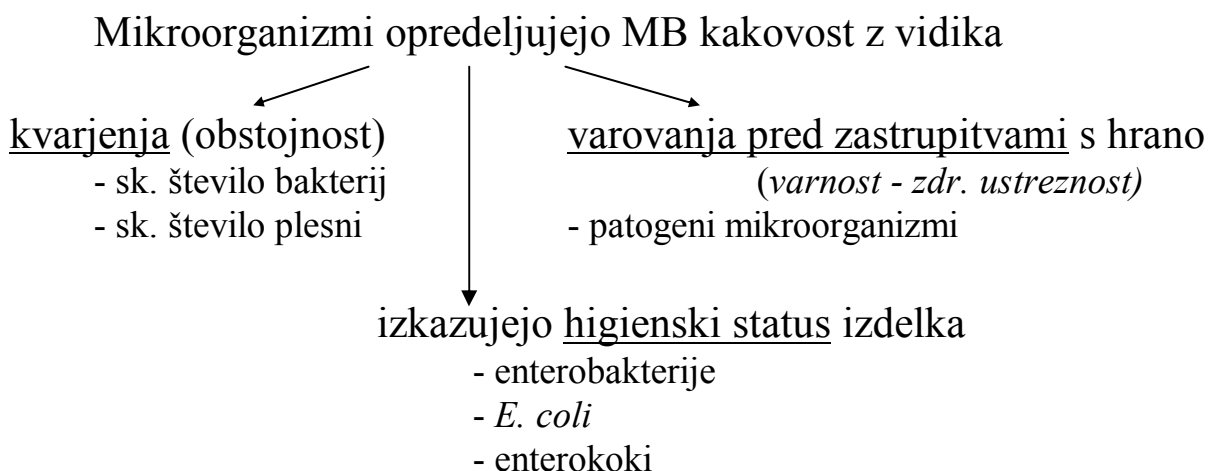
Smernice za Mikrobiološko varnost živil jih omejujejo v številnih živilih – pakirane mesnine, mlečni deserti, maslo, siri, mlečni namazi, sladoledi, pekovski in slašičarski izdelki, med, čokolada, zelenjava, sadje in koncentradi za juhe, čaji, kava ter sadni sokovi, pijače in sirup ter začimbe in aditivi (Smernice, 2005).

3.4 INDIKATORJI MIKROBIOLOŠKE KAKOVOSTI

Indikatorji (pokazatelji) mikrobiološke kakovosti odsevajo mikrobiološko kakovost živil v odnosu do:

1. obstojnosti živila (kvarljivci) ali v odnosu do:
2. higiene (mikroorganizmi fekalnega izvora).

V splošnem pa imenujemo indikatorje mikroorganizme, ki označujejo **higienski status predelovalnega obrata ali živila**.



Slika 3.3: Delitev mikroorganizmov v živilstvu glede na kvar, higieno stanje in varnost živila
Vir: Marčič, 2005.

3.4.1 Indikatorji mikrobiološke kakovosti izdelkov (kvarljivci)

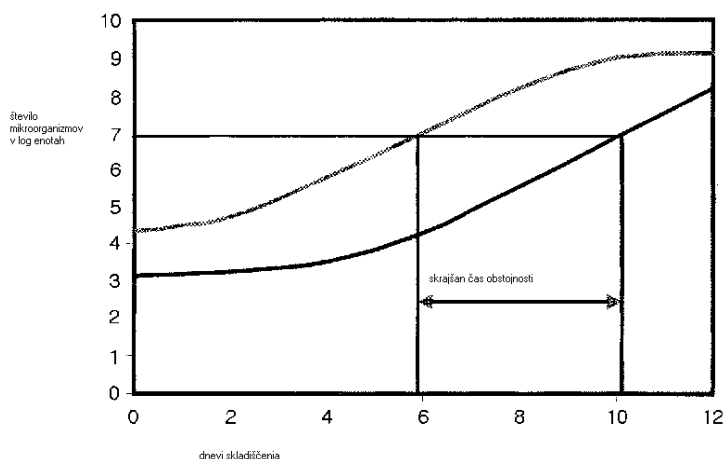
Indikatorji mikrobiološke kakovosti ali indikatorji obstojnosti so organizmi ali njihovi metabolični produkti, katerih prisotnost v določenem obsegu lahko ogrozi kakovost ali boljše, skrajša čas obstojnosti. V splošnem rečeno so indikatorji mikrobne kakovosti specifični glede na posamezno vrsto živila. To so kvarljivi mikroorganizmi, ki s svojim razvojem v živilu povzročijo nesprejemljivost za potrošnike (Pokorn, 1990, Forsyth, 2000).

Skupno število bakterij (SŠB), kot metoda štetja mezofilnih aerobnih bakterij na agarški plošči se uporablja kot metoda ugotavljanja mikrobiološke kakovosti izdelka. Parameter SŠB ima velik pomen kot pokazatelj mikrobne statusa živila in kot parameter predvidevanja obstojnosti živila.

Tabela 3.4: Nekateri mikroorganizmi v korelaciji z MB kakovostjo živila

mikroorganizem	izdelek/živilo
<i>Bacillus spp.</i>	krušne panade
<i>Clostridium spp.</i>	trdi siri
mlečnokislinske bakterije	pivo, vino
<i>Lactococcus lactis</i>	sveže mleko
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	sladkor (med rafiniranjem)
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	maslo
kvasovke	zgoščeni sadni sirupi
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	majoneze, solatni prelivi

Vir: Pokorn, 1990.



Slika 3.4: Vpliv začetnega števila mikroorganizmov na obstojnost

Vir: Forsyth, 2000.

3.4.2 Indikatorji higiene (higienski indikatorji)

Kriteriji za določanje mikroorganizmov higiene v živilu morajo zagotoviti preprosto, hitro diagnostiko (odkrivanje) tega mikroorganizma iz živila in so običajno patogeni mikroorganizmi. V preteklosti so jih povezovali z direktnim ali indirektnim črevesnim izvorom živali in ljudi. Prvi indikator **fekalne kontaminacije** je bila *Escherichia coli*. V sodobni klasifikaciji varnosti živil (po Mossel-u in Butieux-u) so prejšnjim kriterijem dodani še naslednji:

- bakterija mora imeti črevesni izvor,
- ker dosegajo visoko število v fecesu (blatu), jih je treba ugotavljati z razredčitvami,
- izkazujejo visoko rezistenco (odpornost) v okolju preiskovanega živila,
- morajo zagotoviti relativno preprosto in zanesljivo odkrivanje tudi ko so prisotni v zelo majhnem številu (Jay, 2005).

Koliformni mikroorganizmi predstavljajo indeks fekalnega onesnaženja voda in živil. Med njih prištevamo štiri rodove družine *Enterobacteriaceae* (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* in *Klebsiella*). Fermentirajo laktozo ter na vijolično rdečem žolčnem agarju delajo vijolične kolonije s precipitatom (izkosmičenjem) žolčnih soli. Primarni izvor *E. coli* je prebavni trakt živali in ljudi, *Enterobacter* sp. pa je rastlinskega izvora. Visoko število *E. coli* in koliformnih bakterij v živilih je nezaželeno, vendar lahko ob upoštevanju navodil ustreznega pravila, rokovanja, skladiščenja in transporta živil ob uporabi načel HACCP načrtov dosežemo čim manjšo obremenitev. Pomembno je, da upoštevamo kriterije, ki določajo tisto število *E. coli*/ koliformnih MO, ki ogrozijo varnost živila (Jay, 2005).

V novejšem času se med higienskimi indikatorji v živilstvu vse pogosteje pojavlja tudi družina **enterobakterij** kot parameter določanja higiene v celoti (énterobaktêrije bakterije družine Enterobacteriaceae, v katero so uvrščeni naslednji rodovi: *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Erwinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Yersinia*). To je skupina fakultativno anaerobnih, nesporogenih paličic. Tipični predstavnik je rod *Escherichia*. Skupne enterobakterije v mikrobiologiji definiramo kot bakterije, ki v gojišču z žolčnimi solmi rastejo in izdelujejo kislino iz glukoze.

Vsi rodovi znotraj družine enterobakterij niso iz prebavil živali in človeka. V mikrobiologiji živil jih najpogosteje ugotavljamo med 10 in 1000 celicami na gram živila, kadar gre za obdelana živila (Jay, 2005).

Enterokoke kot indikatorje higienske kakovosti in varnosti so opisovali že leta 1900. Danes spadajo v rod *Enterococcus* in ima dva tipična predstavnika: *E. faecium* in *E. faecalis*. Battiaux je že v začetku stoletja odkril, da humani in prašičji feces vsebuje enterokoke v 100 %, koliformne pa le v 86 do 89 %. Kot tipični predstavniki G+ bakterij imajo zahtevnejše rastle pogoje, vendar rastejo v širšem pH območju kot G- bakterije in rastejo aerobno do mikroaerofilno. Številni raziskovalci so potrdili, da imajo danes enterokoki močnejšo vlogo kot indikatorji higienske kakovosti kot koliformne bakterije, še zlasti za zamrznjena živila. Zanimiv je podatek o odpornosti na temperature zamrzovanja. Po enem letu skladiščenja pri temperaturi -20°C so odkrili 89% preživelih enterokokov in le 60 % koliformnih bakterij (Jay, 2005).

Tabela 3.5: Koliformni MO in enterokoki kot indikatorji higienske kakovosti živil lastnosti

lastnosti	koliformni	enterokoki
morfologija/gram	G- paličice	G+ koki
pojavnost v živalskem blatu	ne v vsem	prisoten v večini
enostavnost izolacije iz živil	relativno lahka	težja
odpornost v okolju	manj odporni	bolj odporni
odpornost na zmrzovanje	#	#
preživetje v zmrznjenih živilih/majhno		veliko
pojavnost v sveži zelenjavi	majhna	velika
pojavnost v svežem mesu	majhna	majhna
pojavnost v konzerviranem mesu	majhna	velika
sopojavnost s črevesnimi patogenimi bakterijami	velika	manjša
sopojavnost z drugimi patogenimi bakterijami	majhna	majhna

Vir: Jay, 2005.

POVZETEK

Mikroorganizmi s svojo metabolično aktivnostjo kvarijo živila in surovine. Spreminjajo jim prehransko vrednost, teksturo, vonj in okus. Živila lahko postanejo tudi nevarna za uživanje. Kvarjenje živil se kaže kot skupek fizikalnih in kemijskih reakcij, kjer se polimerne molekule (škrob, beljakovine in maščobe) razgrajujejo do manjših, enostavnejših molekul. Reakcije potekajo s pomočjo ekstracelularnih in intracelularnih encimov.

Indikatorje kvarjenja delimo po treh načelih:

- glede na vrsto mikroorganizmov (bakterije, kvasovke, plesni),
- glede na vrsto kvarjenja (prevladujočo hranilno snov),
- glede na ekološke pogoje rasti.

Indikatorje mikrobiološke kakovosti delimo na:

- glede na obstojnost,
- glede na higienski status in
- glede na prisotnost patogenih bakterij/plesni

ŠTUDIJSKA VPRAŠANJA

1. Kaj so ekološki dejavniki rasti mikroorganizmov in kako jih delimo?
2. Razložite kvarjenje živil z beljakovinsko, maščobno in škrobno sestavo?
3. Parameter skupno število bakterij nam pove: (obkrožite pravi odgovor) obstojnost, varnost, splošno mikrobiološko kakovost, začetno kontaminacijo, neustreznost, ustreznost!
4. Kaj nam pove v mikrobiološki analizi živil parameter higienski indikator?
5. Pojasnite soodvisnost vodne aktivnosti in relativne vlage v ekologiji mikroorganizmov!
6. Kateri parameter v higieni živil je merilo za obstojnost izdelka?
7. Kako ovrednotimo živilo, ki vsebuje previsoko število bakterije *E. coli*? (obkroži pravi odgovor) nevarno, neobstojno, nehigiensko
8. Opišite kinetiko rasti mikroorganizmov v tehnologiji živil!

4 MIKROBIOLOŠKO NEUSTREZNA ŽIVILA KOT VIR OKUŽBE IN ZASTRUPITVE

MINI SLOVAR

A. Interakcija mikroorganizem / makroorganizem- gostitelj

Saprofitizem: mikroorganizmi (saprofiti), ki živijo in se razmnožujejo na živih in mrtvih organizmih, ne da bi povzročili škodo.

Parazitizem: mikroorganizmi živijo in se razmnožujejo v makroorganizmu, ga pri tem poškodujejo in povzročijo bolezen.

Komenzalizem: mikroorganizmi se razmnožujejo in živijo v makroorganizmu, ne da bi povzročili bolezen.

Simbioza: medsebojna interakcija mikroorganizma in makroorganizma, pri čemer imata oba korist.

Patogenost: razmnoževanje mikroorganizmov v makroorganizmu, pri čemer se razmnožujejo in živijo v njem, ga poškodujejo; povzročijo razvoj bolezni ali smrt makroorganizma.

Patogen MO: je vedno parazit in je škodljiv za gostitelja.

B. Skupne lastnosti patogenih mikroorganizmov

Pripenjanje – adhezija: sposobnost pripenjanja na površino gostiteljeve sluznice.

Kolonizacija: razmnoževanje patogena v gostiteljevem tkivu.

Infekcija: sposobnost poškodbe gostiteljevega tkiva – nastanek bolezni.

Infektivna doza: minimalno število MO, ki lahko povzročijo infekcijo v gostitelju.

Virulenca: kvantitativni pojem, ki označuje stopnjo patogenosti parazita in se pogosto izraža kot doza ali število celic, ki bodo povzročile odziv bolezni.

Kontaminacija : onesnaženje, onečiščenje: - kultur, mleka, okolja, vina

C. Faktorji patogenosti

Endotoksini: lipopolisaharidi celične stene nekaterih G- negativnih bakterij, ko se stopijo v prebavilih gostitelja.

Enterotoksin: protein, ki se sprosti med rastjo in razmnoževanjem MO in je aktiven v tankem črevesu.

Eksotoksin: protein, ki se sprosti med rastjo in razmnoževanjem MO in je toksičen za gostitelja.

Drugi faktorji patogenosti: glikokaliks, hemolizini, lipaze, proteaze, nukleaze, koagulaze, kolagenaze.

UVOD

Mikroorganizmi se nahajajo povsod v okolju. Večinoma so nenevarni, nekateri pa lahko okužijo človeka, živali in rastline. Pod določenimi pogoji se razmnožujejo v tkivu ali telesu in se prenašajo med ljudmi, med živalmi, iz živali na človeka neposredno ali s hrano. Novi gostitelj lahko zboli ali pa ostane le prenašalec patogenih mikroorganizmov za določen čas.

Po definiciji Adrian E. Eley-a (2000) je zastrupitev s hrano akutna bolezen, prenesena s patogenimi MO, pogosto z bolečinami v trebuhu, bruhanjem in drisko, ki se pojavijo v nekaj

urah ali nekaj dneh po zaužitju kontaminirane hrane. V večini primerov sumljivo živilo zagotavlja vse pogoje za intenzivno rast patogenih MO.

Po evropskih in ameriških epidemioloških študijah naj bi vsak primer identificiranega povzročitelja pri pacientu imel ozadje 136 ne-identificiranih primerov obolelih, ki so bili:

- hospitalizirani, vendar povzročitelja niso odkrili (6),
- bolni, vendar niso iskali zdravniške pomoči (23) in



- z blagimi ali atipičnimi simptomi (136).

Dejavniki izbruhov zastrupitev s hrano

Dejavniki, ki se nanašajo na mikrobno rast v živilu:



- hranjenje pri sobni temperaturi,
- neustrezno hlajenje,
- priprava za vnaprej,
- neustrezno hranjenje na toploti,
- uporaba ostankov,
- neustrezno tajanje,
- priprava velikega števila obrokov.

Dejavniki, ki se nanašajo na preživetje mikroorganizmov v živilu:

- neustrezno pogrevanje,
- neustrezno kuhanje/pečenje.

Dejavniki kontaminacije:

- kontaminirana predelana nekonzervirana živila,



- kontaminirana surova živila,
- navzkrižna kontaminacija,
- neustrezno/pomanjkljivo čiščenje opreme in pribora,
- vprašljiv izvor – dobavitelj,
- kontaminirana konzervirana živila (Eley 2000).

Izvori zastrupitev s hrano so lahko primarni in sekundarni.

4.1 PRIMARNI IZVORI ZASTRUPITEV S HRANO

Živali

Živila živalskega izvora predstavljajo primarni izvor bakterij, ki povzročajo zastrupitve s hrano. Farmske živali se večinoma okužijo z uživanjem kontaminirane krme ali s pašo na okuženih pašnikih. Masovna proizvodnja z intenzivno rejo vpliva na razširjanje organizmov v reji in v nastanku določenega infektivnega okolja. Organizmi iz živali se pri klanju prenašajo na sveže meso in v predelano živilo. Zaposleni v verigi klanja so najpogostejši prenašalci kužnih bolezni.



4.2 SEKUNDARNI IZVORI KONTAMINACIJE

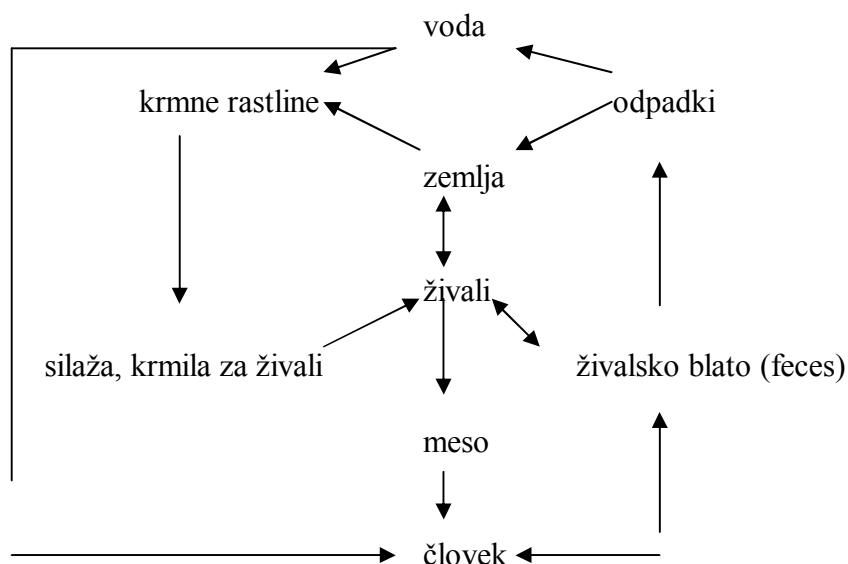
Okuženi ljudje – lahko na katerikoli stopnji v proizvodni verigi predstavljajo nevarnost okužbe. Izvore najdemo tudi v gospodinjstvu, pri pripravi hrane za domačo mizo.

Glodalci – so aktivni v pridelavi in predelavi živalske krme, pri skladiščenju na farmah, v skladiščih surovin in končnih izdelkov v predelovalnih obratih, restavracijah ali domovih. Surovine in izdelke kontaminirajo z izločanjem urina in fecesa.

Voda – če je kontaminirana, lahko predstavlja veliko tveganje za zdravje človeka, še zlasti ker se uporablja kot medij čiščenja v živilski industriji.

Zemlja – je lahko pomemben vektor povzročiteljev bolezni. Odvisno od vlage, pH vrednosti temperature in organskih primesi lahko služi kot nosilec mikroorganizmov za daljše obdobje in kot izvor sekundarne kontaminacije živil in kot izvor primarne kontaminacije živali.

Zrak – je lahko prenašalec bolezenskih klic, še zlasti v primeru stafilokokov. Ti se prenašajo po zraku mnogo pogosteje, kot preko kožnih, gnojnih ranic zaposlenih v proizvodni verigi. Kašljanje in kihanje v predelovalni verigi ali v kuhinji razširja kontaminacijo na izdelke ali živila, ki so lahko močno obremenjena s stafilokoki in predstavljajo tvegano živilo.



Slika 4.1: Poti prenosa patogenih bakterij na človeka
Vir: Forsythe, 2000.

Tabela 4.1: Najpogostejši izvori kontaminacije živil in zastrupitev z živili

Izvor	mikroorganizmi
živalska krma	salmonele, kampilobaktri
hrana za hišne živali/ hišne živali/insekti	salmonele, <i>Cl. perfringens</i>
glodalci / ptice	salmonele
ljudje	salmonele, stafilokoki, <i>Cl. perfringens</i>
meso in perutnina	<i>C. perfringens</i> , <i>S. aureus</i> , salmonele, kampilobaktri
konzervirano meso	<i>Cl. botulinum</i> , <i>S. typhi</i>
mleko	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>S. aureus</i>
sir	<i>S. aureus</i> , <i>L. monocytogenes</i>
jajca	<i>S. enteritidis</i> in drugi serovari
hladne sladice	<i>S. aureus</i> , salmonele
sladoled	stafilokoki, salmonele
ribe in morski sadeži	<i>C. perfringens</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
zmrznjeni kuhani morski sadeži	<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>
dehidrirani izdelki vklj. žita in pekarski izdelki	<i>B. cereus</i> , <i>C. perfringens</i>
želatina	<i>S. enftenberg</i> , <i>S. enetritidis</i> , <i>S. aureus</i>
kokos, melone, mango	<i>Salmonella typhi</i> , <i>S. paratyphi</i> , <i>S. poona</i>
zelenjava	<i>Salmonella typhi</i> , <i>S. paratyphi A,B,C</i> , <i>L. monocytog.</i>
maslo, margarina	salmonele, stafilokoki
džemi, marmelade	plesni (mikotoksini)
omake, majoneze	salmonele

Vir: Eley, 2000.

4.2.1 Vrste zastrupitev s hrano

Obstaja več različnih tipov zastrupitev s hrano, mikrobne ali nemikrobne izvora. Po mehanizmih patogenosti lahko razdelimo patogene bakterije v dve osnovni skupini: tiste, ki izločajo **majhne količine toksinov** in tiste, ki povzročajo bolezen izključno s **pridelovanjem toksinov**. Prve sestavljajo skupino bakterij, ki povzročajo bolezen **z okužbo**, druge pa skupino, ki povzročajo bolezen **z izločanjem toksinov** (Eley, 2000).

Tabela 4.2: Povzročitelji alimentarnih toksikoinfekcij

Infekcijske bakterijske zastrupitve	Toksične bakterijske zastrupitve
<ul style="list-style-type: none">• salmonela,• kampilobakter,• vibrio species,• <i>Yersinia enterocolitica</i>,• <i>E. coli</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>S. aureus</i>,• <i>Cl. botulinum</i>,• <i>Cl. perfringens</i>,• <i>B. cereus</i>,• <i>E. coli</i>.

Vir: Marčič, 2005.

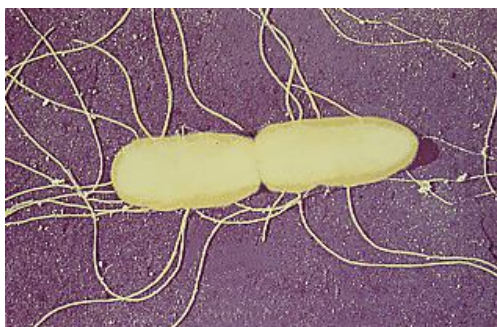
4.2.2 Bakterije, ki povzročajo s hrano preneseno bolezen z okužbo - infekcijske bakterijske zastrupitve

Njihov princip patogeneze (razvoja bolezni pri človeku) ne temelji na pridelovanju toksinov, čeprav večina predstavnic vsebuje določene tipe toksinov, ki so sestavina celice (endotoksini). Da lahko povzročijo s hrano preneseno bolezen, morajo biti prisotne v živilu v relativno visokem številu (10^5 do 10^7 MO/g živila). V to skupino prištevamo salmonele, kampilobaktrije, vibrije, jersinije in dva tipa *E. coli* (EPEC in EIEC)(Eley, 2000).

4.2.2.1 Salmonele

So G - negativne fakultativno anaerobne paličice, ne delajo spor in jih poznamo že več kot 2000 vrst. Samo nekatere vrste povzročajo obolevnost pri človeku.

Patogeneza: princip patogeneze (razvoja bolezni pri človeku) ne temelji na pridelovanju toksinov, čeprav večina predstavnic vsebuje določene tipe toksinov, ki so sestavina celice. Da lahko povzročijo s hrano preneseno bolezen, morajo biti prisotne v živilu v relativno visokem številu (10^5 do 10^7 MO/g živila). Z zaužitjem kontaminirane hrane se prisesajo na črevesne resice tankega in širokega črevesa, kjer se intenzivno razmnožujejo. Lahko migrirajo skozi sluznico v krvni in limfni obtok.



Slika 4.2: *Salmonella typhimurium*

<http://www.sissa.it/ilas/jekyll/n03/forum/images/Salmonelle.jpg>

Inkubacijska doba, klinični znaki in prognoza: čas za razvoj kliničnih znakov bolezni traja od 12 do 36 ur. Običajno ima prizadeti vročino, bolečine v trebuhu in drisko. Bruhanje ni pogosto. Oboleli običajno po 7-ih dneh okrevajo; zdravljenje z antibiotiki ni potrebno. Nevarna je izguba tekočine, ki lahko resno ogrozi predvsem dojenčke in ostarele. V času bolezni je treba posvetiti največ pozornosti osebni higieni in pitju tekočine.

Incidenca - pojav, epidemiologija – razširjenost in ekologija – prenos: danes je salmonela eden izmed najpogostejših povzročiteljev bolezni s hrano. V zadnjih 10-ih letih sta bila iz kužnin najpogosteje izolirana serotipa *S. typhimurium* in *S. enteritidis*. V naravi je močno razširjena; pogosto jo najdemo v prebavnem traktu živali in ljudi. Izloča se z blatom, ki lahko kontaminira vse s čemer pride v stik. Ker raste v širokem temperaturnem območju, se lahko v živilu razmnoži do visokega števila. Živila, ki so najpogosteje kontaminirana s salmonelo so perutninsko meso in jajca, morski sadeži, neobdelano mleko in mlečni izdelki ter vsa živila, ki so lahko kontaminirana z iztrebki (zelenjava).

Obvladovanje: salmonel v živilski industriji je zelo kompleksne narave in zahteva interdisciplinaren pristop: obvladovanje okolja in krmil za farmske živali, obvladovanje farmskih živali in poučevanje ljudi. Velikega pomena je tudi poučevanje porabnikov in vseh zaposlenih v živilski in tržni mreži (ustrezno hlajenje, ustrezne temperature kuhanja in pečenja v gospodinjstvu) (Eley, 2000).

4.2.2.2 Kampilobaktri

So G- negativne mikroaerofilne paličice. Za svojo rast potrebujejo le 5 % kisika. Optimalna temperatura rasti termofilnih kampilobaktrov je 42 °C (*C. jejuni* / *coli*). Izolirali so jih že v 30-ih letih, vendar so bile tehnike izolacije in diagnostike še nepopolne za rutinske preiskave. Danes so termofilni kampilobaktri poleg salmonel najpogostejši povzročitelji bolezni s hrano.



Slika 4.3: Kampilobaktri (elektronska mikroskopija)

Vir: www.pathogencombat.com/.../campylobacter.ashx

Patogeneza bolezni, klinični znaki in prognoza: še ni popolnoma pojasnjena. Številni avtorji poročajo o možnosti več mehanizmov patogenosti. Kljub temu, da kampilobaktiri v okolju hitro odmirajo in da živila običajno niso z njimi močno kontaminirana, je potrebna majhna doza povzročiteljev (2×10^2) za izbruh bolezni pri človeku. Pri človeku se pojavijo 3 do 5-tega dne bolečine v trebuhu, slabost, vročica ter lahko tudi krvava driska (invazivnost kampilobaktrov). Običajno po enem tednu bolezen izgine. V primeru bolezni, ki traja več kot teden dni, zdravnik običajno predpiše antibiotike.

V kontekstu črevesnih bolezni se običajno kampilobakteriozni enteritis obravnava kot simptomatična bolezen razvitih držav (Velika Britanija, ZDA, zahodna Evropa, Skandinavija, Avstralija, Kanada).

Etiologija - izvor in ekologija: kampilobaktrije pogosto najdemo v prebavilih večine farmskih in hišnih živali, najpogosteje pa pri pticah/perutnini.

Obvladovanje : najpreprostejši higienski ukrepi na farmah vključujejo učinkovite dezinfekcijske bariere (bazene z raztopino razkužila pred vstopom v hleve) in dosledno izvajanje ukrepov proti glodalcem, insektom in divjim pticam.

Na srečo imajo kampilobaktiri zahtevne rastle pogoje in so zelo občutljivi na običajne temperature pasterizacije. Pri pripravi perutnine v gospodinjstvu se moramo izogibati zlasti prenosov iz surovega mesa na že toplotno obdelana živila (z rokami in gospodinjstvom priborom) (<http://www.wpsa-foodsafety.com/index.php?item=156>).

4.2.2.3 *Vibrio parahaemolyticus*

So G- negativne, fakultativno anaerobne, nesporogene paličice. So halofilni MO – za optimalno rast potrebujejo visoke koncentracije soli.

Mehanizmi patogenosti, klinični znaki in prognoza: *V. parahaemolyticus* še niso docela poznani, vendar se zdi, da je pridelovanje termostabilnega hemolizina povezano z možnostjo gastroenteritisa pri človeku. Inkubacijski čas MO je od 4 do 48 ur. Značilen simptom bolezni je vodena driska, bolečine v trebuhu, slabost, včasih z vročico in bruhanjem. Običajno se bolezen konča po petih dneh in ne zahteva posebnega zdravljenja, razen pitja večjih količin tekočine.

Izvor, razširjenost in prenos: naravno okolje vibrijev je vodno okolje toplih morij. Koncentracija organskega materiala v vodi in slanost potencirata njihovo rast. Zastrupitve z vibriji so skoraj izključno povezane z uživanjem surovih ali rahlo kuhanih kontaminiranih morskih sadežev. Infektivna doza za odraslega človeka je 10^6 organizmov /g živila. Zastrupitve so večinoma sezonskega značaja v poletnih mesecih. *Vibrio parahaemolyticus* se razmnožuje tudi pri nižjih temperaturah in lahko doseže pri T hladilnika prav tako infektivno dozo. Nevarnost okužbe z vibriji obstaja vedno, kjer so običajne navade prehranjevanja s surovimi morskimi sadeži (japonske restavracije).

Tudi drugi vibriji lahko povzročijo pri ljudeh črevesne bolezni npr. *Vibrio cholerae*, *V. vulnificans*, *V. fluvialis* in drugi (Eley, 2000).

4.2.2.4 *Yersinia enterocolitica*

To so G- negativni, fakultativno anaerobni, nesporogeni bacili ali kokobacili. So psihrotrofni MO; razmnožujejo se na T hladilnika. (+4 °C).

Infektivna doza tega mikroorganizma ni poznana, tudi **mehanizmi patogenosti** ne, vendar se zdi, da je invazivnost lahko pomemben faktor (izstopanje skozi črevesno steno v tkiva). Inkubacijska doba traja od 24 do 36 ur po zaužitju kontaminirane hrane; bolezen traja od 3 do 5 dni. **Klinični znaki** so podobni kot pri prejšnjih povzročiteljih, vendar pa driska ni vedno nujna. Črevesna infekcija se lahko razvije v septikemijo, posebno pri manj odpornih osebah (starejši, bolniki, otroci).

Izvor, razširjenost in prenos: *Yersinia* je v zahodni Evropi, ZDA in Japonski relativno redko izolirana. Pogostejša je v Skandinaviji. Epidemiološke študije so pokazale velike razlike v patogenosti znotraj samih biotipov in celo posamezni serotipi lahko enkrat izkazujejo patogenost, drugič pa ne.

Ta mikroorganizem je v okolju precej pogost. Izolirali so ga iz fekalnih vzorcev, prašičev, psov, mačk, opic in podgan, kar lahko kaže na živalske izvore kontaminacije.

Y. enterocolitico so najpogosteje izolirali iz vzorcev mleka in mlečnih izdelkov, zelenjave in različnih vrst mesa in mesnih izdelkov (Eley, 2000).

Escherichia coli

So G- negativne, nesporogene fakultativno anaerobne paličice, ki so razdeljene v podskupine. Enteropatogene (**EPEC**) in enteroinvazivne (**EIEC**) *E. coli* so še vedno v fazi raziskovanja mehanizmov patogenosti. Pri enterotoksigenih (**ETEC**) in enterohemoragični (**EHEC**) *E. coli* pa je patogenost pogojena s pridelovanjem toksinov. Kljub temu, da je *E. coli* del normalne črevesne flore človeka in živali, nekateri sevi lahko proizvajajo črevesne in urinarne infekcije, zastrupitve s hrano, izjemoma septikemijo in meningitis.



Slika 4.4: *E. coli*

Vir: www.universityofcalifornia.edu

Infektivna doza za človeka znaša od 10^5 do 10^7 MO/g živila. **Mehanizem patogenosti** pri EPEC je najbrž povezan s pripenjanjem na črevesno sluznico, poškodbo resic, kar pripelje do diareje (vodena driska). EIEC serotipi delujejo po principu šigela-toksinov - uničijo epitelne celice in vstopajo v tkiva (invazivnost - krvavo blato). V splošnem simptomi lahko variirajo, odvisno od serotipa. Po nekaj dneh bolezen izgine; ponavadi ni potrebno zdravljenje, razen nadomestitev tekočine.

Razširjenost: zastrupitev z EPEC in EIEC je dokaj neobičajna tako v Evropi kot v ZDA. Posebna težava pri prepoznavanju povzročitelja je težavnost ločitve od ostalih nepatogenih sevov *E. coli* v rutinski analitiki.

Prenos : najverjetneje je fekalna kontaminacija s hrano ali z vodo najpogostejši način prenosa teh bakterij. Najpogosteje so okužene mesnine, mesni izdelki in sveža zelenjava.

Obvladovanje: kontaminaciji in okužbam z *E. coli* se lahko izognemo z uporabo neoporečne vode in s temeljito toplotno obdelavo živil. Izogibamo se navzkrižne kontaminacije že pripravljenih živil s surovimi (Eley, 2000).

4.2.3 Bakterije, ki povzročajo s hrano preneseno bolezen s toksini – toksične bakterijske zastrupitve

Bakterijske zastrupitve so lahko posledica zaužitja bakterij, ki izločajo toksine v organizmu človeka; lahko pa se človek zastrupi s hrano, ki že vsebuje izločene toksine omenjenih bakterij.

Bakterije, ki so odgovorne za **izločanje toksinov v že pripravljene hrani** so *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* in *Bacillus cereus* (emetični tip). Bakterije, ki jih zaužijemo s hrano in **izločajo toksine šele v prebavilih človeka** pa so *Clostridium perfringens*, *B. cereus* (diareja tip), enterotoksigena *E. coli* (ETEC) in enterohemoragična *E. coli* (EHEC) (Eley 2000).

4.2.3.1 Staphylococcus aureus

So G - pozitivni, fakultativno anaerobni koki, ki so koagulaza, DNA-za in lecitinaza pozitivni (v gojišču koagulirajo kunčjo plazmo in z encimi razgrajujejo DNA in lecitin).



Slika 4.5.: *Staphylococcus aureus*

Vir: www.netwellness.org/.../images/10046.jpg

Patogeneza, klinični znaki in prognoza: zastrupitve s stafilokoki so pogoste z zaužitjem hrane, ki vsebuje že izločene toksine omenjene bakterije (stafilokokni enterotoksini). Serološko razlikujemo več tipov toksinov. Enterotoksin F so spoznali kot toksin sindroma toksičnega šoka in je klinično nevrotoksin, saj deluje preko receptorjev v prebavilih preko živca v možgane na center za bruhanje. Pri zastrupitvi se pojavi 1 do 6 ur po zaužitju slabost, bruhanje v loku, bolečine v trebuhu in driska. Običajno se vsi oboleli pozdravijo v 24 h brez posebne terapije.

Izvor, prenos in razširjenost: toksin se izloča med aktivno rastjo bakterijske celice v živilu, največkrat med skladiščenjem. Stafilokokni enterotoksini so odporni na kuhanje do 30 minut in na večino proteolitičnih encimov, ki bi jih razgradili.

Stafilokoki se pogosto prenašajo na živila preko ljudi v predelovalni verigi, osebja v restavracijah, gostilnah in drugih ustanovah, saj je lahko od 25 do 50 % ljudi prenašalcev stafilokokov. Nahajajo se na koži in v nosnih gubah ljudi. Najdemo jih tudi v zraku, mleku in smeteh.

Živila, ki so pogosto vpletena v zastrupitve s stafilokoki so gotove jedi, ki se pojedjo hladne (mesnine, jajca) in nekateri mlečni izdelki.

Obladovanje: stafilokokov, glede na visoko število humanih prenašalcev je velik problem. Ker so stafilokoki zmeraj indikatorji sekundarne kontaminacije v že pripravljenih živilih, mora biti čas med proizvodnjo in porabo čim krajši, živila pa morajo biti primerno skladiščena (T). Obladovanje osebne higiene v verigi priprave živil mora biti v skladu s kodeksi dobre higienske prakse (uporaba rokavic, obraznih mask) (Eley, 2000).

4.2.3.2 Clostridium botulinum

Klostridiji so G- pozitivne, obligatno anaerobne, sporogene paličice.



Slika 4.6.: *Clostridium botulinum*

Vir: www.biyolojiegitim.yyu.edu.tr

Patogeneza: Botulizem je zastrupitev s toksinom botulin, ki je klinično nevrotoksin in je najmočnejši naravni strup. Fatalna doza za odraslega človeka znaša 0,1 do 1,0 μ g. Odkrili so sedem različnih tipov toksina, vendar so pri človeku pomembni trije: A, B in E. Ko se toksin absorbira v organizem, prizadene živčne vozle in povzroča paralizo mišic in zadušitev v 24 urah.

Klinični znaki in prognoza: prvi simptomi botulizma se običajno razvijejo med 12 in 36 urami po zaužitju kontaminirane hrane, lahko pa šele po 8 dneh od zaužitja. Oboleli težko požira, oteženo govori, se opoteka in dvojno vidi. Lahko se pojavi slabost, bruhanje in diareja, brez vročice. Težave z dihanjem lahko privedejo do dihalne paralize in smrti zaradi krča. Botulizem je resna bolezen, vendar jo lahko omilimo, če jo prepoznamo v zgodnji fazi in pomagamo obolelemu z intenzivno nego.

Izvor, prenos in razširjenost: pri botulizmu, povzročenem z živilom, je bilo živilo kontaminirano s spori iz okolja, ki med toplotno obdelavo niso bile uničene. V pogojih slabega skladiščenja (počasno ohlajanje, previsoke T skladiščenja) lahko spore pričnejo kaliti in proizvajati toksin. Če izdelek pred serviranjem toplotno obdelamo, uničimo z vegetativnimi celicami tudi nastali toksin, ki je na srečo termolabilen.

C. botulinum najdemo v prebavilih živali in človeka, v zemlji in blatu, od koder lahko kontaminira zelenjavo. Je striktni anaerob in lahko preživi le v pogojih čiste anaerobioze. Spore so termostabilne in preživijo 2 uri kuhanja; uničijo se s posebnimi postopki obdelave (sterilizacija).

Danes lahko bolezen povezujemo z neustrezno konzervirano hrano ali z neustreznim skladiščenjem (Eley, 2000).

4.2.3.3 *Bacillus cereus* (emetični tip)

So G- pozitivni, fakultativno anaerobni, sporogeni bacili. *B. cereus* je znan kot zastrupljevalec živil že celo stoletje. Šele pred kratkim so odkrili dva različna sindroma obolevnosti, ki ju povzročata dva različna toksina.



Slika 4.7: *Bacillus cereus*

Vir: www.life.umd.edu

Patogeneza: bolezen z bruhanjem povzroča toksin z majhno molekularno težo. Aktivnost toksina je sorodna aktivnosti stafilokoknega enterotoksina. Izbruhe bolezni so večinoma povezali z uživanjem kitajske hrane s stojnic, kjer je bil riž potencialni nosilec spor *B. cereus-a*. Toksin se formira med počasnim ohlajanjem, ko spore prehajajo v vegetativne oblike, te pa ponovno pospešeno sporulirajo.

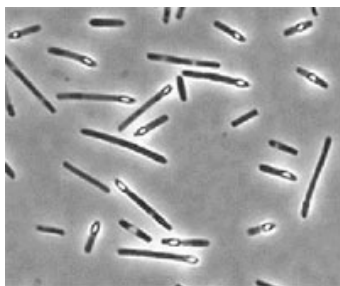
Simptomi bolezni se pojavijo v 1 do 6-ih urah po zaužitju, komplikacije so redke, zdravniška pomoč običajno ni potrebna.

Izvor, prenos in razširjenost: v ZDA in Angliji pojav zastrupitev z *B. cereus*-om ni tako visok kot s salmonelo in *C. perfringens*-om. Skoraj zmeraj je povezana z uživanjem riža v kitajskih ali drugih orientalskih restavracijah. V redkih primerih so potencialni vektorji še testenine, mlečni pudingi in pasterizirana smetana.

Obvladovanje: *B. cereus* ni pomemben povzročitelj zastrupitev s hrano, vendar je v okolju stalno prisoten (v naravi, domu, bolnišnicah) in lahko predstavlja potencialni prenos na živila. Za industrijsko pripravo žitnih izdelkov (riž) je pomembno obvladovanje temperature med in po toplotni obdelavi (Eley, 2000).

4.2.3.4 *Clostridium perfringens*

Je G- pozitivna, obligatno anaerobna, sporogena paličica. Običajno ne formirajo spor v gojišču. Spore dosežejo optimalen razvoj ob rahlem segrevanju.



Slika 4.8: *Clostridium perfringens*

Vir: oregonstate.edu/research/1old/News/04maynews.html

Patogeneza: *C. perfringens* uspeva v velikem temperaturnem razponu (od 15 do 50 °C) in raste optimalno med 43 in 47 °C, ko doseže generacijski čas samo 12 minut. Če zaužijemo izdelek, kontaminiran z večjim številom celic ($> 10^6$) se MO razmnožujejo, ko dosežejo prebavila. Nadaljuje se sporulacija v tankem črevesu ob občasnem izločanju enterotoksina. Toksin poškoduje epitelne celice na črevesnih resicah ter povzroča diarejo. V patogenezi *C. perfringens* sodelujejo še številni eksotoksini, razvrščeni od A do E. Samo tip A je odgovoren za zastrupitve s hrano.

Klinični znaki in prognoza: Simptomi pri zastrupitvi so bolečine v trebuhu in driska, običajno 8 do 24 ur po zaužitju kontaminirane hrane. Bolezen se običajno sama umiri; terapija ni potrebna, razen pri pacientih s slabšo odpornostjo.

Izvor, prenos in razširjenost: *C. perfringens* je pomembna patogena bakterija pri zbolevanju ljudi. Poleg zastrupitev s hrano povzroča tudi plinske gangrene. Izbruhi bolezni so značilni za šole, bolnišnice in druge večje industrijske kuhinje. Vse jedi, ki se hladijo počasi lahko predstavljajo vir *C. perfringens*.

Izvori klostridijev so prebavila človeka in živali, prav tako zemlja, od koder se razširja na zelenjavo. Kuhano meso, perutnina, ribe, pite in mesne omake predstavljajo izvrsten medij za njihovo rast.

V **obvladovanju** zastrupitev *C. perfringens* je pomembno hitra in enakomerna toplotna obdelava in hitro ohlajanje izdelkov ali pripravljenih obrokov. Ob pogrevanju ohlajenih živil je pomembno uničenje vseh vegetativnih celic (Eley, 2000).

4.2.3.5 *Bacillus cereus* (tipa diareje)

Prav tako kot *C. perfringens* izloča toksin v prebavilih človeka, ko je zaužil s sporami kontaminirano hrano. Enterotoksin deluje na enak način kot kolera toksin - povzroča izločanje velike količine tekočine v črevesju, zaradi poškodbe črevesnih resic. Je termolabilen enterotoksin.

Klinična slika obolelega je enaka zgoraj omenjenim. V sindrom obolelosti s *B. cereus*-om so lahko vpletena razna živila: zelenjavni obroki, juhe, klobase, omake, sladice. Pri obvladovanju izbruhov bolezni je pomembno, tako kot pri *C. perfringens*-u obvladovanje temperaturnih režimov toplotne obdelave in hlajenja (Eley, 2000).

4.2.3.6 *Escherichia coli* (ETEC) - enterotoksična

Okužba z enterotoksično *E. coli* je značilna za potnike iz področij s solidno higieno na področja z nižjimi higienskimi standardi, kot so države v razvoju. Bolezen se lahko prenaša z vodo in hrano. Izolirali so jo z mnogih surovih živil, predvsem živalskega izvora. Enterotoksična *E. coli* deluje z termostabilnim in termolabilnim enterotoksinom, kar se kaže z močno vodeno drisko pri človeku (Eley, 2000).

4.2.3.7 *E. coli* (EHEC) - enterohemoragična 0157

Patogeneza bolezni je pogojena z delovanjem verocitotoksinov, ki povzročajo pri človeku močne vodene pa tudi krvave driske. Infektivna doza je zelo majhna - lahko je samo 100 celic *E. coli*.

Bolezen spremljajo močni črevesni krči; za približno 10 % obolelih se bolezen lahko razvije v hemolitični uremični sindrom (HUS), ki lahko povzroči trajno okvaro ledvic. Inkubacijska doba enterohemoragične *E. coli* je od 2 do 8, pa tudi do 12 dni. Večinoma si pacienti opomorejo v 8-ih dneh. Pri obolelih s HUS pa je problematična terapija, saj je malo antibiotikov aktivnih proti EHEC.

E. coli 0157 se prenaša na človeka preko surovega ali premalo kuhanega govejega mesa ali surovega mleka (Eley, 2000).

4.2.4 Druge patogene bakterije prenesene z živali

V prejšnjem poglavju smo razdelili bakterije, ki povzročajo s hrano prenesene bolezni na dve skupini: glede na infektivnost in na pridelovanje toksinov. Večino bakterij, ki povzročajo zastrupitve s hrano najdemo znotraj teh dveh skupin. Tretjo skupino lahko imenujemo skupina manj pomembnih patogenov, saj je letno število prijavljenih primerov obolelosti v svetu relativno majhno. Med najpomembnejše prištevamo

4.2.4.1 *Listeria monocytogenes*

Prištevamo jo h G- pozitivnim, fakultativno anaerobnim paličicam, ki v preparatu oblikuje celice v obliki kitajskih pismenk.



Slika 4.9.: *Listeria monocytogenes*

Vir: www.popsci.com/.../2008-04/bacteria-rescue

Patogenost *L. monocytogenes* je velika, saj povzroča meningitis in septikemijo, vendar običajno pri slabše odpornih pacientih (novorojenčki, nosečnice, starejši). Virulenca (intenzivnost patogenosti) je povezana s pridelovanjem encimov \uparrow - hemolizina in fosfolipaze.

Klinična slika in prognoza: simptomi bolezni so podobni rahli gripi s slabostjo in povišano temperaturo. Pri nosečnicah lahko *L. monocytogenes* povzroči zastrupitev ploda ali splavitev. Običajno simptomi zelo varirajo in jih je težko prepoznati. Inkubacijska doba je lahko dolga od

enega do nekaj tednov. Pri zdravi populaciji se zelo redko razvije resni tip listerioze. Pri zdravljenju sta učinkovita ampicilin in gentamicin.

Izvor, prenos in razširjenost: glede na razširjenost obolevnosti s salmonelo in kampilobaktri, je pojavnost listerioz v svetu manj razširjena.

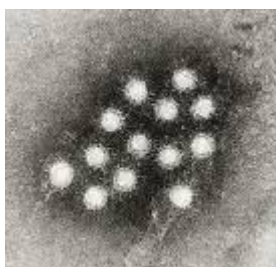
L. monocytogenes je v naravi zelo razširjen mikroorganizem (ubikvitaren). Je odporen na nizke in visoke temperature. Izolirali so ga iz zamrznjenih živil, prav tako je preživel pasterizacijo mleka. Mnoge študije so pokazale, da je D- vrednost (čas 10-kratnega zmanjšanja živih MO) daljša kot pri ostalih patogencih v živilih.

Najpogosteje se pojavlja v nepasteriziranih mehkih sirih, surovi govedini, svinjini, paštetah, perutnini, zamrznjenih morskih sadežih in sveže pripravljenih zelenjavnih solatah.

Obvladovanje: zaradi ubikvitarne narave, razširjenosti v okolju in sposobnosti razmnoževanja pri temperaturi hladilnika jo je zelo težko obvladovati. Potrošniki se varujemo tako, da se osebe iz rizičnih skupin manj odpornih izogibajo uživanja mehkih sirov, surovih pastet ter upoštevajo pri pogrevanju načelo doseganja temperature vrenja (Eley, 2000).

4.2.5 Virusno prenesene bolezni z živili

Hepatitis A: enterovirus iz družine *Picornaviridae*. Obolenje je običajno blago s simptomi vročice, slabosti, slabim tekom, temnim urinom, svetlim blatom, zlatenico in bolečinami v trebuhu v predelu jeter. Oboleli si opomore v 1 do 2 tednih.



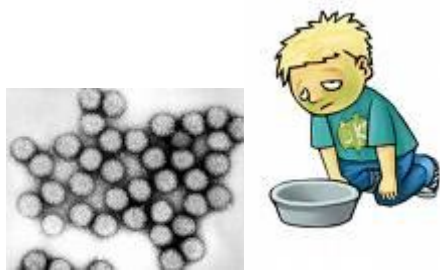
Slika 4.10: Virus hepatitisa A

Vir: www.scientiafoodsafety.com

Okužimo se z zaužitjem kontaminirane hrane ali vode (hladni narezki, sadje in sokovi, solate, školjke in ledene pijače).

Virusi se ne razmnožujejo v hrani; živila so le vektor prenosa okužbe (<http://www.foodsafety.gov/~mow/chap31>, Jay, 2000).

Rotavirusi: so klasificirani v družini *Reoviridae*. Obolenje spremlja bruhanje, vodena driska in vročica.



Slika 4.11: Rotavirusi

Vir: www.plivazdravlje.hr; www.farmedica.si

Prenašajo se preko fekalno-oralne poti, kjer kontaminirane roke predstavljajo najmočnejši vir okužbe. Najpogosteje se pojavlja v vrtcih ali domovih ostarelih. So močno prenosljivi, saj je njihovo pojavljanje v okoljih z bolj ali manj visokimi higienskimi standardi enako pogosto (Eley, 2000, Jay, 2000).

4.2.6 Mikotoksini

Mikotoksini so strupeni izločki nekaterih vrst gliv, ki se v določenih pogojih razvijejo v živilih ali surovinah. So povsod razširjeni in odgovorni za številne epidemije pri živalih in človeku. Mikotoksine izločajo rodovi plesni *Aspergillus* (aflatoksini, ohratoksini), *Fusarium* (fumonizini, zearalenon) in *Penicillium* (ohratoksini). Razlikujemo štiri tipe toksičnosti za živali in človeka:

- akutna, ki povzroča okvaro ledvic in jeter,
- kronična, ki povzroča karcinom jeter,
- mutagena, ki povzroča okvaro DNA in
- teratogena, ki povzroča karcinom plodu pri nosečnicah (Jay, 2000).

POVZETEK

Po definiciji Eley-a razdelimo patogene mikroorganizme v dve večji skupini. Prvi povzročajo infektivne bakterijske zastrupitve (večinoma po gramu negativne bakterije) – toksin je v sestavi celične stene, drugi pa toksične bakterijske zastrupitve (večinoma po gramu pozitivne bakterije) – toksin se izloča v pripravljeno hrano ali prebavilih človeka. Prenašajo se lahko preko živali ali okuženih ljudi, glodavcev, vode, zemlje in zraka. Pri povzročiteljih zastrupitev s hrano opisujemo patogenezo (razvoj bolezni), inkubacijsko dobo, klinične znake, pojavnost, epidemiologijo (razširjenost) in način obvladovanja v živilskem procesu, trgovini ali gostinstvu.

ŠTUDIJSKA VPRAŠANJA

1. Razložite pojem enterotoksin in endotoksin!
2. Razložite pojem patogenost!
3. Kateri dejavniki vplivajo na možnosti zastrupitev in infekcij s hrano?
4. Naštete in opišite sekundarne izvore kontaminacije živil in zastrupitev s hrano!
5. Opišite značilnosti zastrupitve s stafilokoki in katera živila jo povzročajo!
6. Kako se patogene bakterije prenašajo na človeka ?
7. Kateri mikroorganizmi so v predelavi živil odpornejši ? (postavi v vrstni red od 1 do 4)
G + bakterije kvasovke G – bakterije plesni
8. Opiši značilnosti zastrupitve s salmonelami in katera živila so lahko najpogosteje nosilci salmonel?

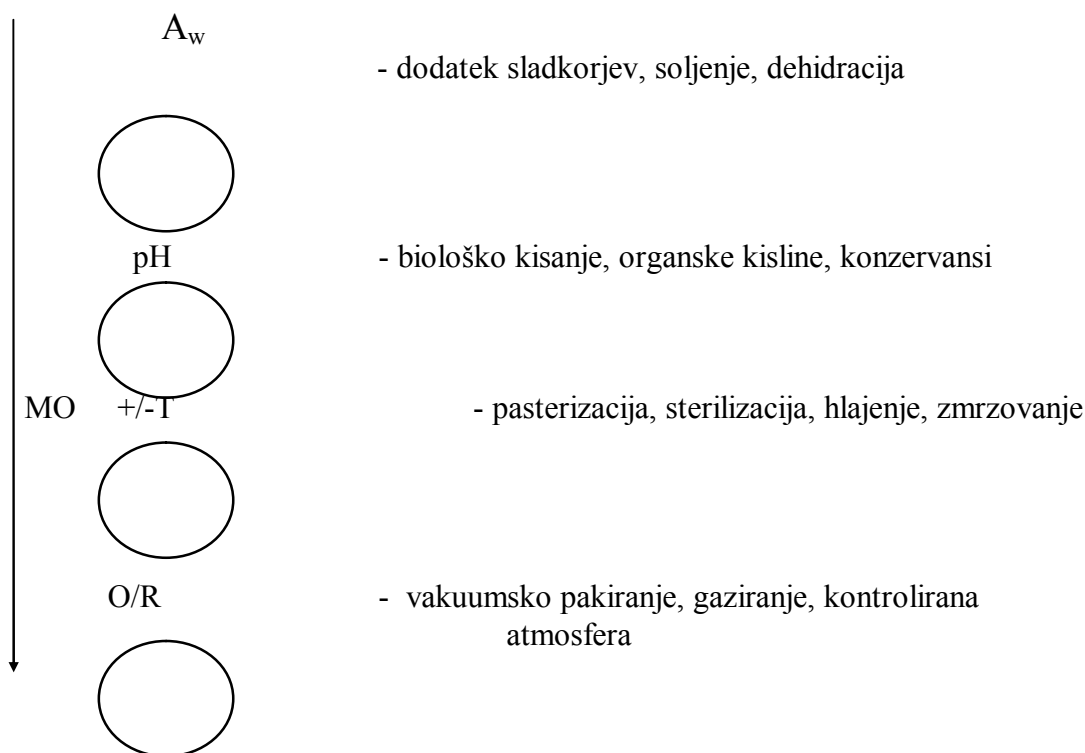
5 METODE VAROVANJA ŽIVIL IN PODALJŠANJE OBSTOJNOSTI (INHIBICIJA MIKROORGANIZMOV V ŽIVILIH)

UVOD

Mikroorganizme imamo za mrtve, ko se ne morejo več razmnoževati, tudi, če se nahajajo v ustreznem mediju pod ustreznimi pogoji. V živilski industriji težimo za tem, da z različnimi postopki konzerviranja inhibiramo rast in razvoj mikroorganizmov v živilih.

S tehnološkimi postopki kot so toplotna obdelava, hlajenje, zmrzovanje, sušenje, naravno ali kemijsko konzerviranje, skušamo doseči čim večjo inhibicijo oz. destrukcijo mikroorganizmov. Ponavadi so posamezni postopki omejeni, saj prvotno mikrobno asociacijo nadomesti nova, ki je na izvedeni postopek odporna. Mnogo učinkovitejše je kombiniranje posameznih metod inhibicije rasti mikroorganizmov, saj deluje čim več inhibitornih parametrov na mikrobno populacijo.

Leistner (1979) je izdelal grafični prikaz več **parametričnega konzerviranja**, ki temelji na tehnologiji ovir. Vsak posamezni postopek tehnološke predelave živil predstavlja zaviralni faktor ali eno oviro, ki preprečuje razvoj mikrobne populacije v živilu. Čim več ovir postavimo mikrobni združbi, bolj bo izdelek biološko stabilen in varen za porabnike.



Slika 5.1.: Kombinacija tehnoloških ovir za inhibicijo rasti mikroorganizmov

Vir: Pokorn, 1990.

Mikroorganizmi se lahko do neke mere adaptirajo na stresne pogoje, kot je npr. kislost ali hlajenje. Odzivajo se z stagnacijo rasti. Specifični mikroorganizmi se odzivajo na stresne pogoje s formiranjem spor, ki v ugodnih pogojih germinirajo v vegetativno celico (npr. *Bacillus sp.* in klostridiji). Nekateri (npr. *E. coli*) lahko prilagodijo fiziološke funkcije za preživetje v obdobju pomanjkanja hranil, sevanja, visoke koncentracije soli in toplote.

Tabela 5.1.: Metode varovanja (konzerviranja) živil (ICMSF, 1988)

metoda	pričakovan učinek
Čiščenje, pranje	zmanjša obremenitev z MO
Hladno skladiščenje (pod 8 °C)	upočasni rast kvarljivcev in patogenih MO
Zmrzovanje (pod -10 °C)	zavre rast vseh mikroorganizmov
Pasterizacija (60 – 80 °C)	ubija večino nesporogenih bakterij, plesni in kvasovk
Blanširanje (95 – 110 °C)	ubija površinske vegetativne bakterije, plesni in kvasovke
sterilizacija (nad 100 °C)	komercialna sterilizacija živil; ubija vse patogene bakterije
sušenje	ustavi rast vseh MO pri $a_w < 0.60$
soljenje	ustavi rast večine MO pri koncentraciji 10 %
kandiranje ali sladkanje	ustavi rast pri $a_w < 0.70$
kisanje	ustavi rast večine bakterij (učinek je odvisen od narave kisline)

Vir: Jay, 1992.

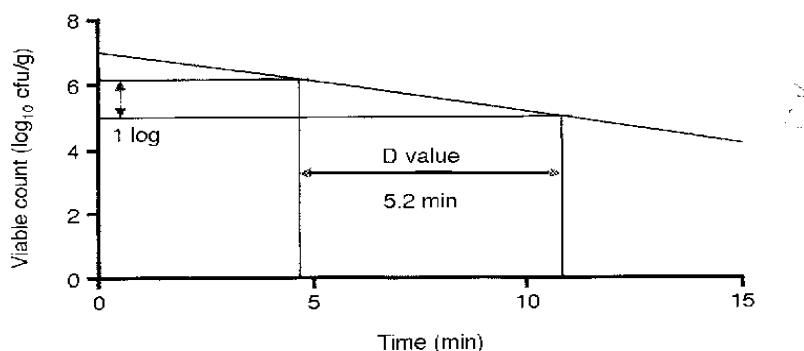
5.1 TOPLOTNA OBDELAVA

Je ena najstarejših in najvarnejših metod konzerviranja živil. Toplotna obdelava uniči vse mikroorganizme, če je **temperatura** dovolj visoka in so ti izpostavljeni taki temperaturi dovolj **časa**. Mikrobne celice umirajo, zaradi denaturacije beljakovin v molekulah, ki so odgovorne za celično dihanje in razmnoževanje. Odmiranje mikroorganizmov poteka logaritmično. Poleg časa in temperature na odmiranje mikroorganizmov s toploto vplivajo še mnogi drugi dejavniki kot so: začetna kontaminacija z mikroorganizmi, kondicija mikroorganizmov, aktivnost vode ter pH medija, vsebnost soli, maščob, beljakovin in ogljikovodikov v mediju.

5.1.1 Kinetika odmiranja

Za razumevanje toplotne dekstrukcije mikroorganizmov v korelaciji s konzerviranjem s toploto poznamo več tehnoloških konceptov oz. izrazov:

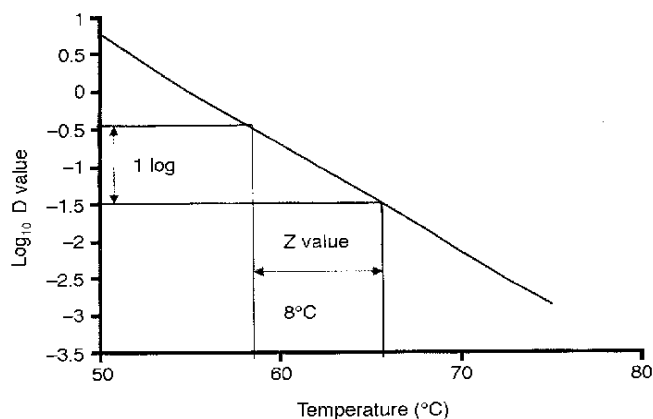
- D- vrednost** - decimalni redukcijski čas, nam izraža **čas**, ki je potreben za desetkratno zmanjšanje mikrobne populacije v nekem mediju pri specifični temperaturi. (npr. $D_{115} = 8$, kar pomeni, da neko živilo moramo segrevati 8 minut pri $T = 115\text{ °C}$ za desetkratno zmanjšanje mikroorganizmov). Sposobnost preživetja mikroorganizmov imenujemo **termorezistenco** (Pokorn, 1990).



Slika 5.1: Kinetika umiranja *E. coli* v jajčnem melanžu

Vir: Jay, 1992.

- b) **z - vrednost** nam izraža **temperaturni interval**, ki nam zagotavlja desetkratno povečanje stopnje umiranja oz. desetkratno zmanjšanje D – vrednosti. Destrukcijska krivulja ponazarja logaritemsko odmiranje mikroorganizmov v odvisnosti od temperature in časa.



Slika 5.2: Z – vrednosti za *C. jejuni* v mesnih kockah

Vir: Jay, 1992.

- c) **F - vrednost** nam izraža ekvivalent časa v minutah pri $T = 121\text{ }^{\circ}\text{C}$, ki je potreben za destrukcijo vseh vegetativnih celic in spor specifičnega mikroorganizma.

$$F_0 = D (\log a - \log b)$$

kjer je a število celic začetne populacije in b število celic končne populacije.

Hitrost odmiranja mikroorganizmov in s tem učinkovitost toplotne obdelave je odvisna od več dejavnikov:

- Vrste mikroorganizmov** - bakterijske celice odmirajo hitreje kot spore in kvasovke in plesni.
- Kondicije posameznih mikroorganizmov** - mlade, hitro deleče celice so občutljivejše od starejših iste vrste.

- **Začetne kontaminacije z mikroorganizmi** - čim bolj je živilo kontaminirano, tem počasnejše je odmiranje in tem daljša toplotna obdelava je potrebna za uničenje.
- **Vodne aktivnosti živila (a_w)** - mikroorganizmi so bolj toplotno labilni v živilih z visoko vodno aktivnostjo in jih hitreje uničimo s segrevanjem v tekočini.
- **Hranilne sestave živila** - znano je, da maščobe povečajo odpornost mikroorganizmov v živilu. Prisotnost soli ima na odpornost precej variabilen učinek, prisotnost sladkorjev pa odpornost poveča
- **pH živila** - ima velik vpliv na preživetje MO. Vegetativne celice kažejo največjo odpornost pri pH 7, bakterijske spore pa pri pH 5,5. Na splošno velja, da nizek pH neugodno vpliva na preživetje MO, zato rabijo kislila živila krajši čas sterilizacije kot nevtralna živila.
- **Načina toplotne obdelave** - ima velik vpliv na hitrost odmiranja MO v živilu. Vlažna toplota hitreje prodira v celice kot suha toplota (Jay, 1991, Pokorn, 1990).

Zaradi vseh naštetih dejavnikov nekatere specifične vrste mikroorganizmov preživljajo toplotno obdelavo in kvarijo toplotno obdelana živila.

V toplotni obdelavi živil sta v splošni uporabi dve temperaturni kategoriji:

- **pasterizacija** - pomeni toplotno uničenje vseh patogenih in uničenje ali zmanjšanje števila kvarljivih mikroorganizmov v določenem živilu (pri pasterizaciji mleka sta pomembni dve metodi pasterizacije:
 - 63 °C - 30 minut - LTLT - nizka T, daljši čas in
 - 72 °C - 15 sekund - HTST - visoka T, kratek čas
- **sterilizacija** - pomeni uničenje vseh živih mikroorganizmov in njihovih spor (pri sterilizaciji mleka je pomembna UHT - ultra high temperature - 140 do 150 °C nekaj sekund).

5.1.2 Napake pri toplotni obdelavi

Kvarjenje toplotno obdelanih živil je posledica štirih najpogostejših napak pri toplotni obdelavi:

1. **Nezadostne toplotne obdelave** - ki je rezultat nepravilnega planiranja procesa glede na T in čas toplotne obdelave ali pa je posledica kontaminacije s sporogenimi bakterijami..
2. **Propustnosti embalaže po procesu** - je najpogostejša oblika kvarjenja z mezofilnimi bakterijami in kvasovkami. Ta napaka je posledica slabega zapiranja in tesnenja embalaže, ki pri hlajenju popusti in vsrka hladilno vodo, s katero se ponovno okuži.
3. **Napake opreme za toplotno obdelavo** (okvare grelcev, izpad energije itd.)
4. **Začetnega kvarjenja**, kjer je vzrok kontaminirana embalaža (Pokorn 1990).

Kljub temu, da je toplotna obdelava živil še vedno najučinkovitejši način zaščite živil pred kvarjenjem in varuje porabnike pred patogenimi mikroorganizmi, sama po sebi ni zadostna.

Učinkovita metoda za doseganje dobre mikrobiološke kakovosti je pasterizacija v kombinaciji s primernim načinom pakiranja pred ali po termični obdelavi ter skladiščenje pod 10°C. S tako kombinacijo dosežemo neoporečno kakovost pri svežem mleku, sladoledu in mnogih polgotovih in gotovih izdelkih (klobasni izdelki, sokovi, sadni in zelenjavni izdelki).

Z intenzivnejšo toplotno obdelavo - sterilizacijo v kombinaciji z nepredušno zaprto embalažo postane živilo biološko stabilno tudi za nekaj let pod 40°C. Pri tovrstnih izdelkih predstavljajo

nevarnost za porabnikovo zdravje predvsem spore patogenih MO kot sta rodova *Clostridium* in *Bacillus*. Preventivni ukrep pri nadzoru pločevink po termični obdelavi je segrevanje pri 120 °C 30 minut, ki jo je uvedel že Meyer leta 1930 in uspešno varuje potrošnike pred morebitnimi zastrupitvami (Pokorn, 1990).

5.2 HLAJENJE

Hlajenje ima zgodovinsko tradicijo že iz 8. stoletja, čeprav ni tako star postopek konzerviranja kot toplotna obdelava.

Nizke temperature vplivajo na aktivnost MO zelo kompleksno: predvsem zavirajo hitrost metaboličnih procesov in razmnoževanje. Metabolične procese spodbujajo encimi, katerih aktivnost merimo s **temperaturnim koeficientom Q_{10}** . Le- ta nam pove za koliko se zviša oz. zniža hitrost encimske reakcije, če temperatura pade ali se dvigne za 10°C. Temperaturni koeficient je pri večini mikroorganizmov pri hlajenju 2 do 4. To pomeni, da se hitrost encimskih procesov pri zmanjšanju temperature za 10 ° zmanjša za 1/2 oziroma za 1/4. Metabolični procesi se ustavijo takrat, ko zmrzne citoplazmin matriks in je s tem onemogočen transport snovi skozi membrane. Čim večja je vsebnost topljencev v živilu, tem nižjo točko zmrzovanja imajo živila.

Postopek hlajenja je primeren le za omejeno podaljšanje obstojnosti živil. Primerno je za skladiščenje živil, kot so jajca, sadje i zelenjava, ki pri zmrzovanju izgubijo del kakovosti. Poleg tega je hlajenje zelo pomembno pri kratkotrajnem vmesnem skladiščenju in transportu (hladilna veriga) svežega mesa, mesnih izdelkov, rib, mleka in mlečnih izdelkov.

Na učinek hlajenja vplivajo tudi ekološki dejavniki kot so relativna vlaga, prisotnost kisika, pH živila in razsoljevanje. Za posamezna živila moramo poznati mikrobnou asociacijo, njene lastnosti ter možnosti preživetja v raznih kombinacijah pogojev skladiščenja (Pokorn, 1990, Jay, 1992).

5.3 ZAMRZOVANJE

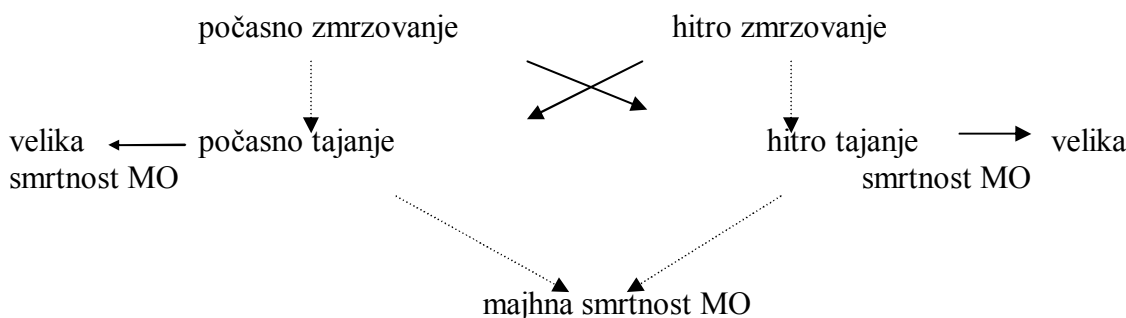
Z nizkimi temperaturami pod zmrziščem ustavimo ali reduciramo mikrobnou aktivnost ter kvarjenje živil. Zmrzovanje od vseh postopkov konzerviranja živil najugodnejše vpliva na ohranitev barve in okusa hrane. Tehnološki postopki zmrzovanja temelje na konvekciji, kondukciji, evaporaciji ali radiaciji.

Calcot in MacLeod sta leta 1974 podala 6 možnih letalnih učinkov pri zmrzovanju celice:

1. toplotni šok predhodne toplotne obdelave in takojšnje hitro zmrzovanje,
2. učinek izvencelične koncentracije topljencev, ki imajo za posledico migracijo vode iz celic,
3. toksičen učinek koncentriranih intracelularnih topljencev,
4. tvorba znotrajceličnih kristalov, ki poškodujejo citoplazmo,
5. zmanjšanje celičnega volumna na minimum.

Kateri od teh letalnih učinkov bo prevladal in poškodoval MO določa postopek zmrzovanja in tajanja:

- pri počasnem zmrzovanju se bakterijske celice izsušijo; pri hitrem tajanju ne morejo sprejeti velike količine vode ter lizirajo. Počasno tajanje omogoča celicam počasno rehidracijo in večje preživetje,
- pri hitrem zmrzovanju se tvorijo majhni zunajcelični kristali, ki skozi membrane prodirajo v citoplazmo, kjer tvorijo znotrajcelične kristale. Pri počasnem tajanju intracelularni kristali rastejo in poškodujejo celične membrane, hitro tajanje pa ne vodi do povečevanja kristalov, zato celice mikroorganizmov tako kombinacijo prežive.



Slika 5.3: Odvisnost preživetja mikroorganizmov od kinetike zamrzovanja in tavanja

Vir: Marčič, 2000.

Najbolj destruktivno za MO je tavanje v mikrovalovni pečici, kjer citoplazma zaradi hitro naraščajoče temperature koagulira.

Tudi vrsta MO vpliva na odpornost pri zmrzovanju in tajanju; G-pozitivne bakterije so odpornejše od G- negativnih. Najbolj rezistentne so bakterijske spore in spore plesni.

Na učinek zamrzovanja vplivajo še drugi dejavniki: starost celic, hranilna sestava živila, a_w in pH živila, čas in temperatura zmrzovanja ter prisotnost krioprotektivnih snovi kot so glicerol, jajčni beljak, peptidi, serumski albumini, jabolčna kislina, kvasni ekstrakt, *natrijev glutamat* in delno glukoza.

V kinetiki zamrzovanja so mikroorganizmi najobčutljivejši v fazi zmrzovanja in neposredno po zmrzovanju. Med skladiščenjem živila se redukcija upočasni (Pokorn, 1990).

5.4 DEHIDRACIJA

Sušenje je ena najstarejših metod konzerviranja živil. Moderne metode dehidracije se odlikujejo po krajših časih sušenja in preprečevanju ireverzibilnih sprememb. To dosežemo s kontroliranimi pogoji : temperaturo, vlago in zračnim tokom. Danes kombinirajo sušenje s centrifugiranjem, stiskanjem, filtracijo, dodajanjem sladkorja (kandirano sadje) in soli (ribe). Ti novi kombinirani postopki pa omogočajo mikroorganizmom, da preživijo v večji meri kot pri klasičnem sušenju, zato je priporočljiva predhodna toplotna obdelava.

Sušenje odstrani vlago iz rastlinskih in živalskih celic živila, prav tako tudi iz celic mikroorganizmov. Zmanjšana aktivnost vode, ki je s sušenjem v tesni fizikalni povezavi, inhibira rast MO, vendar živilo ni sterilno - bakteristatični učinek sušenja.

Letalni učinek dehidracije je odvisen od vrste MO, njihovih rastnih značilnosti, pogojev sušenja, vrste živila in drugo.

Najučinkovitejše je hitro sušenje pri visoki temperaturi in fini granulaciji živila. Celice plazmolizirajo, vendar ne umrejo. Ob rehidraciji oz. nepravilnih pogojih skladiščenja ali embaliranja pričnejo rasti ter kvariti živilo. Odpornost živil na sušenje je zelo različno; vegetativne celice so občutljivejše od spor. Bakterijske endospore so najodpornejše, saj preživijo tudi desetletja suše. Znano je, da so sporangiospore plesni *Mucor* in *Rhizopus* manj odporne od konidijev plesni *Penicillium* in *Aspergillus*.

Dehidrirana živila zahtevajo poseben način pakiranja in skladiščenja. Pakiramo jih v materiale, ki so za vlago nepropustni. Praktičnega pomena za biološko stabilnost dehidriranih živil je t.i. »alarmna vsebnost vlage«. To je zgornja meja vsebnosti vode v živilu, ki še zagotavlja mikrobiološko stabilnost in neoporečnost izdelka (Pokorn, 1990, Jay, 1992).

5.5 KEMIJSKO KONZERVIRANJE

Uporaba kemijskih postopkov je smotrna le tedaj, kadar ne moremo uporabljati fizikalnih, zaradi očitnih organoleptičnih sprememb ali spremembe hranilne vrednosti živila. Konzervansi v dovoljenih odmerkih redko delujejo baktericidno, ponavadi je njihov učinek bakteristatičen.

Pri uporabi konzervansov moramo upoštevati naslednje pogoje:

1. Uporabimo jih le tedaj, kadar ne moremo uporabiti fizikalnih postopkov ali naravnih konzervansov kot so : sol, sladkor, naravne kisline in estri, ki s zdravju neškodljivi.
2. Uporabimo jih le pri konzerviranju mikrobiološko neoporečnih surovin z nizko začetno kontaminacijo:
 - skupno število bakterij < 1000/g
 - kvasovke < 100/g
 - plesni < 100/g
3. Izbrati moramo take konzervanse, ki ne škodujejo zdravju človeka.
4. Odločimo se za tistega, ki ima čim širši spekter delovanja, da z dodajanjem ne izzovemo selekcionirane sekundarne mikrobne asociacije (rezistenca selekcioniranih združb na konzervans).

Konzervansi vplivajo na mikrobo celico na več ciljnih mest:

- na celično membrano z oviranjem transporta metabolitov,
- znotrajcelično, s preprečevanjem metaboličnih aktivnosti, koagulacijo citoplazme in poškodbo bakterijskega genoma.

Faktorji, ki vplivajo na učinkovitost konzervansov so :

- vrsta mikroorganizmov (občutljive so vegetativne celice),
- starost in kondicija MO (mlade celice so občutljivejše),
- pH živila (pri nižjem pH je konzervans učinkovitejši - upoštevamo območje delovanja konzervansa),
- a_w živila (majhna a_w vrednost stimulira delovanje konzervansov),
- hranilna sestava živila,
- kontaktni čas delovanja,
- temperatura (dvig T poveča učinek konzervansov) (Pokorn, 1990).

5.5.1 Naravni postopki konzerviranja

So bili poznani že v antiki in z razvojem potrošnikove zavesti o pomenu naravne in varne hrane danes ponovno pridobivajo na pomenu. Naravni postopki konzerviranja so :

1. **Kisanje:** sem prištevamo naravno biološko kisanje z dodajanjem organskih kislin. Ker se z naravnim postopkom inhibirajo le nekatere vrste mikroorganizmov (gnilobne bakterije, salmonelle, koliformni MO) se zahteva večparametrično konzerviranje (kisanje in pasterizacija).
2. **Soljenje in razsoljevanje:** znižuje aktivnost vode v živilih, klorovi ioni pa delujejo na nekatere vrste MO celo toksično. Nitriti in nitrati v slanici so aktivni proti sporam *C. botulinum-a*. Zaradi ozkega spektra delovanja soli in slanice kombiniramo oba postopka s pasterizacijo v pločevinkah in dimljenjem in sušenjem.
3. **Dimljenje:** deluje tako, da znižuje vodno aktivnost na površini živila. Poleg fizikalnega učinka ima tudi kemijski učinek, saj sestavine kot so mravljična kislina, formaldehid, očetna, propionska kislina in fenoli delujejo toksično na celice MO. Raziskave dima so potrdile prisotnost kemijske snovi - benzopirena, ki delujejo karcenogeno. Dimljenje kot postopek konzerviranja kombiniramo z razsoljevanjem, sušenjem in vakuumskim pakiranjem (Pokorn, 1990, Jay, 1992).

5.5.2 Kemično konzerviranje

Imenujemo konzerviranje v ožjem pomenu besede. Spekter dovoljenih konzervansov se je v sodobni živilski tehnologiji zelo zožil.

Tabela 5.2: Običajni konzervansi in njihova uporaba

konzervans	učinkovita koncentracija	uporaba
propionska kislina in soli	0,32 %	zavira rast plesni v kruhu, pecivu in nekaterih sirih
sorbična kislina in soli	0,2 %	zavira rast plesni v sirih, želejih, sirupih, pecivu
benzojeva kislina in soli	0,1 %	zavira rast plesni v margarini, brezalkohol. pijačah, moštu
natrijev diacetat	0,32 %	zavira rast plesni v kruhu
mlečna kislina	1-3 %	zavira rast bakterij v jogurtu, sirih, mesnih izdelkih, mariniranih živilih
žveplasta kislina in soli	200-300 ppm	zavira rast bakterij v suhem sadju, grozdju, melasi

Vir: Jay, 1992.

Tabela 5.3.: Običajni konzervansi in njihova uporaba

konzervans	učinkovita koncentracija	uporaba
natrijev nitrit	200 ppm	zavira rast bakterij v konzerviranem mesu in ribah
natrijev klorid,		varuje pred mikrobnim kvarjenjem mesa, rib itd.
sladkor, dim		varuje pred mikrobnim kvarjenjem marmelad, džemov, želejev, sirupov itd
dim		varuje pred mikrobnim kvarjenjem mesa in rib

Vir: Pokorn, 1990.

5.6 DRUGI POSTOPKI INHIBICIJE MIKROORGANIZMOV V ŽIVILIH

V sodobni tehnologiji konzerviranja živil se tradicionalne metode vedno bolj umikajo nekaterim novim tehnikam kot so:

Pakiranje v modificirani atmosferi in vakuumu: običajno v ogljikovem dioksidu, ki upočasni dihanje, rast in encimsko aktivnost mikroorganizmov. Vakuumsko pakiranje prav tako zmanjša vsebnost kisika v pakiranju na minimum - izdelek hermetično zapre in prepreči aktivnost mikroorganizmov.

Visok hidrostatski pritisk: sodoben postopek, ki še ni v široki uporabi predvideva inaktivacijo vegetativnih celic MO med 300 in 500 Mpa. Postopek je učinkovitejši, če se kombinira s toplotno obdelavo.

Sevanje: Uporabljajo se beta in gama žarki, katerih mehanizem inhibicije na mikrobo celico še ni docela poznan. Zgleda, da se celice uničijo z destrukcijo celičnih komponent s sprejeto energijo (predvsem DNA). Mednarodne avtoritete na področju higiene in varnosti živil so sprejele zgornjo mejo moči sevanja – 10kGy (Gray) (Jay, 1992).

Inaktivacija s pulzirajočo svetlobo: Je postopek prihodnosti in potencialna metoda redukcije mikroorganizmov na embalaži in živilih. Pulzirajoča svetloba je kratkovalovna svetloba barvnega spektra, ki lahko za 8 logaritmskih enot reducira število vegetativnih celic in za 6 logaritmskih enot število spor. S kombinacijo pršenja z očetno kislino ali vročo vodo pred postopkom osvetljevanja so dosegli še boljše rezultate inhibicije MO.

MINI SLOVAR

Inhibicija: zaviranje rasti mikroorganizmov

Konvekcija: je usmerjeno gibanje **fluida**- tekočin ali kapljevin proti hladnemu mediju (tekočina, prostor) in mu predaja toploto

Kondukcija: toplote ali termalna kondukcija je spontani prenos toplotne energije snov s področja višje **temperature** na nižjo temperaturo

Evaporacija: izhlapevanje

Krioprotekcija: zaščititi (organizem, tkivo ali celico) pred mrazom

POVZETEK

Živilska industrija je razvila številne metode inhibicije mikroorganizmov, ki živila kvarijo ali postanejo, zaradi njihove rasti in razvoja, nevarna (toplotna obdelava, hlajenje, zamrzovanje, sušenje, kemijsko konzerviranje in sodobne postopke). Poznana je metoda večparametričnega konzerviranja, ki kombinira več tehnoloških ovir. Na učinkovitost posameznih postopkov imajo velik vpliv posamezni ekološki dejavniki (pH vrednost, vodna aktivnost, temperatura, čas, hranilna sestava živila, začetna kontaminacija z MO, vrsta, kondicija in starost mikrobnih celic).

ŠTUDIJSKA VPRAŠANJA

1. Kako vpliva zamrzovanje na kakovost živila in na preživetje mikroorganizmov ?
2. Naštejte sodobne metode konzerviranja živil!
3. Kaj je sterilizacija ?
4. Naštejte naravne postopke konzerviranja živil?
5. Kaj je D - vrednost ?
6. Kaj pomeni postopek večparametričnega konzerviranja!
7. Kateri dejavniki vplivajo na število mikroorganizmov v končnem izdelku?
8. Kateri dejavniki vplivajo na učinkovitost toplotne obdelave ?

6 METODE ODKRIVANJA MIKROORGANIZMOV V ŽIVILIH

UVOD

Analiza živil in vzorcev okolja, v katerem se živila predelujejo in hranijo nam omogoča, da ugotovimo prisotnost patogenih in kvarnih bakterij, plesni in toksinov. Interpretacija rezultatov v živilski mikrobiologiji je veliko bolj težavna kot se pričakuje, zato je uporaba vzorčevalnih načrtov in statističnih izračunov nujna. Razlogi za veliko merilno negotovost v mikrobiološki analizi živil so naslednji:

MO v vzorcu, ki ga analiziramo, se razmnožujejo dinamično, odvisno od notranjih in zunanjih ekoloških dejavnikov. Pomeni, da rezultati analize veljajo izključno za preiskovan vzorec, ne pa za celovito proizvodnjo, šaržo ali pakiranje,

Kljub homogenizaciji preiskovanih vzorcev, ni nujno, da je preiskovan vzorec reprezentančen, saj je lahko ciljan mikroorganizem v manjšini, je poškodovan ali neenakomerno porazdeljen v živilu.

V mikrobiološki analizi živil določamo mikroorganizme z **metodo štetja** in z **metodo ugotavljanja prisotnosti** (Wilkie, 1998, Bell et al., 2005).

A. Metodo štetja uporabljamo za tri namene in skupine mikroorganizmov:

1. Osnovno štetje **skupnega števila bakterij**, ki opozarja na vse mikroorganizme in odreja čas obstojnosti izdelka,
2. Prisotnost **fekalnih koliformnih mikroorganizmov** in **enterobakterij** (higienskih indikatorjev), ki opozarja na morebitno nepopolno termično obdelavo ali naknadno kontaminacijo,
3. **specifične patogene mikroorganizme**, ki lahko preživijo toplotno obdelavo, so prisotni v surovih dodatkih živila ali se živila naknadno kontaminirajo

B. Metode ugotavljanja prisotnosti so običajno razdeljene v dve osnovni skupini:

1. **konvencionalne** ali **tradicionalne metode**, ki obsegajo homogenizacijo vzorca, pripravo razreditev in cepljenje specifičnih agarških gojišč, ki omogočajo rast mikroorganizmov v obliki kolonij,
2. **hitre metode** so alternativa tradicionalnim metodam in omogočajo rezultate v krajšem času, kar je močno zaželeno v živilski industriji. So dražje in običajno zahtevajo bolj usposobljeno laboratorijsko osebje (Wilkie, 1998, Bell et al., 2005).

6.1 KONVENCIONALNE METODE – TRADICIONALNE (KLASIČNE) METODE

Za izolacijo iskanega mikroorganizma (npr. *L. monocytogenes* ali *Salmonellae* sp.) so predpisani oz. standardizirani postopki z ISO mednarodnimi standardi in opisujejo metodo v standardnem vrstnem redu (standardni operativni postopki - SOP), ki si sledijo:

1. homogenizacija vzorca v gnetilniku,
2. obogatitev iskanega mikroorganizma z uporabo obogatene gojišča, ki spodbuja njegovo rast in zavira rast drugih mikroorganizmov,
3. količina preiskovanega vzorca je običajno 1 do 25 g,

4. pred-obogatenje je lahko del postopka in omogoča vsem poškodovanim celicam, da popravijo poškodovane membrane in metabolizem,
5. reprezentančni vzorec predstavlja enoto preverjanja šarže surovin ali izdelkov,
6. kjer je mogoče, se vzorec pred vzorčenjem homogenizira (Wilkie, 1998, Bell et al., 2005).

6.2 HITRE METODE

Konvencionalne metode so po svoji naravi intenzivne in zanje porabimo veliko časa. Zato so se vzporedno razvile tudi hitre metode, ki bi skrajšale čas med odvzemom vzorca in dobljenim rezultatom. Te metode običajno zamenjajo postopek obogatenja vzorca s postopkom zgoščevanja (koncentracija) ali končno ugotavljanje prisotnosti zamenja postopek, ki traja manj časa. Nekatere med njimi so:

6.2.1 Imunomagnetna separacija

Metoda uporablja magnetne delce, obdane s protitelesi iskanega mikroorganizma. V mešani populaciji mikroorganizmov v vzorcu se iskani mikroorganizmi – antigeni (če so prisotni) ujamejo na protitelesa magnetnih delcev in ustvarijo specifične komplekse. V postopku je običajno potrebna obogatitev vzorca.

6.2.2 Fluorogena in kromogena gojišča

Napredek v končnem določanju mikroorganizmov se kaže v različnih pristopih. Sodobna tehnologija izdelave gojišč za mikrobiološko preskušanje je uvedla v sestavo **fluorogene** in **kromogene** substance, ki omogočajo v končni fazi prepoznavanja značilnih kolonij na trdnem agarškem gojišču tvorbo živo obarvanih ali fluorescentnih spojin. Kolonije, kot oblike razraščanja mikroorganizmov na agarškem gojišču se obarvajo s specifično barvo na specifičnem gojišču, kar omogoča nedvoumno in hitro prepoznavanje povzročiteljev oz. iskanih mikroorganizmov (Bell et al., 2005).



1.

Slika 6.1: Agarško gojišče v petrijevki

Vir: www.rapidmicrobiology.com/news/1054h24a.JPG

Nekatera gojišča so sestavljena tako, da omogočajo iskanim gibljivim mikroorganizmom »**tekmovalje**« v poltekočem agarju in s tem zgoščevanje iskanega mikroorganizma na določenem delu gojišča (na robu petrijevke ali na drugem koncu U- cevke) – npr. poltekoči Rapaport Vassilliadis agar za ugotavljanje prisotnosti salmonel.



Slika 6.2: Potovanje v poltekočem agarju

Vir: www.rapidmicrobiology.com/news/995h29p.JPG

6.2.3 Petrifilm

Sistem **Petrifilma** je odlična zamenjava za klasično agarško gojišče v petrijevki. Sistem uporablja dehidrirano mešanico hranil in sredstva za utrjevanje, nanešeno na plastični film. Z dodatkom 1 ml vzorca navlažimo dehidriran sloj petrifilma in zapremo z lističem folije. Po inkubaciji se razvijejo mikroorganizmi v obliki kolonij pod folijo, ki so ustrezno obarvani, odvisno od tipa petrifilma. Vzporedno lahko petrifilm uporabljamo kot števno in detekcijsko metodo.



Slika 6.3: Sajenje vzorca na Petrifilm

Vir: www.probiotik.hr/Petrifilm3.jpg

6.2.4 ELISA

ELISA (metoda encimsko vezanih protiteles) je že pogosto uporabljena metoda v živilski mikrobiologiji. Najpogosteje uporablja mikrotiterske plošče, katerih vdolbine so prevlečene s specifičnimi protitelesi, ki ujamejo iskani mikroorganizem. Ujeti MO (antigen) se nato ponovno obdela z encimsko vezanimi protitelesi. Ob dodatku barvnega substrata postanejo kompleksi z iskanimi mikroorganizmi prepoznavni. ELISA metoda ponuja visoko specifičnost in avtomatizirane postopke preiskave.



Slika 6.4: Elisa pripomoček za določanje mikroorganizmov s protitelesi

Vir: www.emdchemicals.com

7 STRATEGIJA MIKROBIOLOŠKEGA NADZORA V ŽIVILSKI INDUSTRIJI

UVOD

V skladu z načeli dobre proizvodne prakse (GMP - good manufacturing practice) v proizvodnji živil izdelamo strategijo mikrobiološkega nadzora, ki obravnava vse surovine, ki vstopajo v proces, postavitve proizvodnih obratov, opremo, tehnološke procese, polizdelke, embalažo in končne izdelke z režimom skladiščenja.

Varnost živil v celoviti proizvodni verigi mora biti zagotovljena od »farme do mize«. Da dosežemo ta integracijski pristop, moramo upoštevati naslednje modele zagotavljanja kakovosti:

- dobro proizvodno prakso (GMP),
- dobro higiensko prakso (GHP),
- HACCP (analizo tveganja kritičnih kontrolnih točk),
- oceno mikrobioloških tveganj,
- kakovostno upravljanje (serije ISO),
- upravljanje celovite kakovosti (TQM – Total Quality Management)



Slika 7.1: Od mize do vilic

Vir: www.foodsafety.gov/fsgfarm.gif

Ti modeli imajo mednarodno veljavo, kar olajša komunikacijo med proizvajalci in distributerji prehranskih izdelkov na eni strani in predstavniki državnega nadzora na drugi, hkrati pa izboljšujejo mednarodno trgovino s poglobljanjem zaupanja v varnost živil (Marčič, 2003, Forsythe, 2000).

Nadzorni kakovostni sistem, ki je danes v široki uporabi tudi v naši živilski industriji, razvit in predstavljen v Ameriki leta 1971 na 1. Ameriški konferenci za varovanje živil, je **HACCP sistem** (Hazard Analysis Critical Control Points) - analiza tveganja kritičnih kontrolnih točk. HACCP je sistem, ki vodi k proizvodnji mikrobiološko neoporečnih živil z analizo tveganj, ki jih prinašajo

- surovine, ki vstopajo v proces,
- tveganja, ki nastanejo v proizvodnem procesu in
- tveganja, ki nastanejo v distribuciji ali jih lahko izzove potrošnik.

Smernice uvajanja in postavljanja HACCP sistema so podrobno opisane v delu Hazard Analysis and Critical Control Point System and Guidelines for its Applications izdane pri Codex Alimentarius Commission leta 1997.

Prednosti HACCP nadzornega sistema so poleg obvladovanja mikrobioloških tveganj še: obvladovanje zastrupitev s hrano, uvajanje tehničnih novosti v kritična mesta proizvodnega procesa, preventivni pristop zmanjša proizvodne izgube, komplementarnost z drugimi nadzornimi sistemi kakovosti ter mednarodno zakonsko priznanje (USDA, WHO, FAO).

Vključuje vse vrste živilske dejavnosti:

- Industrijska in obrtniška podjetja,
- Gostinske obrate,
- Kuhinje v bolnicah, šolah, tovarnah,
- Promet z živali (skladišča, hladilnice, trgovine in transport).

Po Uredbi o higieni živil (852/2004 ES) in načelih Codex Alimentarius (http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp) delimo dejavnosti notranjega nadzora v podjetju z živilsko dejavnostjo na:

I. DEL: SPREMLJAJOČE HIGIENSKE PROGRAME

II. DEL: HACCP

7.1 I. DEL – SPREMLJAJOČI PREDPROGRAMI

Pred vzpostavitvijo samega sistema HACCP v določeno proizvodnjo ali promet z živali je potrebno uvesti določene predprograme, saj je še tako dober HACCP plan brez predprogramov neučinkovit. HACCP torej temelji na izdelanem in vpeljanem osnovnem programu, ki predpisuje bistvene higienske in tehnične pogoje v živilski dejavnosti.

Na kakovost proizvoda vpliva:

- Kakovost vhodnih materialov in surovin,
- Proces (DPP,DHP,DDD),
- Zaposleni (osebna higiena, tveganje človeških napak),
- Oprema (oprema, delovanje, preventivno vzdrževanja),
- Okolje, prostor.

Vseh pet faktorjev je potrebno upoštevati pri pripravi, uvajanju in uporabi HACCP načrta.

Ti predprogrami vključujejo higienske in tehnične zahteve za:

1. stavbo in prostore,
 2. opremo in pripomočke,
 3. transportno opremo,
 4. surovine in embalažni material,
 5. proizvodni proces,
 6. skladiščenje,
 7. zaposlene,
 8. obiskovalce in zunanje delavce,
 9. čiščenje,
 10. nadzor nad insekti, drugim mrčesom in glodavci,
 11. ravnanje z odpadki,
 12. sledljivost,
 13. originalno pakiranje,
 14. usposabljanje zaposlenih,
- (Leapre, 1992)

Principe HACCP študije je uzakonila komisija Codex Alimentarius-a, leta 1992, evropska zakonodaja pa jih je povzela v zakonodaji, ki je navedena na strani 88 in so naslednji:

- analiza tveganja za posamezno živilo ali skupino tehnološko podobnih izdelkov,
 - določitev KKT (kritičnih kontrolnih točk) za posamezne stopnje ali faze v proizvodnem procesu z uporabo drevesa odločitve, ki se lahko merijo,
 - uvedba kritičnih mejnih vrednosti, ki še zagotavljajo varnost izdelka,
 - uvedba korektivnih dejanj ob nepravilnem doseganju vrednosti KKT,
 - uvedba dokumentacije vseh procesov oz. preverjanje uspešnosti delovanja sistema – validacija in
 - evidence in dokumentacijo o izvajanju notranjih kontrol (verifikacija).
- (Leapre, 1992)

Stopnje v HACCP študiji (so razširjene dejavnosti postavljanja principov):

1. Definiramo delovni naslov študije,
2. Izberemo HACCP - team (multidisciplinarnost sistema),
3. Opišemo izdelek (surovine, sestava, obdelava, pakiranje, skladiščenje, distribucija, rok uporabnosti, način uporabe),
4. Opišemo predvideno uporabo izdelka,
5. Zapišemo diagram proizvodnih operacij na tehnološki liniji,
6. Zapišemo vsa tveganja po proizvodnih operacijah in zapišemo vse ukrepe za nadzor tveganj,
7. Apliciramo diagramsko drevo odločitve za KKT,
8. Določimo vrednosti fizikalnih, kemijskih ali mikrobioloških parametrov (meje in tolerance) za vsako KKT,
9. Uvedemo nadzorni sistem za vsako KKT,
10. Uvedemo natančen načrt korektivnih dejanj,
11. Uvedemo sistem hranjenja poročil in drugih dokumentov,
12. Verificiramo delovanje HACCP sistema,
13. Objavimo HACCP študijo, načrt.

Da je lahko uvajanje HACCP kakovostnega sistema uspešno, moramo izpolniti številne pred HACCP principe:

- sodelovanje vodstva,
 - sodelovanje delovnega osebja in permanentno usposabljanje in
 - multidisciplinarnost.
- (Leapre, 1992)

8 MIKROBIOLOŠKI KRITERIJI IN ŽIVILSKA ZAKONODAJA

UVOD

Po definiciji Codex-a Alimentarius-a so mikrobiološki kriteriji sestavljeni iz petih komponent (Jay, 1992):

1. mikrobioloških normativov za posamezne MO, ki jim morajo ustrezati živila,
2. metodologiji mikrobiološkega preskušanja (tehnike ugotavljanje prisotnosti in števila MO),
3. vzorčevalnega načrta (monitoringa),
4. definiciji mikroorganizmov in njihovih toksinov (fekalni indikatorji, indikatorji kvarjenja in patogeni MO),
5. števila ustreznih vzorcev (vzorcev, ki morajo zadostiti normativom - mejnim vrednostim).

8.1 MIKROBIOLOŠKI NORMATIVI ALI STANDARDI

podajajo mejne vrednosti za patogene mikroorganizme, fekalne indikatorje in indikatorje mikrobiološkega kvarjenja živil. Poznamo tri vrste mikrobioloških normativov (Jay, 1992):

- a) **mikrobiološki standard**, ki je zakonsko določen normativ in točno določa dopustno število mikrobnih indikatorjev. Če je število večje je po zakonu neustrezno. Pri nas obravnavajo MB kakovost štirje zakoni :
 - **Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi**, ki prihajajo v stik z živili (UL RS 42/02 in dopolnitve), ki določa pogoje, ki jih morajo izpolnjevati živila, aditivi za živila in izdelki in snovi, ki prihajajo v stik z živili, da so zdravstveno ustrezni (varni in ustrezni glede sestave),
 - **Uredba o higieni živil** (852/2004 ES), ki določa pogoje in načela higiene živil, ki morajo biti izpolnjeni pri proizvodnji in prometu z živili vključno s temeljnimi načeli sistema HACCP in predprogrami,
 - **Pravilnik o pitni vodi** UL RS 19 in 35/2004,
 - **Pravilnik o postopkih izvajanja notranjega nadzora** v obratih za klanje in proizvodnjo mesa parkljarjev, kopitarjev in perutnine UL RS 45/03 (zamenjala ga je Odločba komisije št. 2001/471/ES),
 - **Uredba** komisije ES št. 2073/2005 in 1441/2007 o **mikrobioloških merilih** za živila in
 - **Smernice** za mikrobiološko varnost živil, ki so namenjene končnemu potrošniku (IVZ RS).
- b) **mikrobiološka specifikacija** je interni standard, ki ga kupec surovine ali končnega izdelka zahteva od prodajalca in na osnovi katerega lahko surovino ali izdelek zavrne, če ne ustreza tej specifikaciji. Pri izdelavi specifikacije mora sodelovati obratni mikrobiolog.
- c) **mikrobiološka smernica ali predlog**, ki si ga lahko zastavi proizvajalec končnih izdelkov in zajema maksimalno kontaminacijo z mikrobnimi indikatorji. Ta smernica ima običajno strožje normative, kot so zakonsko določeni in mora zagotavljati biološko stabilnost izdelka za celotni rok trajanja (Jay, 1992).

8.2 METODOLOGIJA MIKROBIOLOŠKEGA PRESKUŠANJA

V zadnjih letih smo bili na tem področju priča intenzivnega usklajevanja z mednarodno/evropsko zakonodajo. Do sedaj je bila sprejeta večina mednarodnih standardov na področju mikrobiologije živil, ki obravnavajo sodobne tehnike izolacije in štetja mikroorganizmov.

8.3 VZORČEVALNI NAČRT ALI NAČRT NADZORA

V Republiki Sloveniji se izvaja spremljanje (**monitoring**) ustreznosti, vključno s pitno vodo in izdelkov in snovi, ki prihajajo v stik z živili. Nosilec monitoringa po Zakonu o zdravstveni ustreznosti živil je javni zavod s področja zdravstva, prehrane, kmetijstva, veterinarstva in okolja. Če želi proizvajalec upoštevati načela dobre proizvodne prakse (GMP) in HACCP, mora team strokovnjakov izdelati lasten vzorčevalni načrt (monitoring), ki naj obravnava celoten sistem vzorčevalnih dejanj (kdo odvzema vzorce, koliko na posameznih proizvodnih linijah, koliko surovin, kje se hranijo vzorci do transporta v laboratorij, v čem se prenašajo, kakšen je čas transporta, spremljajoča dokumentacija, overitve odgovornih oseb itd.). (Jay, 1992).

8.4 ŠTEVILO USTREZNIH VZORCEV

Število ustreznih vzorcev določimo z uvedbo vzorčevalnega načrta, ki temelji na obsegu proizvodnje; lahko je dvo ali tri-razreden in je sestavljen iz vzorčevalnih postopkov in kriterijev (po *Smernicah za mikrobiološko varnost živil...*, 2005).

Dvorazredni načrt sestavljajo naslednje specifikacije: n,c in m.

Trirazredni načrt sestavljajo specifikacije: n,c,m in M.

Pomen posameznih specifikacij je sledeč:

n - število vzorcev (paketov, sekljancev, steklenic) iz dnevne/tedenske proizvodnje, ki morajo biti pregledani, da zadostijo načelom vzorčevalnega načrta,

c - maksimalno število vzorcev, ki lahko presežejo vrednost m za določen obseg proizvodnje. Če je število c preseženo, je celotna proizvodnja nesprejemljiva,

m - najvišje sprejemljivo število bakterij v gramu,

M - najvišje nesprejemljivo število bakterij v gramu. Uporablja se samo v trirazrednem načrtu (Jay, 1992).

POVZETEK

Analiza živil nam omogoča, da ugotovimo prisotnost kvarnih, higienskih in patogenih bakterij. Vsak parameter določanja ima svoj pomen, ki odseva obstojnost, higiensko stanje in varnost živila ali surovine. V mikrobiološki analizi živil določamo MO z metodo štetja in ugotavljamo prisotnost. Z vidika razvoja pa delimo metode na tradicionalne, ki zahtevajo več časa, ker potekajo skladno s fiziološkimi potrebami in lastnostmi mikroorganizmov ter v hitre, ki nam omogočajo hitre rezultate in delujejo na osnovi specifičnih imunskih reakcij mikroorganizmov. V živilski industriji so zakonsko uveljavljeni sistemi HACCP, kot nadzorni sistemi zagotavljanja varnih živil od polja do mize. Po definiciji Codex Alimentarius-a je sistem HACCP sestavljen iz predprogramov, ki naredijo osnovo za izgradnjo sistema po 6-ih načelih. Skladno z izkušnjami v živilstvu so se razvili tudi mikrobiološki kriteriji za posamezne mikrobiološke parametre in posamezna živila in surovine. Opredeljuje jih zakonodaja ali smernice za mikrobiološko varnost živil.

ŠTUDIJSKA VPRAŠANJA

1. Kako obvladujemo patogene mikroorganizme v živilski industriji in gostinstvu?
2. Kakšne so prednosti HACCP nadzornega sistema in njegovi osnovni principi?
3. Kaj je HACCP?
4. Opišite gojišča po namenu uporabe v mikrobiološki analizi živil!
5. Kaj je mikrobiološki monitoring in čemu služi?

9 LITERATURA



- Bell, C., et al. *Food Microbiology and Laboratory Practice*. 1. izd. Oxford: Blackwell Science, 2005.
- Banič, S. *Mikrobiološki slovar*. 1. izd. Ljubljana: Slovensko mikrobiološko društvo, 1994.
- Brock, T.D. et al. *Biology of Microorganisms*. 9. izd. New Jersey: Prentice Hall, 1999.
- Dale, H. *Microbial Threats in Food Industry*. International food hygiene, let. 13, št. 7, let. 14, št. 1 do 8, let. 15, št. 1 do 6. Driffield: Positive Action Publications 2002, 2003, 2004.
- Duraković, S. *Prehrambena mikrobiologija*. Zagreb: Medicinska naklada, 1991.
- Eley, R.A. *Microbial Food Poisoning*. 2. izd. London: Chapman and Hall, 1996.
- Forsythe, J.S. *The Microbiology of Safe Food*. 1. izd. Oxford: B Science, 2000.
- Jay, M.J., et al. *Modern Food Microbiology*. 7. izd. New York: Springer, 2005.
- Jay, M.J., et al. *Modern Food Microbiology*. 6. izd. Michigan: Aspen Publishers, 2000.
- Jay, M.J., et al. *Modern Food Microbiology*. 4. izd. New York: Chapman and Hall, 1992.
- Karakašević, B. et al. *Priručnik standardnih metoda za mikrobiološki rutinski rad*. 3. izd. Beograd-Zagreb: Medicinska naklada, 1967.
- Leapre, S.E., et al. *HACCP: a Practical Guide*. 1. izd. Gloucestershire: The Campden Food and Drink research Association, 1992.
- Marčič, N.V. *Mikrobiologija in biotehnologija. 1. del: Mikrobiologija*. 1. izd. Maribor: Živilska šola Maribor, Višja strokovna šola, 2000.
- Marčič, N.V. *Mikrobiologija in biotehnologija. 1. del: Mikrobiologija*. 6. izd. Maribor: Živilska šola Maribor, Višja strokovna šola, 2005.
- Marčič, N.V., in Vuk, K. *Prednosti preventivnih metod zagotavljanja varnosti živil: primer HACCP*. V: Mikrobiologija in biotehnologija v proizvodnji varnih živil. 1. izd. Ljubljana: Biotehniška fakulteta, 2004
- Marriot, G.N. *Principles of Food Sanitation*. 4. izd. Maryland: Aspen Publishers, 1999.
- Pokorn, J. *Mikrobiologija v živilskih procesih*, 1. izd. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilsko tehnologijo, 1990.
- Singleton, P., in Sainsbury, D. *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. 3. izd. Trowbridge: Wiley-Interscience Publications, 1997.
- Smernice za mikrobiološko varnost živil, ki so namenjene končnemu potrošniku*, Inštitut za varovanje zdravja, Ljubljana 2005.



Uredba komisije (ES) št. 2073/2005 in 1441/2007o mikrobioloških merilih za živila



Wilkie, F.H. *Laboratory Methods in Food Microbiology*. 3. izd. London: Academic press, 1998.



<http://www.armedica.si> 26.11.2008
<http://www.bact.wisc.edu/microtextbook/NutritionGrowth/Introduction.html> 26.11.2008
http://www.bfro.uni-lj.si/gost/smd/mikroslo/frame_a.htm 26.11.2008
<http://bugs.bio.usyd.edu.au/.../hyphalStructure.shtml> 26.11.2008
<http://www.bmb.psu.edu/.../micro107/notes/tempcurv.jpg> 26.11.2008
http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp 26.11.2008
<http://cwx.prenhall.com/brock/chapter1/deluxe.html> 26.11.2008
<http://cwx.prenhall.com/brock/> 26.11.2008
http://en.wikipedia.org/wiki/Microbial_metabolism#Types_of_microbial_metabolism 26.11.2008
<http://www.etwellness.org/.../images/10046.jpg> 26.11.2008
<http://www.fao.org/docrep/003/x6556e/X655639.gif> 26.11.2008
<http://www.foodsafety.gov/fsgfarm.gif> 26.11.2008
<http://www.foodsafety.gov/~mow/chap31> 26.11.2008
<http://hyperphysics.phy-astr.gsu.edu/hbase/organic/imgorg/starchcellu.gif> 26.11.2008
http://interactive.usask.ca/.../constit_prot.html 26.11.2008
<http://www.iyolojiegitim.yyu.edu.tr> 26.11.2008
http://library.thinkquest.org/C004535/media/cell_membrane.gif 26.11.2008
<http://www.life.umd.edu> 26.11.2008
<http://www.mansfield.ohio-state.edu/.../image009.jpg> 26.11.2008
http://www.microbiologytext.com/index.php?module=Book&func=displayarticle&art_id=26 26.11.2008
http://www.mz.gov.si/si/zakonodaja_in_dokumenti/veljavni_predpisi/varnost_in_zdravstvena_ustreznost_hrane/mikrobioloska_merila/ 26.11.2008
http://www.mz.gov.si/si/zakonodaja_in_dokumenti/veljavni_predpisi/varnost_in_zdravstvena_ustreznost_hrane/ 26.11.2008
<http://www.mycology.adelaide.edu.au> 26.11.2008
<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/imagepages/1049.htm> 26.11.2008
<http://oregonstate.edu/research/1old/News/04maynews.html> 26.11.2008
<http://www.pathogencombat.com/.../campylobacter.ashx> 26.11.2008
<http://www.plivazdravlje.hr> 26.11.2008
<http://www.popsci.com/.../2008-04/bacteria-rescue> 26.11.2008
<http://www.rapidmicrobiology.com/news/1054h24a.JPG> 26.11.2008
<http://www.rapidmicrobiology.com/news/995h29p.JPG> 26.11.2008
<http://www.scientiafoodsafety.com> 26.11.2008
<http://www.sissa.it/ilas/jekyll/n03/forum/images/Salmonelle.jpg> 26.11.2008
<http://www.textbookofbacteriology.net/bacteriology.html> 26.11.2008
<http://www.universityofcalifornia.edu> 26.11.2008
<http://www.unu.edu/Unupress/food/8F061e/8F061E0C.GIF> 26.11.2008
<http://vm.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html> 26.11.2008


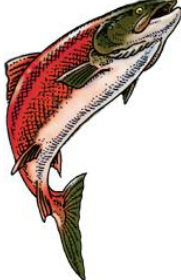

PRILOGA 1: MIKROBIOLOŠKA TVEGANJA V ŽIVILSTVU



SKUPINA ŽIVIL	Izvor / pridobivanje	Tveganja v pridelavi / predelavi	Skupine mikroorganizmov	Preventivni program
<p>1. Začimbe in zelišča</p> 	- Zemlja, v naravi	- močna obremenitev z MO zaradi načina gojenja, skladiščenja in transporta iz dežel s slabo higiensko prakso.	<ul style="list-style-type: none"> - SŠ bakterij pri papriki in popru do 10^7 MO/g, - Antimikrobni efekt nekaterih vrst (česen, čili, klinčki), - Kvasovke do 10^3 do 10^4/g, - Patogeni MO – lahko prisotni (stafilokoki, salmonelle, <i>C. perfringens</i>, <i>Bacillus sp.</i>), če dodajamo začimbe po toplotni obdelavi, - Mikotoksini – aflatoksini (<i>A. flavus</i>, <i>A. parasiticus</i>) iz papirke čilija, popra, ingverja – B1 do 5 µg/kg, skupni do 10 µg/kg. 	<ul style="list-style-type: none"> - izogibanje sušenja na njivi, - ustreznost vode, uporaba sušilcev na žarke, način skladiščenja in embaliranja, - pasterizacija z vodno paro (90 % zmanjšanje kontaminacije), - fumigacija (zadimljanje) z etilen oksidom (99 %) – ekološko vprašljiv postopek, - žarčenje s sevanjem (5-10 Kg – zmanjšanje za 2 do 3 log enote.
<p>2. Vložena zelenjava in omake</p> 	- Zemlja, v naravi	- z dodatkom kisa in s fermentacijo v slanici dosežemo mikrobiološko stabilnost.	<ul style="list-style-type: none"> - tehnološki / avtohtoni mikroorganizmi – mlečno kislinske in oetne bakterije ter dodatek kultur (kisanje zelja, oljke, sojina omaka), - kvarljivci – plesni in kvasovke, če se pH naliva poveča – mlečno kisl.bakterije prerasejo enterobakterije, ki vodijo proces kvarjenja, - mikotoksini- rodovi <i>Aspergillus</i>, <i>Fusarium</i>, <i>Penicillium</i>, - patogeni MO – s kisanjem zavremo rast večine patogenih bakterij. Posebnost – nekatere vrste <i>E. coli</i> in <i>L. monocytogenes</i> se adaptirajo na nizko vrednost 	- HACCP



SKUPINA ŽIVIL	Izvor / pridobivanje	Tveganja v pridelavi / predelavi	Skupine mikroorganizmov	Preventivni program
<p data-bbox="147 304 398 328">3. Oreški in semena</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - oreški - sadeži, - semena – embriji 	<ul style="list-style-type: none"> - zlomljene, poškodovane lupine so lahko vzrok za kontaminacijo, kontaminacija preko zaposlenih, kontaminacija iz zemlje (kamenje, kosti, insekti) pri zemeljskih oreških in semenih. 	<p data-bbox="1368 268 1464 292">Ph (4,4).</p> <ul style="list-style-type: none"> - patogeni MO (salmonela)- izbruhi z orientalskimi slaščicami iz sezama, - mikotoksini - pojav je posledica pogojev okolja (T, vlaga, dolžina deževne dobe pred žetvijo, žetev in skladiščenje). Najpogostejši aflatoksini in ohratoksini A. Zakonodaja predpisuje kriterij 4 ppb (∓g) skupnih aflatoksinov za oreške in semena ter 5 ppb ohratoksinov. 	<ul style="list-style-type: none"> - Zahteve HACCP-a težko izvedljive, zaradi porekla iz dežel v razvoju, - tretiranje semen z blanširanjem ali uparjanjem (lažje luščenje), - suho skladiščenje ob majhni vodi aktivnosti.
<p data-bbox="147 695 472 751">4. Brezalkoholne pijače in sokovi</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - mešanica vode, sladil, kislin, arom, barvil in drugih dodatkov sadja. Delimo jih v sadne sokove in sadne pijače 	<ul style="list-style-type: none"> - tveganje s patogenimi majhno, zaradi nizke pH vrednosti (od 2,5 do 4,2), - kontaminacija preko zemlje, zraka ali vode, ljudi, živali ali ptic, - kontaminacija je mogoča na izvoru pridobivanja surovin in v predelavi sadja, - uživanje nepasteriziranih sokov. 	<ul style="list-style-type: none"> - na površini sadežev je možna prisotnost vseh rodov mikroorganizmov, ki se prenašajo z zrakom, zemljo, vodo ali preko ljudi in živali, a) prenosljivi z vodo: kampilobaktri, salmonele, šigele, vibriji in paraziti (lamblia) ter virusi hepatitisa A ter rotavirusi., b) prenosljivi preko živali/ptic: kampilobaktri, brucele, <i>E. coli</i> 0157, mikobakterije, salmonele in paraziti. - osmofilne kvasovke in plesni (če je koncentracija sokov nad 30 °Brixa), - kvarljivci - osmofilne kvasovke, mlečno kislinske bakterije. 	<ul style="list-style-type: none"> - uporaba neoporečne vode, - ustrezno zatiranje škodljivcev, - nadzor na KKT temperaturnih režimov ob pasterizaciji, - nadzor skladiščenja surovin in izdelkov, - učinkovito čiščenje in dezinfekcija obratov.

SKUPINA ŽIVIL	Izvor / pridobivanje	Tveganja v pridelavi / predelavi	Skupine mikroorganizmov	Preventivni program
5. Konzervirana živila v pločevinkah 	<ul style="list-style-type: none"> - različna živila (meso, ribe, mlečni izdelki) 	<ul style="list-style-type: none"> - obdelava pri 121 °C – sterilizacija, - obdelava pri 100 °C – za živila z večjo kislostjo in nižjo a_w vrednostjo, - povzročitelji kvara so lahko mikroorganizmi ali poškodbe pločevink. 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>C. botulinum</i> – sporogena bakterija, lahko povzroči zastrupitev s smrtjo (najmočnejši naravni strup), - mezofilni mikroorganizmi – rastejo med 25 in 40 °C. Lipolitični anaerobi, laktobacili, plesni in kvasovke. Razvijejo se ob napačno oblikovanih ali poškodovanih pločevinkah. - termofilni MO – preživijo do 68 °C, kislinotvorni bacili – zakisajo vsebino pločevinke (kratkoverižne maščobne kisline). Anaerobi – <i>C. thernosacharolyticum</i> – ustvarja plin in kisline iz ogljikovih hidratov. 	<ul style="list-style-type: none"> - HACCP – ustrezna temperatura toplotne obdelave, uničenje vseh spor (hitro hlajenje po toplotni obdelavi onemogoči izdelavo toksina preživelih spor), preprečevanje poškodb pločevink in vsrkanje hladilne vode.
6. Masti in olja 	<ul style="list-style-type: none"> - živalskega (trebušna votlina, organi, mišice) in rastlinskega izvora (sadeži, semena). 	<ul style="list-style-type: none"> - mikrobnost je omejena zaradi nizke vodne aktivnosti (maslo, margarina) in gibanje MO ja v trdni fazi omejeno. Uspešnejše so plesni (hife), - večina kvara ni mikrobne izvora, temveč gre za hidrolizo/lipolizo s pomočjo naravnih encimov. 	<ul style="list-style-type: none"> - mleko – psihrofilni MO, - maslo, mlečni namazi – bakterije in kvasovke pogosti kvarljivci (mikrokoki, streptokoki <i>Pseudomonas</i> vrste) pa tudi številni rodovi plesni, - siri – proizvodi fermentacije in zorenja, maščobe so razgrajene do različnih stopenj, žlahtne plesni – tehnološko pomembni rodovi, - meso – lipoliza z encimi lipaze – mikrokoki. 	<ul style="list-style-type: none"> - HACCP in Higienški predprogrami HACCP-a (čiščenje, razkuževanje obratov in opreme ter osebna higiena).
7. Čokolada	<ul style="list-style-type: none"> - proizvod iz semen 	<ul style="list-style-type: none"> - kontaminacija in zastrupitve s 	<ul style="list-style-type: none"> - salmonela- izvor ima v 	<ul style="list-style-type: none"> - - uvajanje in vodenje

SKUPINA ŽIVIL	Izvor / pridobivanje	Tveganja v pridelavi / predelavi	Skupine mikroorganizmov	Preventivni program
	<p>južnoameriškega kakavovca, pridobljen s fermentacijo (kvasovke, ml.kisl.bakterije, očetne bakterij) in samosegrevanjem. Vsebuje 6-7 % etanola. Sušenje na soncu ali s toploto preprečuje razvoj plesni. Sledi praženje (150 °C - odstrani se zunanja lupina-ločenje z vejalcem) in mletje v mlinih, kjer se spremeni v gosto tekočo kakavovo maso - surovina za izdelke.</p>	<p>salmonelo so sicer redke, vendar ne zanemarljive (ZDA in E).</p>	<p>zaposlenih - slabe higienske navade, plazilcih ob času zorenja, žetve in fermentacije. Posamezni izbruhi zastrupitev so posledica dejstva, da koncentracija kakavovih maščob preprečuje delovanje želodčnega soka gostitelja in bakterija preživi pot v črevesje, kjer najde ugodno sredino za razmnoževanje in povzroči obolenje.</p>	<p>sistema HACCP v predelavi.</p>
<p>8. Pivo</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - se proizvaja že tisočletja s fermentacijo sladu iz ječmena, koruze, riža ali pšenice in dodatka hmelja. 	<ul style="list-style-type: none"> - tveganje prisotnosti patogenih MO je majhno(nizka pH vrednost - med 3,7 in 4,5, prisotnost etanola in majhna koncentracija O₂), - tveganje prisotnosti kvarljivcev je velika. 	<ul style="list-style-type: none"> - enterobakterije (<i>Hafnia</i>, <i>Aerobacter</i>)- posledica slabe higienske prakse, - anaerobi - v zadnjem času, zaradi spremembe tehnologije (motnost, vonj po gorivu), - ml.kisl.bakterije - laktobacili - kislost, okus po maslu, <i>Pediococcus</i> - sluzenje, - divje kvasovke - vse iz rodu <i>Saccharomyces</i>, ki niso žlahtne - prekomerno penjenje ob odpiranju in neprijeten vonj 	<ul style="list-style-type: none"> - uvajanje in vodenje sistema HACCP v proizvodnji.
<p>9. Sveži proizvodi (sadje,</p>	<ul style="list-style-type: none"> - v naravi, 	<ul style="list-style-type: none"> - mikroorganizmi iz zemlje, vode 	<ul style="list-style-type: none"> - <i>E. coli</i> - higienski indikator 	<ul style="list-style-type: none"> - predpakirano sadje in

SKUPINA ŽIVIL	Izvor / pridobivanje	Tveganja v pridelavi / predelavi	Skupine mikroorganizmov	Preventivni program
<p data-bbox="197 272 315 296">zelenjava)</p> 	<ul data-bbox="568 272 844 328" style="list-style-type: none"> - avtohtona- naravna mikroflora rastlin 	<ul data-bbox="884 272 1279 552" style="list-style-type: none"> - in preko vetra kontaminirajo rastline, - kontaminacija preko živalskih iztrebkov in človeka, - kontaminacija ob obiranju (poškodbe lupin, ovojnic, prerezi, poškodovano tkivo, - kontaminacija preko nepravilno pripravljenih gnojil. 	<p data-bbox="1368 272 1659 328">DLP MAX NEZ 20/g 20-100/g >1000/g</p> <ul data-bbox="1323 336 1711 392" style="list-style-type: none"> - <i>Listeria monocytogenes</i> - raste pri temperaturi hladilnika 	<p data-bbox="1823 272 2085 328">zelenjava, sevanje z gama žarki, pakiranje v modificirani atmosferi</p> <ul data-bbox="1778 336 2069 616" style="list-style-type: none"> - (N₂, O₂ in CO₂- 2-3 %O₂), - dobra farmska praksa, - neoporečna voda, - ustrezen transport in skladiščenje, - HACCP in higienski programi
<p data-bbox="147 671 461 695">10. Ribe in hrana iz morja</p> 	<ul data-bbox="568 671 853 1010" style="list-style-type: none"> - izjemno občutljivo živilo, - naravno obremenjene s številnimi rodovi MO - (luske, koža, prebavila), - mikrofloro pogojuje kakovost vode (T, organski material, slanost). 	<ul data-bbox="884 671 1285 855" style="list-style-type: none"> - hitra pokvarljivost zaradi obremenitve z naravno psihrofilno mikrofloro, - zastrupitve s <i>C. botulinum</i>-om z uživanjem surovih ribjih jedi – suši ter toksini – ostrige. 	<ul data-bbox="1323 671 1738 919" style="list-style-type: none"> - po Gramu negativne - bakterije – kvarljivci rodov <i>Pseudomonas</i>, <i>Vibrio</i>, <i>Flavobacterium</i>, <i>Cytophaga</i> - naravna mikroflora - psihrofilni MO (<i>Vibrio</i>, <i>C. botulinum</i>) so odgovorni za obstojnost rib in izdelkov. 	<ul data-bbox="1778 671 2085 791" style="list-style-type: none"> - konzerviranje, sušenje, vlaganje v slanico, dimljenje, fermentiranje in mariniranje
<p data-bbox="147 1026 371 1050">11. Kruh in pecivo</p> 	<ul data-bbox="568 1026 685 1050" style="list-style-type: none"> - iz žit 	<ul data-bbox="884 1026 1285 1430" style="list-style-type: none"> - nelinearna postavitev v procesu, - vzdrževanje lesenih površin, - mokro čiščenje je onemogočeno, - naslage oglja, - rast plesni na površinah in pripomočkih, - rekontaminacija z zračnimi MO (spore plesni), - transport (hlajenje slaščic), - slaba osebna higiena zaposlenih (majhne manufakture) 	<ul data-bbox="1323 1026 1738 1238" style="list-style-type: none"> - <i>E. coli</i>, stafilokoki (prenos z delavci), - salmonela - surova jajca, - plesni (nefunkcionalna postavitev opreme, zračenje), - <i>Bacillus subtilis</i> (konsistenca kruha) 	<ul data-bbox="1778 1026 2018 1145" style="list-style-type: none"> - upoštevanje načel HACCP in spremljajočih programov

SKUPINA ŽIVIL	Izvor / pridobivanje	Tveganja v pridelavi / predelavi	Skupine mikroorganizmov	Preventivni program
<p data-bbox="147 268 387 295">12. Mleko in izdelki</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - pomembna sestavina prehrane ljudi, - ima visoko hranljivo vrednost 	<ul style="list-style-type: none"> - zaradi visoke hranljive vrednosti izpostavljeno številnim mikroorganizmom, - nečista oprema od molže do transporta in predelave, - bolezni krav - mastitis (<i>S. aureus</i>, <i>E. coli</i>), - kontaminacija po pasterizaciji. 	<ul style="list-style-type: none"> - primarna mikroflora - mikrokoki, streptokoki, - mikotoksini- okužena krma živali, - Listeria monocytogenes - napačno pripravljena silirana krma, - izdelki : a) smetana - problematična zaradi načina proizvodnje (vsebuje 90% vseh MO iz mleka) - Bacillus cereus - termostabilne spore, b) maslo - P. aeruginosa - žarkost masla, c) siri - Listeria mono. - mehki siri iz nepasteriziranega mleka, S. aureus - enterotoksin, jogurt - mlečnokisl. bakterije kot tehnološki MO (streptokoki, laktobacili). 	<ul style="list-style-type: none"> - upoštevanje načel HACCP in spremljajočih programov,
<p data-bbox="147 847 421 874">13. Pripravljeni obroki</p> 	<ul style="list-style-type: none"> - prvi porabniki Rimljani (živiljenje v insulah brez kuhinj in kurjave), - danes največji porabniki Američani in Velika Britanija, - posledica pomanjkanja časa in želje po večji izbiri jedi svetovne kulinarike. 	<ul style="list-style-type: none"> - slaba higienska praksa v delovnem procesu, - šibko upoštevanje načel HACCP sistema, - spore klostridijev in bacilov, - načini pakiranja obrokov: a) vroče pakiranje: v kontejnerjih (tvegano), b) hladno pakiranje (največje tveganje zaradi vmesnih operacij porcioniranja), c) Sous Vide (pasterizacija v vakuumsko zaprtih kontejnerjih, nato hitro ohlajeno) - najbolj varno, d) zamrznjeno - podaljšana stabilnost obrokov, e) nekonvencionalno konzerviranje 	<ul style="list-style-type: none"> - kvarljivci, higienski indikatorji in patogene bakterije, zlasti spore klostridijev in bacilov, 	<ul style="list-style-type: none"> - dosledno izvajanje programa HACCP z vsemi spremljajočimi programi.

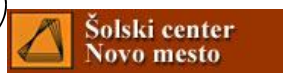
SKUPINA ŽIVIL	Izvor / pridobivanje	Tveganja v pridelavi / predelavi	Skupine mikroorganizmov	Preventivni program
14. Meso in izdelki 	<ul style="list-style-type: none"> - tkivo živali (sterilno, če so živali zdrave), - živilo visoke hranljive vrednosti, 	<ul style="list-style-type: none"> - v zavojčke iz kovinske folije (za mikrovalovno pečico), - v času prireje (šibek zoohigienski režim, bolezni), - v času predelave (različni izvori kontaminacije – stroji, orodja, površine, delavci, voda, zrak). 	<ul style="list-style-type: none"> - kvarljivci – SŠ bakterij- odreja obstojnost in senzorično kakovost mesa in izdelkov (rodovi psihrofilnih bakterij – rodovi <i>Pseudomonas</i>, <i>Acinetobacter</i>, <i>Flavobacterium</i>), - higienski indikatorji – (<i>E. coli</i>, enterobakterije – kazalci higienskega režima med proizvodnjo – orodja, delavci), - patogene bakterije – živali so lahko naravni gostitelji ali se kontaminirajo (kampilobaktri, salmonele, listerije, EH <i>E. coli</i>, stafilocoki). 	<ul style="list-style-type: none"> - dosledno izvajanje sistema HACCP in predprogramov- pomembno je izobraževanje zaposlenih na delovnem mestu nadzora nad kritičnimi točkami.
15. Voda 	<ul style="list-style-type: none"> - podtalnica (podvodne kotanje) in - površinske vode (jezera, reke in rezervoarji). 	<ul style="list-style-type: none"> - Tretiranje s sedimentacijo (grobi delci), flokulacijo (koloidni delci), filtracijo in dezinfekcijo (ozon, kloriranje). 	<ul style="list-style-type: none"> - indikatorski MO – <i>E. coli</i>, koliformni MO, enterokoki (iz fecesa), - <i>Clostridium perfringens</i> – iz okolja, zemlje, fecesa, - patogeni mikroorganizmi - <i>E. coli</i> 0157, <i>Campylobacter jejuni</i>, <i>Gardia lamblia</i>, virusi (hepatitis, rotavirusi). 	<ul style="list-style-type: none"> - definiranje kemjskih, bioloških in fizikalnih tveganj, - zakonodaja zagotavlja stalen nadzor (načrt montaže pip v proizvodnji in monitoring odvzema vzorcev pitne vode za MB preiskavo).

Vir: Dale, 2003, 2004, 2005.

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'